

Cancer du poumon et rétrovirus JSRV: mécanismes de l'oncogénèse médiée par l'enveloppe virale

Margaux Monot

► To cite this version:

Margaux Monot. Cancer du poumon et rétrovirus JSRV : mécanismes de l'oncogénèse médiée par l'enveloppe virale. Cancer. Université Claude Bernard Lyon 1, 2016. Français. NNT : . tel-02799162

HAL Id: tel-02799162 https://hal.inrae.fr/tel-02799162

Submitted on 5 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - ShareAlike 4.0 International License



Mécanismes intracellulaires de la transformation médiée par l'enveloppe de JSRV

Margaux Monot

▶ To cite this version:

Margaux Monot. Mécanismes intracellulaires de la transformation médiée par l'enveloppe de JSRV. Cancer. Université Claude Bernard - Lyon I, 2015. Français. <NNT : 2015LYO10287>. <tel-01282959>

HAL Id: tel-01282959 https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01282959

Submitted on 4 Mar 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.





Thèse de Doctorat en Biologie présentée à L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

par

Margaux MONOT

Mécanismes intracellulaires de la transformation médiée par l'enveloppe de JSRV

Sous la direction de Mme Caroline LEROUX et la co-direction de Mme Fabienne ARCHER

Soutenue publiquement le 16 décembre 2015

Devant le jury composé de :

Dr Marc SITBON, rapporteur

Pr Lucas WILLEMS, rapporteur

Pr Philippe MERLE, examinateur

Dr Caroline DENESVRE, examinateur

Dr Caroline LEROUX, directeur de thèse

Dr Fabienne ARCHER, co-directeur de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Vice-président du Conseil d'Administration Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire Vice-président du Conseil Scientifique Directeur Général des Services

M. François-Noël GILLY

M. le Professeur Hamda BEN HADIDM. le Professeur Philippe LALLEM. le Professeur Germain GILLETM. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE		
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON		
Faculté d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA		
i dedite d'Odoinoiogie			
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON		
Institut des Sciences et Techniques de la Réadantation			
motivat des serences et reeninques de la readaptation	Directeur : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT		
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie			
Humaine			

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. F. DE MARCHI
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur F. FLEURY
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme Caroline FELIX
Département GEP	Directeur : M. Hassan HAMMOURI
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur Georges TOMANOV
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Département Physique	Directeur : M. Jean-Claude PLENET
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. Y.VANPOULLE
Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon	Directeur : M. B. GUIDERDONI
Polytech Lyon	Directeur : M. P. FOURNIER
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. le Professeur C. VITON
Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education	Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. N. LEBOISNE

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury pour m'avoir fait l'honneur de juger et d'évaluer mon travail ainsi que pour leur présence en ce jour si particulier. Merci au **Pr Philippe Merle** pour avoir accepté de présider le jury. Je remercie le **Dr Marc Sitbon** et le **Pr Luc Willems** pour avoir lu en profondeur ce manuscrit avec un regard critique avisé et constructif. Merci au **Dr Caroline Denesvre** pour avoir été présente tout au long de ces 3 années de thèse dans mon comité de suivi de thèse, pour ses idées toujours constructives, et pour être encore présente à l'aboutissement de ces travaux.

J'adresse mes chaleureux remerciements au **Pr Jean-François Mornex** pour m'avoir accueillie dans son unité « Rétrovirus et Pathologie comparée» pour effectuer ma thèse.

Au **Dr Caroline Leroux** et au **Dr Fabienne Archer**, merci pour votre accueil dans l'équipe « Rétrovirus, Evolution et Cancers » (REC, REC3, Eq 3 pour les intimes) et pour m'avoir encadrée tout au long de ces 3 années. Merci à toute l'équipe REC3, pour tout... notamment pour m'avoir supporté tout au long de ma thèse. Plus qu'une équipe de travail, j'ai trouvé une aide dans les moments critiques, un réconfort dans les moments difficiles, un encadrement dans les moments d'égarement mais aussi de l'amitié et beaucoup de bonheur tout au long de ces 3 années. J'ai été entourée par des gens merveilleux, tous avec leur qualités et leur défauts, mais n'est-ce pas ce qui fait la beauté des relations humaines ?

A *Caroline*, merci pour m'avoir accordé ta confiance en m'intégrant dans ton équipe, pour ton soutien indéfectible, pour ton écoute, pour tes conseils, pour tes (nombreuses !) corrections et plus globalement pour l'encadrement de ces 3 ans.

A *Fabienne*, merci pour ta bonne humeur, pour ta disponibilité durant ces 3 années, pour tes conseils avisés et ton encadrement. Je n'oublie pas non plus les heures glaciales au confocal, qui nous ont coûtées cher en mouchoirs et en sirop, ni les visites matinales aux abattoirs, moments de poésie comme on en trouve peu !

A *Christine*, merci pour ta disponibilité, ta gentillesse, pour tes conseils, pour nos échanges sur la biomol et sur la vie en général. Je te souhaite le meilleur, dans ta vie professionnelle comme dans ta vie personnelle.

A **Barbara**, c'est toi qui m'a prise sous ton aile dès mon arrivée, toi qui m'a accueillie et intégrée dans ce laboratoire et dans l'équipe. Ton caractère de feu a rythmé le déroulement de ma thèse, que ce soit par tes éclats de voix dans le couloir ou par ton rire sonore. Tu as une personnalité riche et complexe,

je te prie de croire que tu es personne de valeur et je suis certaine que l'avenir te réserve de belles choses, car tu le mérites.

Aux différents médecins passés dans l'équipe, *Virginie*, *Pierre*, *Nader* et *Jean-Michel*, merci pour votre bonne humeur, pour votre humour (parfois d'un goût douteux...), pour votre gentillesse et pour vos conseils scientifiques. Sans vous la Science serait terne, merci d'être là pour égayer nos divagations de scientifiques. Nader merci de m'avoir appris à découper des inserts et à faire des immunomarquages. Merci également de m'avoir démontré qu'une paillasse n'est finalement pas incassable... Jean-Michel, merci pour les moments inoubliables de calcul de dilutions, comme quoi on peut très bien être maître du monde 3 jours par semaine et boulet les 2 autres.

A *Maryline*, merci pour tout. Pour ton amitié, pour nos milliers de litres de thé avalés, pour nos dizaines de kilos de bonbons et autres gâteaux dévorés, pour nos discussions plus ou moins scientifiques, pour ta gentillesse, pour m'avoir supporté à tes côtés, pour l'encadrement de nos stagiaires (Coucou!!), pour ton aide et ton soutien pendant les moments de doute et de découragement, pour nos fous rires et pour tout le reste. Une belle amitié est née pendant nos thèses, je souhaite qu'elle grandisse et qu'elle perdure dans le temps. Je te souhaite le meilleur.

A *Alexandra*, il y aurait tellement de choses à dire, je ne sais pas par où commencer ni par où finir... Merci pour ta gentillesse sincère et profonde, pour ta générosité, pour ton calme, pour ton don de voir le meilleur en chacun. Merci pour les centaines d'heures passées en culture, pour nos batailles de clim, pour les nettoyages de vacances, pour la laverie, pour les innombrables fous rires, pour les formes bizarres de nos sphères, pour tes précieux conseils, pour ton écoute. J'oublie sûrement beaucoup de choses dans cette liste alors pour conclure : merci simplement d'être toi. Tu es une personne extraordinaire comme on en trouve peu. Je suis extrêmement heureuse de t'avoir rencontrée et je souhaite de tout cœur que nous ne nous perdions pas de vue.

A tous les étudiants que j'ai croisés, *View*, *Claire*, *Wilhelm*, *Emma*, *Cyrielle*, *Najate*, *Franck*, *Margot*, *Marie*, *Julien* et tous les autres, merci pour votre bonne humeur perpétuelle, pour les pauses thé, pour nos réunions du mercredi, pour votre aide, pour nos soirées. Bonne chance à tous dans vos vies professionnelles et personnelles, je suis certaine que nous nous reverrons !

A mes compatriotes de bureau, **Barbara** et **Sophie**, merci pour votre bonne humeur, pour avoir écouté mes histoires abracadabrantes tout au long de ces 3 années, pour nos échanges de bon plan vacances, pour toutes nos discussions, pour votre gentillesse et votre bienveillance.

Merci à **Sylvie**, notre gestionnaire indispensable, pour ton efficacité légendaire, ta gentillesse et ta disponibilité. Ma thèse aurait été beaucoup plus compliquée sans toi !

Merci à tout l'**UMR754** pour votre accueil. Je ne citerai pas tout le monde, mais sachez que je suis heureuse d'avoir pu rencontrer chacun(e) d'entre vous. J'ai apprécié nos échanges et nos moments partagés. Je souhaite le meilleur à chacun d'entre vous.

Mais je ne serais certainement pas arrivée là sans la présence de mes amis et de ma famille à mes côtés.

A *ma mère*, merci pour ton amour illimité, pour ton soutien inconditionnel, pour avoir toujours fait front dans les moments difficiles, pour l'éducation riche, ouverte et bienveillante que tu nous as donné. Je n'aurais pas réussi ce parcours sans toi, cette thèse est aussi un peu la tienne. Merci d'être là, toujours à mes côtés. Je serai toujours aux tiens.

A *mon père* et à *Martyne*, merci pour votre présence en chaque instant et pour votre amour. Merci à vous deux pour les vacances à la Toupinelle et aux Brousses, pour les centaines de petits plats délicieux préparés. Papa, merci de te battre comme tu le fais si bien depuis toutes ces années, merci de ne pas abandonner. Notre vie n'a pas toujours été simple, mais nous avons su traverser les épreuves pour nous retrouver unis. Martyne, merci pour la belle relation que nous avons su développer au cours de toutes ces années, je suis certaine qu'elle sera longue et prospère.

A mes grands-parents, *Guy* et *Colette*. Merci d'avoir toujours été là pour moi et pour votre amour, si précieux à mes yeux. Mamie, tu es tout simplement la meilleure des grand-mères. Merci pour tous ces mardis soirs, pour avoir joué à la marchande de boutons des centaines de fois, pour les histoires racontées, pour les jambons/purée, pour les tables de multiplication récitées dans la voiture (sans grand résultat d'ailleurs...) et tant d'autres choses encore. Papy, merci pour ton humour, pour ta gentillesse, pour ta générosité. Merci d'être là à mes côtés. Vous avez une place immense dans mon cœur.

A ma petite sœur, *Anna*. Merci pour ta force de caractère qui t'a permis de te sortir de situations pas toujours faciles. Merci pour tous nos jeux, pour toutes nos disputes, pour toutes nos retrouvailles, pour ton sourire au réveil, pour m'avoir débloqué toutes mes parties de jeu vidéo, pour avoir regardé environ 500 fois Ivanhoé, pour nos milliers d'heures de Disney avalées avec bonheur. Tu fais partie de moi et je sais que l'avenir nous réserve le meilleur.

Aux **Bartoches**, merci pour votre soutien, pour être là à chaque instant, pour être une famille si formidable. Merci à **Tatie** et **Philippe** pour votre amour, pour les réunions de famille, pour votre générosité et votre gentillesse. Merci pour tous les mercredis après-midi passés chez vous, pour le lavage des mimines, pour les sapins énormes, pour la température glaciale qui règne chez vous, pour le niveau sonore des repas et pour tout le reste. Merci à **Alice**, pour ton calme, ta sérénité, et ta persévérance dans la vie. Merci à **Fanny**, pour ta force de caractère, pour tes convictions, pour nous avoir menées à la

baguette, pour ta générosité et pour ton débit de parole inégalé. Merci à *Violette*, pour ta constance en toute situation, pour ta gentillesse et pour ton caractère bien trempé. Bien plus que des cousines, vous êtes des sœurs pour moi. Notre passé a été riche en bonheur, notre futur le sera encore plus, j'en suis certaine.

A ma belle-famille, merci pour votre accueil, votre gentillesse, votre soutien et pour m'avoir fait découvrir ce magnifique pays qu'est la Haute Loire.

A *Hélène*, merci pour votre bienveillance, votre sérénité, pour tous les bons moments passés à Confolent, pour nos heures passées à papoter, pour votre talent culinaire, pour votre profonde bonté.

A **Tony**, merci pour votre gentillesse, pour votre générosité, pour vos dissertations philosophiques souvent incomprises, pour votre jovialité, pour votre amour du vin rouge, pour les belles flambées en hiver, pour les heures passées à faire le mécano, pour tous les services rendus.

A *Jeff* et *Constance*, merci pour m'avoir accueillie et intégrée si gentiment. *Jeff*, merci pour ton soutien durant cet été de rédaction de thèse. Je te confirme que le SPA est un indispensable pour toute rédaction de <u>vraie</u> thèse. Merci pour ton sens de la fête et pour avoir entrainer ton frère dans des soirées dont je ne veux rien savoir. Merci coach pour mon entrainement intensif, grâce à toi le Run In Lyon a été une grande victoire. Merci d'avance pour tous les chats, chiens, chevaux, poules que tu vas nous soigner. *Const*, merci pour ta bonne humeur, ta gentillesse, pour ta gaité et pour ta carrière de chanteuse qui n'est pas considérée à sa juste valeur. Je suis certaine qu'un jour Déliété deviendra un tube mondial.

A *Morgane* et *Florentin*, les autres valeurs ajoutées. *Morgane*, merci pour ta gentillesse, ta bonté, pour m'avoir fait découvrir la « vraie » montagne, pour nos heures passées à refaire le monde, pour nos conversations équestres. Je suis heureuse d'avoir fait ta connaissance et je souhaite de tout cœur que nous gardions contact. *Flo*, merci pour ton stoïcisme, pour ta bonne humeur permanente, pour ta capacité d'écoute et pour ta générosité.

A mes amis, toujours là dans les bons et moins bons moments. Vous êtes des rayons de soleil pour moi, merci d'être là.

A tous les Altiligériens (ou pas) *Alice, Johan, Caroline, Pierre, Joris, Marion, Dams, Monch, Hélène, Arnaud, Julie, Cham, Sophie, Minich, Mélo, Emma, PH, Hélène, Julien, Roulie, Kévin, Marie, Juju,* et tous les autres, merci de m'avoir aussi bien acceptée, merci d'être des amis aussi formidables.

A *Marion*, *Caroline* et *Alice*, mes poulettes, merci d'être des amies aussi présentes, d'être des filles aussi extraordinaires. Vous êtes essentielles à mon équilibre, je ne serais pas moi sans vous. Merci

pour votre folie permanente, votre joie de vivre, pour votre amour, votre soutien, pour être là à chaque instant. Je n'en dis pas plus, vous savez l'amour que je vous porte. J'allais oublier de remercier la société PTV pour l'organisation de nos réunions mensuelles.

A *Joris*, merci d'être là, merci pour ta folie, merci pour mon menton, pour ton sens du rythme, pour chanter aussi juste que moi, merci pour tout. C'est un peu grâce à toi si je suis là aujourd'hui, merci d'avoir poussé Benjamin dans mes bras ^^.

A **Delphine**, de copines de poney nous sommes passées à amies de toujours. Merci pour les centaines (milliers ?) d'heures passées ensemble à (ou à côté) cheval, pour les changements dans les vestiaires non chauffés l'hiver, pour nos folles escapades (nonnnnn ce n'est pas le prix de Dianeeeeee), pour avoir bravé les tempêtes de neige pour donner une friandise à nos bourriques, pour les chinois après les cours, pour nos concours, pour nos fortunes dépensées à Equita, pour m'avoir toujours soutenue, pour nos moments de désespoirs et nos fous rires. Je suis heureuse et fière d'être ton amie. Merci pour tout, du fond du cœur.

A *Laetitia*, d'abord monitrice, tu es devenue une amie. « En avant, calme et droit », de sains principes à appliquer au quotidien que tu m'as enseigné. Merci pour toutes ces heures de cours, pour ta soif de vie, pour ta volonté, pour m'avoir appris à accepter le mouvement et à être avec au lieu d'aller contre. Merci pour ces moments précieux de bavardages à côté des cours, pour les pauses thés et les confidences partagées.

Et enfin,

A toi *Benjamin*, à qui je dois tellement. Merci d'être à mes côtés chaque instant et de me soutenir comme tu le fais si bien. Tu es ma plus grande force et ma plus grande fierté. Merci pour ton amour, pour ta bonté et ton humanité, pour ton humour et pour ta joie de vivre. Merci pour m'avoir fait découvrir la magnifique équipe de l'ASSE, le Chaudron, So Foot, l'Equipe, Evect, RMC (p'tite dédicace à Coach Courbis et Daniel Riolo), merci pour supporter mon sale caractère, pour m'avoir fait grandir, pour tous nos moments passés et à venir. Notre avenir nous tend les bras et il sera radieux.

A tous ceux qui luttent...



Les cancers sont un groupe de maladies diverses et complexes responsables de millions de décès chaque année à travers le monde. Ces maladies sont multicausales et peuvent être engendrées par de nombreux facteurs génétiques ou environnementaux. Parmi les facteurs susceptibles de déclencher l'oncogénèse, les agents infectieux (virus, bactéries et parasites) sont à l'origine de plus de 16 % des cancers. Parmi les virus, l'étude de la famille des Retroviridae a permis de comprendre les mécanismes de l'oncogénèse virale. Certains rétrovirus portent des oncogènes d'origine cellulaire, d'autres activent des oncogènes cellulaires lors de leur insertion dans le génome de l'hôte et d'autres enfin portent des protéines virales oncogènes. Parmi ces derniers, le rétrovirus JSRV (Jaagsiekte Sheep Retrovirus) est responsable de l'adénocarcinome pulmonaire ovin chez les petits ruminants. JSRV transforme des cellules épithéliales alvéolaires et bronchiolaires via sa protéine d'enveloppe (Env) qui dérégule des voies de signalisation cellulaire contrôlant la prolifération, dont la voie Akt/mTOR (Phosphatidylinositol 3-kinase Alpha serine-Threonine-protein Kinase/ mammalian Target Of Rapamycin). Nous avons identifié la protéine cellulaire RALBP1 (RalA Binding Protein 1) comme un partenaire de Env et analysé les effets de cette interaction sur la transformation induite par JSRV. Nous avons confirmé la formation de complexes protéiques RALBP1/ Env dans les cellules de mammifères. Par inhibition de l'expression de RALBP1 avec des siRNA spécifiques, nous avons montré que la protéine cellulaire est impliquée dans le processus de transformation cellulaire induite par l'enveloppe et dans la modulation de la voie mTOR /p70S6K. Nous avons mis en évidence la sous-expression de RALBP1 dans les cellules exprimant Env in vitro, mais aussi ex vivo dans les cellules primaires tumorales et in vivo dans les tissus tumoraux. Nous avons déterminé que CDC42, un activateur de p70S6K dont l'activité est négativement régulée par RALBP1, interagit avec l'enveloppe de JSRV. Nous avons posé l'hypothèse que la diminution de RALBP1 provoquée par l'Env activerait CDC42 ce qui conduirait à l'activation p70S6K. CDC42 étant impliqué dans l'organisation du cytosquelette d'actine, nous nous sommes intéressés à l'effet de l'enveloppe sur le cytosquelette d'actine. Nous avons mis en évidence une désorganisation du cytosquelette d'actine et une perte de la polarisation des cellules exprimant l'enveloppe de JSRV. Comme de nombreux autres virus, JSRV pourrait moduler le cytosquelette d'actine des cellules épithéliales qu'il infecte afin de désorganiser l'épithélium et ainsi affecter son hôte plus efficacement.

Mots clés : rétrovirus, JSRV, RALBP1, transformation cellulaire, CDC42, actine, cancer du poumon.



Worldwide, cancers are a group of diverse and complex diseases responsible for millions of deaths every year. These diseases are multicausal and associated with various genetic and environmental factors. Infectious agents (viruses, bacteria and parasites) are at the origin of more than 16 % of cancers. Among viruses, the study of the *Retroviridae* family allowed us to understand the mechanisms of viral oncogenesis. They transform cells by carrying oncogenes, by the activation of cellular oncogenes after their integration into the host genomes or by the oncogenic properties of some of their proteins. Among the later, JSRV (Jaagsiekte Sheep Retrovirus) is responsible for ovine lung adenocarcinoma in small ruminants. It transforms alveolar and bronchiolar epithelial cells via its envelope protein (Env). Env expression deregulates pathways involved in the control of cellular proliferation, such as the Akt/mTOR (Phosphatidylinositol 3-kinase Alpha serine-Threonine-protein Kinase/ mammalian Target Of Rapamycin) pathway. We identified RALBP1 (RalA Binding Protein 1) as a cellular partner of Env and analyzed the effects of these interaction on the JSRV induced transformation. We confirmed the formation of RALBP1/Env complexes in cells. By inhibition of RALBP1 expression with specific siRNA, we showed that RALBP1 is involved in Env mediated transformation and in the modulation of the mTOR/p70S6K pathway. We demonstrated the down-expression of RALBP1 in vitro in cell lines expressing Env, and importantly ex vivo in primary cells derived from tumoral lungs and in vivo in tumoral lungs. We determined that CDC42, an activator of p70S6K whose activity is negatively regulated by RALBP1, interacts with the envelope of JSRV. We make the hypothesis that the activation of CDC42, following the Env-mediated decrease of RALBP1, would lead to the activation of p70S6K. As CDC42 is involved in the organization of the actin cytoskeleton, we were interested in the effect of Env on actin cytoskeleton. We showed the disorganization of actin cytoskeleton and the loss of polarization in cells expressing Env JSRV. As many viruses, JSRV could modulate the actin cytoskeleton in epithelial cells via its envelope in order to disrupt the epithelium and affect its host more efficiently.

Key words: retroviruses, JSRV, RALBP1, cellular transformation, CDC42, actin, lung cancer.

Liste des abréviations

- HBV : Hepatitis B Virus
- HCV : Hepatitis C Virus
- HPV : Human PapillomaVirus
- EBV : Epstein Barr Virus
- HHV-4 : Human Herpes Virus type 4
- HHV-8 : Human Herpes Virus type 8
- HTLV : Human T Lymphotropic Virus
- ATLL : Adult T-cell Leukemia and Lymphoma
- TSP/HAM : Tropical Spastic Paraparesis/ HTLV-1 Associated Myelopathy
- ALV : Avian Leukosis Virus
- RSV : Rous Sarcoma Virus
- MMTV : Mouse Mammary Tumor Virus
- JSRV : Jaagsiekte Sheep RetroVirus
- ENTV : Enzootic Nasal Tumor Virus
- BLV : Bovine Leukemia Virus
- MuLV : Mouse Leukemia Virus
- FeLV : Feline Leukemia Virus
- WDSV : Walleye Dermal Sarcoma Virus
- WEHV : Walleye Epidermal Hyperplasia Virus
- RT : Reverse Transcriptase
- ADN : Acide DésoxyriboNucléique
- ARN: Acide RiboNucléique
- dUTP : DeoxyUridine Triphosphate
- dUMP : DeoxyUridine Monophosphate
- SU : glycoprotéine d'enveloppe de surface
- TM : glycoprotéine d'enveloppe transmembranaire
- CT : Cytoplasmic Tail
- LTR : Long Terminal Repeat
- PIC : Pre Integration Complex
- ERV : Endogenous RetroVirus
- HERV-W : Human Endogenous RetroVirus W
- EAV-ES4 : Erythroblastosis Avian Virus-ES4
- EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor
- EGF : Epidermal Growth Factor
- Ha-MuSV : Harvey Murin Sarcoma Virus
- Ki-MuSV : Kirsten Murin Sarcoma Virus
- GAP : GTPase Activating Protein
- GTP : Guanosine TriPhosphate
- Akt : phosphatidylinositol 3-kinase Alpha serine/Threonine-protein Kinase
- PI3K : Phospholnositide 3-Kinase
- Tax : Transactivator of pX
- CDK : Cyclin Dependent kinase
- NF-кb : Nuclear Factor-kappa B

- SFFV : Friend spleen Focus-Forming Virus
- AHV : Avian Hemangioma Retrovirus
- HYAL2 : Hyaluronoglucosaminidase 2
- AECII : Alveolar Epithelial Type II cells
- HNF3-β : Hepatocyte Nuclear Factor 3 β
- C/EBP : CCAATT/Enhancer Binding Protein
- NF-1 : NeuroFibromin-1
- enJSRV : endogenous JSRV
- AECI : Alveolar Epithelial Type I cells
- SP-A/B/C: Surfactant Protein A/B/C
- RON : Récepteur d'Origine Nantais
- MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase
- MEK : Mitogen Extracellular regulated Kinase
- ERK1/2 : Extracellular signal-Regulated Kinase
- SAPK/JNK : Stress-Activated Protein Linase/c-Jun NH2-terminal Kinase
- BMK1/ERK5 : Big Mitogen-activated protein Kinase 1/ Extracellular signal-Regulated Kinase 5
- MAPKKK : MAPK Kinase Kinase
- MAPKK : MAPK Kinase
- RALBP1 : Ral A Binding Protein 1
- LMNA : Lamine A
- TRIM23 : Tripartite Motif containing 23
- MCRS1 : Microspherule protein 1
- LRRC48 : Leucine Rich Repeat Containing 48
- RalGDS : Ras Guanine-nucleotide-Dissociation Stimulator
- RLIP76 : Ral-interacting protein 76KDa
- RBD : Ral Binding Domain
- RalGEF : Ral Guanine-nucleotide Exchange Factor
- CDC42 : Cell Division Control protein 42
- AP2 : Adapter Protein-2
- RESP1/2 : RALBP1 associated Eps domain containing 1/2
- CDK1 : Cycline-Dependent Kinase 1
- GS-E : Glutathione-Electrophile conjugates
- 4-HNE : 4-Hyroxynonenal
- ABC : ATP Binding Cassette
- SLC : SoLute Carrier
- HSP90 : Heat Shock 90kDa Protein
- Hsf-1 : Heat Shock Factor-1
- Drp1 : Dynamin-related protein 1
- PH : Pleckstrine Homology
- HM : Hydrophobic Motif
- PIP2 : Phosphatidylinositol-4,5-diphopshate
- PIP3 : Phosphatidylinositol-3,4,5-triphopshate
- PHLPP : PH domain and Leucin rich repeat Protein Phosphatases
- mTOR : mammalian Target Of Rapamycin
- RAPTOR : Regulatory-Associated Protein of mTOR
- mLST8 : mammalian Lethal with SEC13 protein 8
- TSC2 : Tuberous Sclerosis Complex-2

- RHEB : Ras Homolog Enriched in Brain
- PRAS40 : Proline-Rich Akt Substrate 40 kDa
- PLD1 : PhosphoLipase D1
- ATP : Adénosine Tri-Phosphate
- AMPK : AMP-activated protein Kinase
- Rictor : Rapamycin-Insensitive Companion of mTOR
- mSin1 : mammalian Stress activated protein kinase-interacting protein 1
- 4E-BP1 : eiF4E-Binding Protein 1
- TOS : Tor signaling Sequence
- GDI : Guanine Dissociation Inhibitors
- Par6/aPKC : Polarity protein partitioning-defective-6/atypical Protein Kinase C
- COPI : Coat Protein I
- WASP : Wiskott-Aldrich Syndrome Protein
- Arp2/3 : Actin-related protein 2/3
- PAK : p21-Activated Kinase
- LIMK : LIM kinase
- GFP : Green Fluorescent Protein
- CMV : CytoMegaloVirus
- PLA : Proximity Ligation Assay



SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Cance	ers et virus	1	
II. Retro	viridae et cancers	5	
II.1	Organisation du génome	5	
II.2	Cycle rétroviral	6	
II.3	Les ERV (Endogenous RetroVirus), contreparties endogènes des rétrovirus	8	
III. Onco	ogénèse rétrovirale	8	
III.1	Oncogénèse aigüe	9	
III.2	Oncogénèse non aigüe	11	
IV. JSR	V et adénocarcinome pulmonaire ovin	15	
IV.1	Génome viral, réplication et expression	15	
IV.2	JSRV induit un adénocarcinome pulmonaire	19	
IV.3	L'enveloppe de JSRV induit la transformation cellulaire	23	
RESULTATS EXPERIMENTAUX			

I. Rôle oncogè	des complexes entre la protéine cellulaire RALBP1 et les enveloppes de bétarétroviru enes dans la transformation cellulaire	is . 28
I.1	Etat de l'art	. 28
I.2 entre	Les étapes précoces de la transformation induite par JSRV impliquent l'interaction e l'enveloppe virale et la protéine cellulaire RALBP1	. 36
Earl inte	ly steps of Jaagsiekte Sheep Retrovirus-mediated cell transformation involve the raction between Env and the RALBP1 cellular protein. Monot M <i>et al.</i> , 2015.	e
II. L'en	veloppe de JSRV désorganise le cytosquelette d'actine	. 43
II.1	Etat de l'art	. 43
II.2	Matériel et Méthodes	. 48
11.2	2.1 Expression de l'enveloppe de JSRV dans les cellules MDCK	. 48

11.3	2.2	Culture des cellules MDCK en système tridimensionnel	49
11.2	2.3	Immunodétection de l'actine et de CDC42 sur cellules fixées	49
II.3	Rés	ultats	50
II.: cu	3.1 Ilture n	L'expression de l'enveloppe de JSRV désorganise le cytosquelette d'actine en nonocouche	50
II.: pc	3.2 olarisat	L'expression de l'enveloppe de JSRV prévient la formation d'acini et la ion des cellules MDCK en condition de culture tridimensionnelle	52
II.4	Dis	cussion	54
CO	NCLU	ISION	
Discus	sion ge	énérale	57
Bibliog	raphie		62
Ac	dvance	es in the study of transmissible respiratory tumours in small ruminants".	

Monot M e*t al*., 2015.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Cancers et virus

es cancers figurent parmi les causes majeures de morbidité et de mortalité à travers le ∠monde avec environ 14 millions de nouveaux cas et 8,2 millions de décès selon l'Organisation Mondiale de la Santé¹. L'OMS prévoit une augmentation de 70% des nouveaux cas de cancer dans les 20 prochaines années ce qui portera le nombre de cas de nouveaux cancers à 22 millions. L'Afrique, l'Asie et l'Amérique du sud regroupent à elles seules 70 % des décès dus au cancer². Les cancers sont un ensemble complexe de maladies caractérisées par la prolifération anarchique de cellules anormales. Le processus de transformation d'une cellule saine en cellule tumorale est multi-causal et est la résultante de l'interaction entre des facteurs génétiques et des facteurs externes comme l'hygiène de vie, les substances cancérigènes physiques (rayons UV, radiations,...), chimiques (substances cancérigène mutagène reprotoxique, ...) ou les agents infectieux (virus, parasites ou bactéries) (Figure 1). En 2008, plus de 16% des nouveaux cas de cancers à travers le monde étaient dus à des infections. La proportion de ces cancers était plus élevée dans les pays en voie développement (22,9%) que dans les pays développés (7,4%) (2). Les agents infectieux oncogènes causant le plus grand nombre de cancers sont les virus HBV et HCV (Hepatitis B/C Virus), HPV (Human PapillomaVirus) et la bactérie Helicobacter pylori (2) (Tableau 1). L'étude des virus oncogènes est à l'origine de la découverte des oncogènes viraux et cellulaires, avancée majeure dans la compréhension des mécanismes impliqués dans l'apparition et le développement des cancers. Différentes familles de virus contiennent des virus oncogènes, les principales sont les Herpesviridae, les Hepadnaviridae, les Papillomaviridae et les Retroviridae.

Dans la famille des *Herpesviridae*, EBV (Epstein Barr Virus) ou HHV-4 (Human Herpes virus type 4) est associé au développement de lymphomes B et T tels que le lymphome de Burkitt ou le lymphome hodgkinien (6) (Tableau 1). Il est également associé à la transformation de cellules épithéliales provoquant principalement des carcinomes nasopharyngés et gastriques (7, 8). La prévalence du virus chez la population adulte mondiale est de plus de 90% (7). En 2012, 86 500 cas de carcinomes nasopharyngés ont été reportés dans le monde, soit 0,6% des cancers

¹ OMS, données 2012 <u>http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/</u>

² OMS, <u>http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/</u>

diagnostiqués (8). HHV-8 (Human Herpes virus type 8) est un autre *Herpesviridae* oncogène responsable du sarcome de Kaposi caractérisé par la prolifération anormale des cellules endothéliales et une vascularisation défectueuse (9). En 2012, 44 247 nouveaux cas de sarcome de Kaposi ont été enregistrés à travers le monde et HHV-8 a entrainé 26 974 décès, dont 85% en Afrique (1).

La famille des *Hepadnaviridae* contient plusieurs virus oncogènes : HBV (Hepatitis B Virus) et HCV (Hepatitis C Virus) (Tableau 1). HBV est très répandu avec environ 2 milliards de personnes infectées à travers le monde, dont 240 millions vivent avec une infection chronique³, et est responsable de 780 000 décès par an⁴. Dans la majorité des cas, l'infection est asymptomatique



Figure 1 : Facteurs augmentant le risque individuel de développement de cancers. Les différents facteurs identifiés augmentant le risque de cancer n'ont pas tous le même impact. Les facteurs impactant le plus le risque de développer un cancer sont l'usage de tabac, l'obésité et l'infection par des pathogènes. Selon AACR Cancer Progress Report 2013.

³ OMS <u>http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/</u>

⁴ OMS <u>http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/</u>

et le virus est éliminé. L'infection devient chronique dans 5 à 10% des cas et peut évoluer vers des cirrhoses ou des hépatocarcinomes⁵.

Les virus HPV (Human PapillomaVirus) appartiennent à la famille des *Papillomaviridae* et infectent l'appareil génital de l'homme. Ils sont responsables des cancers du col de l'utérus, de l'anus, de la vulve et du pénis (Tableau 1). Il existe des centaines de génotypes différents dont au moins 13 sont oncogènes, notamment les génotypes 16 et 18, responsables à eux seuls de 70% des cancers associés aux HPV⁶. En 2012, 270 000 femmes sont décédées d'un cancer du col de l'utérus, la prévalence chez les patientes étant de 100% (1, 2).

Agents infectieux		Cancers associés	Mécanismes d'oncogénèse	% des nouveaux cas de cancers dus à des infections en 2008	Nombre de nouveaux cas en 2008
Virus	EBV (Epstein-Barr Virus)/ HHV-4 (Human Herpes Virus type 4)	Carcinome nasopharyngé et gastrique, lymphome de Burkitt, lymphome hodgkinien, lymphome B et T	Carcinogénèse directe	5,4%	110 000
	HHV8 (Human Herpes Virus type 8)	Sarcome de Kaposi	Carcinogénèse directe	2,1%	43 000
	HBV (Hepatitis B Virus)	Hénetoporoinamon	Carcinogénèse indirecte <i>via</i> inflammation chronique	29,5 %	600 000
	HCV (Hepatitis C Virus)	nepatocarcinomes			
	HPV (Human Papilloma Virus)	Carcinomes de l'appareil génital et de la cavité orale	Carcinogénèse directe	30 %	610 000
	HTLV-1 (Human T Lymphotropic Virus type 1)	Leucémies lymphoïdes T et neuromyélopathies	Carcinogénèse directe	0,1 %	2 100
Bactérie	Helicobacter pylori	Carcinomes gastriques, lymphome B gastrique	Carcinogénèse indirecte <i>via</i> inflammation chronique	32,5 %	660 000
Parasites	Clonorchis sinensis	Chalangiacarainama	Carcinogénèse indirecte via	0.1.9/	2100
	Opisthorchis viverrini	cholanglocarchome	inflammation chronique	0,1 70	2100
	Schistosoma haematobium	Carcinome de la vessie	Carcinogénèse indirecte <i>via</i> inflammation chronique	0,3 %	3000

Tableau 1 : Agents infectieux oncogènes chez l'homme. Adapté de (1, 2).

La famille des *Retroviridae* contient de nombreux virus oncogènes (Figure 2) (Tableau 2) dont le delta-rétrovirus oncogène HTLV (Human T Lymphotropic Virus) (Figure 2). HTLV-1 (HTLV type 1) est associé à des leucémies lymphoïdes T de l'adulte ou ATLL (Adult T-cell Leukemia and Lymphoma) et des neuromyélopathies ou TSP/HAM (Tropical Spastic Paraparesis/ HTLV1

⁵ OMS <u>http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/</u>

⁶ OMS <u>http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/</u>

Associated Myelopathy) (Tableaux 1 et 2). HTLV-2 est associé de façon sporadique à des



Figure 2 : Classification des rétrovirus (International Committee on Taxonomy on Viruses, 2014). Les rétrovirus oncogènes sont indiqués en rose.

TSP/HAM. Cinq à dix millions d'individus dans le monde sont infectés par HTLV-1 et le virus est endémique dans certaines régions subtropicales comme le sud du Japon, les Caraïbes, l'Afrique sub-saharienne ou l'Amérique du Sud (10). La plupart du temps l'infection est asymptomatique, seuls 5 % des sujets infectés développent soit une ATLL soit une TSP/HAM après une période de latence de plusieurs dizaines d'années (11, 12).

Il existe également de nombreux rétrovirus oncogènes affectant les animaux (Tableau 2). Les alpharétrovirus ALV et RSV infectent les poulets et induisent respectivement des lymphomes (13) et des sarcomes (14) (Tableau 2). Les béta-rétrovirus affectent les souris et les petits ruminants. MMTV induit des adénocarcinomes mammaires chez la souris (15), JSRV et ENTV des adénocarcinomes pulmonaires et nasaux chez le mouton (16) et la chèvre (17). Outre HTLV-1 chez l'homme, le genre des delta-rétrovirus contient BLV provoquant des leucémies chez les bovins (18). Les gamma-rétrovirus MuLV et FeLV sont responsables de leucémies

respectivement chez la souris et le chat (Tableau 2). Enfin, les epsilon-rétrovirus WDSV et WEHV infectent les poissons chez lesquels ils provoquent des cancers cutanés (Tableau 2).

Genre	Hôte	Nom	Pathologie	
Alpha rótrovirus	Poulet	Avian Leukosis Virus (ALV)	Lymphome	
		Rous sarcoma virus (RSV)	Sarcome	
	Souris	Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV)	Adénocarcinome mammaire	
Béta-rétrovirus	Potito ruminonto	Jaagsiekte Sheep Retrovirus (JSRV)	Adénocarcinome pulmonaire	
	Peuts ruminants	Enzootic Nasal Tumor Virus (ENTV)	Adénocarcinome nasal	
Delta-rétrovirus	Bovin	Bovine Leukemia Virus (BLV)	Leucémie	
	Homme	Human T Lymphotropic Virus 1 (HTLV-1)	Leucémie, neuromyélopathie	
	Chat	Feline Leukemia Virus (FeLV)	Leucémie	
Gamma- rétrovirus	Souris	Mouse Leukemia Virus (MuLV)	Leucémie	
	Gibbon	Gibbon Ape Leukemia Virus (GALV)	Leucémie	
	Koalas	Koala Retrovirus B (KoRV-B)	Leucémie, lymphome	
Epsilon- rétrovirus	2	Walleye dermal sarcoma virus (WDSV)	Sarcome épidermique	
	Poisson	Walleye Epidermal Hyperplasia Virus (WEHV)	Hyperplasie épidermique	

Tableau 2 : Rétrovirus oncogènes chez l'homme et les animaux. Adapté de (5).

II. Retroviridae et cancers

II.1 Organisation du génome

es rétrovirus sont des virus enveloppés à génome ARN possédant deux brins d'ARN monocaténaires à polarité positive, dépendant pour leur réplication de la reverse transcriptase (RT), une ADN polymérase ARN dépendante. Le génome viral ou provirus est

intégré définitivement au génome de leur hôte durant les étapes précoces de l'infection. Les gènes essentiels partagés par tous les rétrovirus sont gag, pol et env. Le gène gag code pour plusieurs protéines structurales essentielles à l'encapsidation du génome viral dont la matrice (MA), la capside (CA) et la nucléocapside (NC). Les protéines de capside s'auto-assemblent en sous-unités appelées capsomères qui s'assemblent ensuite par centaines pour former la capside (19). Le gène *pol* code pour les enzymes essentielles pour le cycle viral, soit la RT couplée à une activité RNaseH et l'intégrase, qui permet l'intégration de l'ADN rétrotranscrit dans le génome de l'hôte. Le gène pol est fusionné ou non avec le gène pro codant pour une protéase virale qui joue un rôle dans les phases tardives de l'infection en permettant la maturation par clivage de polyprotéines virales précurseurs. Chez les gamma et les béta-rétrovirus, le gène pro code également pour une dUTPase, une enzyme qui hydrolyse les dUTP (DeoxyUridine Triphosphate) en dUMP (DeoxyUridine Monophosphate). Son action prévient l'incorporation des dUTP mutagènes dans l'ADN néosynthétisé. Le gène env code pour les glycoprotéines de l'enveloppe virale sous forme d'une polyprotéine glycosylée clivée lors de la maturation par une furine cellulaire en une glycoprotéine de surface (SU) et une glycoprotéine transmembranaire (TM) reliées par un pont disulfure. SU permet l'interaction avec le récepteur cellulaire et est située à la surface des particules virales via son interaction avec TM. TM présente une queue intracytoplasmique ou CT (Cytoplasmic Tail). L'enveloppe de la particule virale est composée des glycoprotéines d'enveloppe et de protéines de la bicouche lipidique cellulaire récupérées lors bourgeonnement des virions à la surface cellulaire.

Le génome proviral intégré au génome de l'hôte possède des régions LTR (Long Terminal Repeat) aux extrémités 5' et 3'. Les LTR sont constituées de séquences non codantes en 5' (U5) et 3' (U3) encadrant de courtes séquences répétées (R) (19). Les LTR sont impliquées dans l'intégration virale et dans le contrôle de la transcription.

II.2 Cycle rétroviral

L'infection commence par le contact entre le virion et la cellule cible *via* la reconnaissance entre la glycoprotéine de surface SU et des protéines de surface agissant comme des récepteurs (Figure 3). L'enveloppe virale et la membrane cellulaire fusionnent ensemble permettant la pénétration de la capside dans la cellule. L'ARN viral simple brin est immédiatement rétro-transcrit par la RT virale en ADN double brin. De façon concomitante, l'ARN viral est dégradé par l'activité RNaseH de la RT. Seule une région RNase résistante est préservée et utilisée pour le démarrage de la synthèse du second brin d'ADN. L'ADN double brin forme avec l'intégrase et des protéines cellulaires le complexe de pré-intégration ou PIC (PreIntegration Complex). Le PIC migre ensuite vers le noyau où il est intégré au génome de l'hôte par l'intégrase virale (Figure 3). La transcription est assurée par l'ARN polymérase II de l'hôte, avec une initiation au LTR5' et un arrêt au LTR3', un ARN proviral entier en résulte. Certains transcrits viraux sont épissés et traduits, comme *env*, d'autres non épissés sont incorporés dans les nouveaux virions ou sont traduits en protéines, tels que *gag* et *pol* (Figure 3). Les virions sont assemblés en particules immatures avant le bourgeonnement depuis la cellule hôte. Chez tous les bétarétrovirus, l'assemblage des virions a lieu dans le cytoplasme, chez les autres genres l'assemblage a lieu à la membrane plasmique. Une fois l'assemblage effectué, les virions bourgeonnent à la membrane cellulaire et sont relargués dans le milieu extracellulaire (Figure 3). La protéase virale clive les polyprotéines précurseurs permettant ainsi la maturation des virions immatures en particules virales infectieuses.⁷



Figure 3 : Cycle de vie d'un rétrovirus⁷.

⁷ http://home.ncifcrf.gov/hivdrp/RCAS/replication.html

II.3 Les ERV (Endogenous RetroVirus), contreparties endogènes des rétrovirus

rtains rétrovirus existent sous deux formes : une forme exogène, infectieuse et libre, et ' une forme endogène ou ERV (Endogenous RetroVirus), intégrée dans le génome de l'hôte. Les ERV font partie du génome de l'hôte et sont transmis comme des gènes mendéliens. Ils proviennent de l'intégration ancestrale des formes exogènes virales dans des cellules germinales qui ont par la suite été stabilisées par des mutations ponctuelles ou des délétions dans les régions codantes et/ou régulatrices des ERV. Cette accumulation de mutations rend les ERV généralement incompétents pour leur réplication, ce qui correspond certainement à une sélection évolutive permettant à l'hôte de ne pas subir les effets délétères des rétrovirus capables de réplication (20). Les intégrations sont nombreuses au cours de l'évolution chez tous les vertébrés, notamment les mammifères, et représentent environ 18% du génome des bovidés et 8% du génome humain (21, 22). Si la plupart des ERV ne produisent pas de protéines virales ou de particules infectieuses, certains ont gardé la capacité de produire des protéines rétrovirales qui jouent des rôles physiologiques importants chez leurs hôtes. Ainsi, le gène env de HERV-W chez l'homme entraîne la production de protéines appelées syncytines ayant une activité fusiogénique. Ces dernières sont nécessaires à la formation d'un tissu embryonnaire, le syncytiotrophoblaste, issu de la fusion des cellules du trophoblaste entre elles et essentiel à la placentation (23). Les ERV peuvent également avoir des effets pathophysiologiques délétères durant les maladies comme les cancers (20). Ainsi, les formes endogènes des rétrovirus MLV et MMTV peuvent être à l'origine de cancers chez la souris. Dans ce cas, un provirus complet est généré à partir de plusieurs recombinaisons entre des endogènes. Les nouveaux provirus peuvent s'intégrer à proximité de proto-oncogènes et altérer leur expression provoquant ainsi une oncogénèse (20).

III. Oncogénèse rétrovirale

a famille des rétrovirus contenant de nombreux virus oncogènes, leur étude a permis la compréhension des différents mécanismes d'oncogénèse virale. Il existe une trentaine d'oncogènes rétroviraux, découverts principalement dans les génomes des virus aviaires et

murins (24). Les rétrovirus oncogènes peuvent être classés en fonction de la rapidité d'apparition des tumeurs : les virus à oncogénèse aigüe induisent rapidement des tumeurs dans la majorité des individus infectés tandis que les virus à oncogénèse non aigüe induisent des tumeurs dans une minorité des individus infectés longtemps après l'infection.

III.1 Oncogénèse aigüe

Les rétrovirus responsables d'oncogénèse aigüe sont porteurs d'un oncogène cellulaire. Ils ont un fort pouvoir oncogène chez les animaux et sont capables de transformer des lignées cellulaires. La transformation est un processus de conversion d'une cellule normale en une cellule anormale ayant la capacité d'échapper aux suppresseurs de croissance, une multiplication illimitée, une résistance à la mort cellulaire ou encore une capacité à l'invasion et la formation de métastases (25). Le prototype des rétrovirus porteurs d'oncogène d'origine cellulaire est le rétrovirus RSV (Rous Sarcoma Virus). Peyton Rous découvre en 1911 le virus RSV par la transplantation de broyats de sarcomes musculaires de poulet sains à des poulets naïfs mettant ainsi en évidence un agent transmissible à l'origine des tumeurs (14). En 1958, il est établit que RSV est capable de transformer des cellules créant ainsi des foyers de transformation (26).



Figure 4 : Mécanisme d'oncogénèse aigue induite par le rétrovirus RSV.

Les virus porteurs d'oncogène d'origine cellulaire sont dits « transducteurs ». Un oncogène est un gène encodant une protéine favorisant la survenue d'un cancer ; il est issu de la modification ou de la dérégulation d'un gène cellulaire normal généralement impliqué dans le contrôle de la prolifération cellulaire ou proto-oncogène. Lors de la capture d'un oncogène cellulaire, le génome viral s'intègre à côté d'un proto-oncogène, qui, à la suite d'une erreur de transcription, peut s'intégrer dans le génome viral (Figure 4). Durant le processus de capture, les séquences codantes des proto-oncogènes peuvent être mutées ce qui entraîne une activation constitutive du proto-oncogène et par la suite l'oncogénèse (Figure 4). RSV contient l'oncogène viral *v-src* dérivé du proto-oncogène cellulaire *c-src* (27) (Figure 4), une protéine tyrosine kinase (28). Le séquençage du gène *v-src* a mis en évidence une délétion de la région C-terminale inhibitrice de l'activité de Src, et des mutations empêchant la liaison avec le domaine régulateur SH3 (SRC Homology 3 domain) entrainant une activation constitutive de Src dans les cellules infectées (29, 30). La plupart des rétrovirus porteurs d'oncogènes d'origine cellulaire sont non réplicatifs en raison de l'insertion de l'oncogène, une co-infection avec un virus auxiliaire est alors nécessaire pour effectuer le cycle viral (24).

Le rétrovirus aviaire MC29 induit des tumeurs myéloides chez le poulet *via* son oncogène *vmyc*, dérivé du proto-oncogène cellulaire *c-myc*, un facteur de transcription cellulaire promoteur de la prolifération cellulaire (31). Il n'y a pas de mutation de *myc* impliquée dans les cancers mais c'est la sur-activation de sa transcription et son amplification génique qui sont les deux mécanismes conduisant à son caractère oncogène comme c'est la cas dans le lymphome de Burkitt (32) ou dans les neuroblastomes (33).

Le virus EAV-ES4 (Erythroblastosis avian Virus-ES4) porte les oncogènes *v-erbA* et *v-erbB* produisant une version largement tronquée de l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), récepteur tyrosine kinase de l'EGF (Epidermal Growth Factor) contrôlant la prolifération cellulaire (34). La protéine oncogène produite par *v-erbB* est déletée en grande partie de son domaine extracellulaire N-term, récepteur à l'EGF, et son domaine C-term, régulateur négatif de l'activité de la protéine, est muté (35). Ces modifications rendent l'EGFR constitutivement actif ce qui est à l'origine du pouvoir oncogène de *v-erbA* et *v-erbB* (36). Il a par la suite été démontré que l'EGFR avait un rôle dans de nombreux cancers humains tel que le cancer du poumon où sa mutation est un marqueur essentiel permettant l'orientation du traitement des malades (37).

La découverte des proto-oncogènes cellulaires a été extrêmement importante dans la recherche et la lutte contre les cancers. En effet, il est apparu que de nombreux cancers non viroinduits dépendaient de la dérégulation des proto-oncogènes cellulaires (38). Ainsi, l'oncogène ras a été initialement découvert dans le génome des rétrovirus Ha-MuSV (Harvey Murin Sarcoma Virus) pour H-ras et Ki-MuSV (Kirsten Murin Sarcoma Virus) pour K-ras. Ras est une GTPase active quand elle est liée à un GTP (Guanosine TriPhosphate). Cette activation est facilitée par la fixation de l'EGF sur son récepteur, l'EGFR. Ras acquiert un caractère oncogène par deux mutations affectant les acides aminés 12 et 61. Elles inhibent l'interaction de Ras avec les protéines inactivatrices GAP (GTPase activating protein) entraînant une diminution du taux d'hydrolyse de GTP et une élévation de l'activation de Ras (39). Des mutations du gène ras et d'effecteurs de cette voie de signalisation dont Akt (phosphatidylinositol 3-kinase Alpha serine/Threonine-protein Kinase) et PI3K (Phospholnositide 3-Kinase) sont impliquées dans de nombreux cancers chez l'homme, dont celui de poumon (40-42). Akt et PI3K ont également été identifiés comme des oncogènes viraux. La protéine cellulaire Akt est l'analogue de la protéine oncogène virale v-Akt de MLV AKT8 responsable du lymphome des cellules T (43) et la protéine cellulaire PI3K est l'analogue de la protéine oncogène virale v-pI3K du virus du sarcome aviaire ASV16 (44).

III.2 Oncogénèse non aigüe

Les rétrovirus responsables d'oncogénèse non aigüe induisent des cancers *via* une activation d'oncogène cellulaire par leur insertion (Figure 5) ou *via* le pouvoir oncogène d'une protéine virale (Figure 6). Les rétrovirus à oncogénèse non aigüe ont un faible pouvoir d'induction des cancers après une longue période de latence, la plupart des animaux infectés ne développent pas de cancers (38). Ils sont réplicatifs et ne portent pas d'oncogène d'origine cellulaire (38).

Activation d'oncogène cellulaire par insertion virale

Une partie des rétrovirus responsables d'oncogénèse non aigüe induisent des tumeurs par mutagénèse insertionelle et l'oncogénèse est due à l'insertion du génome rétroviral à proximité d'un proto-oncogène cellulaire (Figure 5). L'activation des promoteurs et/ou LTR rétroviraux induit une surexpression du proto-oncogène adjacent entraînant une transformation cellulaire (Figure 5) (38). Les insertions dans le génome étant souvent aléatoire, l'activation des proto-oncogènes

par mutagénèse insertionelle est rare ce qui explique en partie la lenteur de l'induction des cancers et le nombre important d'individus infectés asymptomatiques.

Ce mécanisme d'oncogénèse a été découvert et décrit par Hayward lors d'études sur le rétrovirus ALV (45). Ainsi, l'oncogénèse induite par ALV est due à l'intégration du rétrovirus en amont du proto-oncogène cellulaire *c-myc* impliqué dans le contrôle de la prolifération cellulaire (45). La transcription initiée par les LTR proviraux induit une surexpression de *c-myc* et une prolifération cellulaire incontrôlée des lymphocytes B (45).

La surexpression des proto-oncogènes peut être due à une insertion promotrice ou à une insertion amplificatrice.

- Insertion promotrice : le rétrovirus est intégré en amont du proto-oncogène avec son cadre de lecture dans le même sens que celui du proto-oncogène. La transcription du proto-oncogène est initiée par les LTR viraux (45) (Figure 5).
- Insertion amplificatrice : le rétrovirus est inséré en anti-sens en amont du protooncogène ou le rétrovirus est inséré en aval du proto-oncogène. La transcription des LTR viraux active la surexpression du promoteur endogène du proto-oncogène adjacent (Figure 5) (46).

Le rétrovirus M-MuLV active le proto-oncogène cellulaire *c-myc* par insertion amplificatrice (47). Dans le cas du rétrovirus MMTV, 3 sites d'intégration préférentiels ou CIS (Common Insertionnal Site) ont été découverts en amont de différents gènes impliqués dans le contrôle de la prolifération cellulaire : *wnt1* (wingless-type MMTV integration site family, member 1) de la voie Wnt qui est fréquemment dérégulée dans les cancers, *fgf3* (fibroblast growth tumor 3) et *notch4* (38). Le rétrovirus FeLV s'intégre en amont du proto-oncogène cellulaire *c-myc* (48).



Figure 5 : Mécanisme d'oncogénèse non aigüe par mutation insertionelle du virus ALV.

Oncogénèse induite par une protéine virale

Certains rétrovirus à oncogénèse non aigüe doivent leur potentiel oncogénique à une protéine virale n'ayant pas d'homologue cellulaire (Figure 6).Les rétrovirus HTLV-1 et HTLV-2 expriment la protéine oncogène Tax (Transactivator of pX) qui agit sur des voies de signalisation cellulaire et le cycle cellulaire. Tax est une protéine non structurale qui a une action trans-activatrice, régulant positivement ou négativement la transcription de l'ARN viral par sa fixation au TxRE (Tax Responsive Element). Elle réprime de nombreux gènes cellulaires dont *p53*, un facteur de transcription capable d'induire l'apoptose ou l'arrêt de cycle cellulaire en cas de stress ou d'infection (49). Parallèlement, Tax active des kinases CDK (Cyclin Dependent kinase) qui permettent la progression dans le cycle cellulaire. L'immortalisation des cellules par HTLV-1 est en grande partie due à l'activation du facteur de transcription NF-κb (Nuclear Factor-kappa B) par Tax. Dans les cellules naïves, l'expression de NF-κb est finement régulée et n'est activée qu'en réponse à une inflammation tandis que dans les cellules T transformées par HTLV l'expression

de NF-κB est constitutive (50). La surexpression de NF-κB est connue pour déclencher de nombreux cancers dont des leucémies, des lymphomes et des myélomes (51).

Plus rarement, une protéine de structure du rétrovirus peut porter le pouvoir oncogène. C'est le cas pour les glycoprotéines d'enveloppe des virus SFFV (Friend spleen Focus-Forming Virus) (52) et AHV (Avian Hemangioma Retrovirus) (53). Chez le béta-rétrovirus MMTV l'expression de Env dans des lignées épithéliales mammaires humaines et murines cultivées en système tridimensionnel induit des changements morphologiques indicateurs de transformation cellulaire (54). Les enveloppes des béta-rétrovirus ENTV et JSRV sont oncogènes, comme le montre leur capacité à transformer des lignées cellulaires et à induire la formation de tumeurs *in vivo* (pour revue (5)).



Figure 6 : Mécanisme d'oncogénèse non aigüe par des rétrovirus porteurs d'une protéine virale oncogène

IV. JSRV et adénocarcinome pulmonaire ovin

IV.1 Génome viral, réplication et expression

JSRV appartient à la famille des *Retroviridae* et au genre béta-rétrovirus. Son génome de 7,5 kb possède en plus des gènes rétroviraux *gag*, *pol*, *pro* et *env*, un cadre de lecture supplémentaire : *orf-x*, qui chevauche *pol* (Figure 7) (55), transcrit en ARN et codant pour une protéine potentielle de 166 acides aminés (56). Le rôle de X est inconnu et elle ne partage aucune homologie avec des séquences connues (55, 57). Comme tous les rétrovirus, JSRV code pour deux ARN messagers : 1 ARN total non épissé de 7,5 kb permettant l'expression de *gag* et *pol* et 1 ARN mono-épissé de 2,4 kb pour l'expression de *env* (56) (Figure 7).



Figure 7 : Organisation et expression du génome de JSRV. Le génome viral de JSRV contient les gènes essentiels *gag, pro, pol* et *env* ainsi qu'un cadre de lecture *x* chevauchant *pol*. Après intégration, le provirus est transcrit en ARNm sous trois formes : l'ARNm total non épissé permettant l'expression de *gag* et *pol*; l'ARNm mono-épissé « ARNm env » permettant l'expression de *env*; un putatif « ARNm x-env » mono-épissé qui permettrait l'expression de *x*. SD : site donneur d'épissage, SA : site accepteur d'épissage. AAAA : polyadénylation de l'ARNm.

Des sites donneur (SD) et accepteur (SA) d'épissage ont été mis en évidence respectivement en position 193 et 5347 du génome de JSRV 21 (Genbank accession number : AF105220.1) (Figure 7) (56). Un transcrit additionnel de 3,2 kb pourrait correspondre à un produit du cadre de lecture *orf- x* (Figure 7).

Récepteur cellulaire et tropisme

ENTV HYAL2 cellulaire des béta-rétrovirus **JSRV** Le récepteur et est (Hyaluronoglucosaminidase 2) (58-60), une protéine membranaire ubiguitaire de la famille des hyaluronidases. Ces protéines dégradent les acides hyaluroniques, composants majeurs de la matrice extracellulaire. Les hyaluronidases sont impliquées dans la tumorigénèse des cancers colorectaux aux stades avancés (61). HYAL2 a une très faible activité hyaluronidase qui n'est d'ailleurs pas requise pour sa fonction de récepteur (62). La fusion entre le virion de JSRV et la membrane plasmique cellulaire est assurée par la sous-unité SU de Env; l'entrée du virion nécessite un pH acide ce qui a permis d'établir que JSRV pénétrait dans la cellule par endocytose (63). La fusogénicité de l'enveloppe d'ENTV est moindre que celle de JSRV et un pH très acide est requis pour la fusion entre l'enveloppe d'ENTV et la membrane cellulaire. (64).

Etant donné la distribution ubiquitaire de HYAL2, JSRV est capable d'infecter de nombreux types cellulaires. Chez les animaux naturellement infectés, le génome proviral de JSRV est présent dans les cellules mononucléées du sang périphérique (monocytes, lymphocytes B et T) (65, 66) et les cellules épithéliales du poumon profond (67, 68). L'infection des cellules sanguines précède l'infection des cellules épithéliales pulmonaires et le développement des tumeurs (69). *In vitro*, des lignées cellulaires d'origine tissulaire diverses peuvent être infectées par le virus (70). *Ex vivo*, il a été montré que des cellules épithéliales alvéolaires de type 2 ou AECII (Alveolar Type II cells) dérivées de tumeurs contiennent le génome viral et qu'elles produisent des virions quand elles sont cultivées en système tridimensionnel (71), soulignant ainsi la capacité de ces cellules à répliquer le virus.

Malgré un tropisme cellulaire large, JSRV ne se réplique et ne transforme que les cellules épithéliales du poumon profond : les cellules alvéolaires de type 2 ou Alveolar Epithelial type II Cells (AECII) et les cellules Club (anciennement cellules de Clara) (67, 68). La présence de HYAL2 n'est donc pas un facteur suffisant pour discriminer les cellules capables de répliquer le virus. L'expression de JSRV est aussi définie par ses LTR. Les régions activatrices des LTR de

JSRV sont spécifiquement activées par des facteurs de transcription produits par les cellules épithéliales du poumon profond (72). La région U3 du génome proviral de JSRV contient des motifs de fixation pour HNF3- β (Hepatocyte Nuclear Factor 3 β), un facteur de transcription impliqué dans l'expression de gènes spécifiques du poumon. Ce facteur est essentiel pour l'activité transcriptionnelle de JSRV dans les AECII (73). L'expression de HNF3- β dans les cellules NIH3T3 permet une augmentation de l'expression d'un gène rapporteur sous le contrôle des LTR de JSRV (74). C/EBP (CCAATT/Enhancer Binding Protein) et NF-1 (NeuroFibromin-1) ont également été identifiés comme des facteurs très importants dans l'activité des LTR de JSRV. L'altération par mutagénèse dirigée des sites de liaison à NF-1, C/EBP et HNF3- β réduit de 40 à 70% l'activité des LTR dans les AECII murines MLE15 (75). Au contraire de JSRV, les LTR d'ENTV et d'enJSRV ne contiennent pas de site de fixation à HNF3- β (76). Il faut également noter que le site de fixation de C/EBP est incomplet dans les LTR de enJSRV mais conservé chez ENTV (76).

Forme endogène de JSRV : enJSRV

Outre les formes exogènes de JSRV, il existe des formes endogènes ou enJSRV présentes dans les génomes des caprins et des ovins (Figure 8), sauvages et domestiques (3, 77-79). Vingtsept séquences enJSRV sont présentes dans le génome du mouton, la plupart étant défectifs pour la réplication et la production de protéines virales à cause de mutation, d'insertion ou de délétion (80). Les séquences déduites en acides aminés des enJSRV sont hautement similaires à celle de JSRV avec un taux d'identité compris entre 90 et 98% (81). La partie la plus variable entre JSRV et enJSRV est la région codante pour Env, notamment la partie C-term du domaine transmembranaire (81). Si la plupart des enJSRV ne produisent plus de protéines virales, certaines copies sont encore fonctionnelles pour la production de protéines virales, comme la copie enJSRV56A1 (80). Les protéines produites par ces copies enJSRV peuvent induire une résistance vis-à-vis de JSRV exogène via différents phénomènes. Ainsi, il existe une interférence d'enveloppe à la surinfection entre JSRV et enJSRV : l'enveloppe endogène produite par enJSRV56A1 est en compétition avec l'enveloppe de JSRV exogène pour la fixation sur le récepteur HYAL2 (82). Les séquences enJSRV56A1 et enJSRV20 interfèrent également avec la forme exogène de JSRV en produisant une protéine endogène Gag transdominante négative qui bloque l'assemblage et le relargage des virions exogènes aux stades tardifs de l'infection (83, 84). Les protéines Gag produites par ces enJSRV sont mal formées à cause du remplacement



MPF2

Figure 8 : Localisation chromosomique des formes endogènes enJSRV chez le mouton. Les séquences enJSRV (vert) ont été détectées sur des chromosomes métaphasiques de cellules de mouton normales MPF2 (fibroblastes dérivés de poumons ovins fétaux) par hybridation *in situ* (3).

d'une arginine par un tryptophane en position 21 (W21) et interagissent avec les protéines Gag exogènes créant des dimères dégradés par la cellule (83-85). Le rôle de ces enJSRV « protecteurs » W21 dans les cancers pulmonaires ovins induits par JSRV est encore incertain. Cependant, l'expression de l'ARNm des enJSRV W21 dans les tissus pulmonaires tumoraux et les cellules AECII dérivées de tumeurs est nulle ou plus faible que dans les tissus ou cellules saines (86). Néanmoins l'implication des enJSRV W21 dans le développement du cancer n'est pas formellement montrée.

Les séquences enJSRV jouent un rôle dans la placentation chez les brebis (87). L'expression des copies de enJSRV dans le tractus génital des brebis est limitée à l'épithélium et est particulièrement importante dans l'endomètre utérin au cours du cycle menstruel et au cours de la gestation (88). Les enveloppes des enJSRV sont essentielles à la placentation par leur activité fusiogénique permettant la formation d'un syncytium entre les cellules du trophoblaste ou syncytiotrophoblaste, tissu embryonnaire permettant l'adhésion de l'embryon à la paroi utérine et plus tard les échanges entre le sang maternel et fœtal (88). *In vivo*, l'inhibition de l'expression des enveloppes des enJSRV entraîne un arrêt précoce de la gestation des brebis (89).

Il est possible de dater l'intégration des séquences enJSRV (i) directement avec l'âge de spéciation des espèces porteuses des enJSRV, (ii) indirectement en mesurant le degré de divergence entre les LTR des enJSRV et de JSRV exogène. Les enJSRV récents possèdent des LTR proches ou identiques à ceux de JSRV exogène tandis que les enJSRV anciens ont des séquences qui diffèrent d'autant plus qu'ils sont anciens (90). Certains enJSRV étant présents chez les ovins et les caprins, il a été possible de dater l'intégration de enJSRV dans le génome
de son hôte à environ 5 à 7 millions d'années, soit avant la spéciation ovins/caprins (91). D'autres enJSRV sont présents chez tous les ovins mais pas les caprins, datant leur intégration d'environ 3 millions d'années (91). D'autres enfin ne sont présents que chez certains individus comme enJSRV26 dont l'intégration a eu lieu il y a moins de 200 ans (91). Ces données démontrent que le processus d'endogénisation continue à l'heure actuelle (91, 92).

IV.2 JSRV induit un adénocarcinome pulmonaire

L'adénocarcinome pulmonaire ovin est un cancer contagieux de l'épithélium pulmonaire affectant les petits ruminants dont l'agent étiologique est le bétarétrovirus JSRV (93, 94). Cette maladie a été décrite au 19^{ème} siècle en Afrique du Sud. Son nom « Jaagsiekte » provient des mots afrikaners « jaag » et « siekte » signifiant respectivement « chasse » et « maladie ». En effet la maladie a en premier lieu été décrite comme une maladie liée à un effort ou un stress important, comme une poursuite. L'étiologie rétrovirale de la maladie a été suspectée à la suite d'observation de particules virales dans les poumons tumoraux et d'activité reverse transcriptase dans les sécrétions pulmonaires de moutons malades (95, 96). Le lien avec un virus a été confirmé par la reproduction de la maladie avec des injections intratrachéales de particules virales possédant une activité reverse transcriptase (97), de fraction cytoplasmique de cellules tumorales contenant des virions (98, 99) ou encore de sécrétions pulmonaires (100). La preuve irréfutable de l'étiologie virale de l'adénocarcinome ovin a été apportée par la reproduction de la maladie après l'inoculation à des agneaux d'un virus produit *in vitro* à partir d'un clone moléculaire (101) qui avait été isolé et caractérisé précédemment (102, 103).

Actuellement, l'adénocarcinome pulmonaire ovin est une maladie présente dans le monde entier excepté en Nouvelle-Zélande, en Australie et en Islande (94). En France, la maladie est retrouvée de façon endémique dans les régions géographiques liées à l'élevage laitier ovin telles que le Pays Basque, les Landes et l'Aveyron (données de laboratoire non publiées). Si la maladie reste la plupart du temps sporadique, elle peut aussi se déclarer sous forme épidémique comme ce fut le cas en Islande dans les années 1930 au cours de laquelle 30 à 50% des animaux des troupeaux touchés sont morts en 18 mois (104). L'incidence de la maladie est très difficile à estimer en raison de l'absence de test diagnostic et du faible nombre de pays collectant des données. Toutefois, le Royaume-Uni a montré qu'environ 0,2 à 0,65% des moutons soumis à des autopsies entre 1975 et 2008 ont été diagnostiqués positifs pour l'adénocarcinome pulmonaire ovin (94). Même si la prévalence de la maladie reste faible, la demande des professionnels de

la filière ovine pour la mise au point d'un test de dépistage dans les régions d'élevage laitier ovin est forte car il n'existe aucun test diagnostic commercialisé ni aucun traitement, ce qui peut entraîner des pertes économiques pour les éleveurs touchés. Pour l'anecdote, l'adénocarcinome pulmonaire ovin est responsable de l'euthanasie du premier mammifère cloné : la brebis Dolly qui avait développé des tumeurs pulmonaires induites par JSRV (105).

La transmission par voie aérienne du virus a été montrée expérimentalement par la propagation du virus entre animaux infectés et non infectés maintenus en contact (106). La transmission par le colostrum et le lait a été établie (107) ainsi que le passage mère-agneau *in utero* ou périnatal (106). La maladie a pu être éradiquée dans des troupeaux à forte prévalence où les agneaux étaient séparés de leur mère dès la naissance et nourris artificiellement (108).

La durée de l'incubation de la maladie est compliquée à établir car l'infection est asymptomatique ; on peut toutefois la fixer de quelques mois à quelques années (94). Elle varie en fonction du type d'infection (naturelle vs expérimentale) et de l'âge de l'animal. Les tumeurs apparaissent plus rapidement lors d'infections expérimentales et chez des animaux jeunes (109). Chez de jeunes agneaux infectés expérimentalement par inoculation intratrachéale de broyats tumoraux les tumeurs apparaissent en 3 à 6 semaines (101). L'évolution rapide de la maladie chez les animaux jeunes pourrait être le signe d'une susceptibilité accrue du poumon en cours de développement (106).

JSRV induit un adénocarcinome pulmonaire pour lequel il n'existe pas de symptôme pathognomique. Les symptômes associent un essoufflement à l'effort, un amaigrissement et, de façon inconstante, une bronchorrhée caractérisée par une évacuation *via* les naseaux de



Figure 9 : Evacuation de sécrétions pulmonaires par un mouton diagnostiqué pour l'adénocarcinome pulmonaire ovin. Le maintien de la tête en position abaissée favorise les écoulements nasaux.

sécrétions pulmonaires (Figure 9) chargées de particules virales (110), entraînant une insuffisance respiratoire progressive (93). Le diagnostic clinique de l'adénocarcinome ovin est souvent tardif car la bronchorrhée caractéristique du cancer n'apparaît qu'en phase terminale.

Histopathologie des lésions tumorales

Macroscopiquement, les lésions tumorales induites par JSRV correspondent à des nodules grisâtres, granuleux, d'une taille variant entre 1 et 30 mm (111) (Figure 10). Les métastases systémiques sont très rares. Histopathologiquement, les adénocarcinomes pulmonaire induits par



Figure 10 : Aspect radiologique, macroscopique et microscopique des lésions tumorales au cours de l'adénocarcinome pulmonaire induit par JSRV. A : Présentation radiologique montrant la répartition pneumonique des lésions désignées par des flèches rouges. B : Lobe pulmonaire présentant de multiples nodules tumoraux ► . C/D : Immunodétection de la protéine C du surfactant (vert), spécifique des AECII, sur coupe de tissu pulmonaire ovin sain (C) ou tumoral (D) montrant la prolifération des cellules tumorales le long des parois alvéolaires. Les noyaux ont été marqués au DAPI (bleu). LA : lumière alvéolaire.

JSRV sont définis par des lésions majoritairement lépidiques (Figure 10), c'est-à-dire dues à la prolifération des cellules cancéreuses le long des parois alvéolaires, sans destruction de cellesci, sans invasion stromale, pleurale ou vasculaire

Les cellules impliquées dans le développement de l'adénocarcinome induit par JSRV sont des cellules épithéliales des bronchioles et des alvéoles, respectivement les cellules Club et les cellules alvéolaires épithéliales de type II ou AECII (67, 68, 109) (Figures 10 et 11). Les AECII sont des cellules épithéliales cuboïdales sources du surfactant alvéolaire (Figures 10 et 11), elles sécrètent les phospholipides constitutifs du surfactant ainsi que les protéines SP-A, SP-B, SP-C et SP-D (112). Le surfactant a un rôle fondamental dans le fonctionnement des alvéoles : ce composé tensio-actif empêche les alvéoles de se collaber, diminue la tension de surface ce qui facilite la dilatation de l'alvéole lors d'une inspiration, protège les cellules de la dessiccation et des effets délétères de l'oxygène et a des propriétés antimicrobiennes (113). Les AECII sont également capables de se différencier en cellules alvéolaires épithéliales de type 1 (AECI) pour régénérer l'épithélium alvéolaire (114, 115). Les cellules Club sont des cellules sécrétrices non ciliées de la bronchiole (Figure 11). Leur principale fonction est de protéger l'épithélium bronchiolaire par leurs sécrétions ; elles interviennent aussi dans le processus de détoxification du poumon profond, dans le transport des ions et de fluides dans les voies aériennes distales



Figure 11 : Représentation schématique de l'arbre pulmonaire. Les cellules Club sont situées dans les bronchioles et les cellules alvéolaires épithéliales de type 2 (AECII) dans les alvéoles.

(115, 116). Plus récemment, il a été montré que ces cellules avaient des capacités de renouvellement et de réparation de l'épithélium pulmonaire des bronchioles (116). Elles sécrètent également des protéines du surfactant alvéolaire : SP-A, pro-SPB et SP-D (117).

IV.3 L'enveloppe de JSRV induit la transformation cellulaire

Le pouvoir oncogène de JSRV est porté par son enveloppe Env. L'expression de Env est nécessaire et suffisante pour induire la transformation cellulaire *in vitro et in vivo* (pour revue (5)). La propriété transformante de Env a été montrée *in vitro* dans des lignées cellulaires transfectées avec un vecteur d'expression de Env comme les fibroblastes murins NIH3T3 (118), les fibroblastes de rat 208F (119), les cellules bronchiques épithéliales humaines BEAS-2B (120), les cellules épithéliales rénales de rat RK3E (121) et les cellules épithéliales rénales de chien MDCK (122). Le pouvoir oncogène de l'enveloppe de JSRV a également été montré *in vivo* par l'induction de tumeurs chez la souris immunodéficiente (123) ou non (124) et le mouton infecté par un vecteur viral non réplicatif portant Env sous le contrôle du LTR de JSRV (16). L'enveloppe de ENTV est également oncogène : elle est capable de transformer *in vitro* des fibroblastes murins NIH3T3 et 208F (59, 125, 126), les cellules épithéliales bronchiques humaines BEAS-2B et les cellules épithéliales rénales de chien MDCK (122). Comme celle de JSRV, l'enveloppe de ENTV est capable d'induire des tumeurs *in vivo* chez la souris (123).

Le domaine intracytoplasmique du domaine transmembranaire TM est essentiel pour la transformation par l'enveloppe de JSRV comme cela a été montré par des expériences de délétions ou de mutations conduisant à une abolition de la transformation (119, 127-131). Outre la région TM, la glycoprotéine de surface SU joue un rôle dans la transformation par l'enveloppe de JSRV. En effet, la transformation cellulaire induite par Env de JSRV est abolie par des délétions ou insertions dans la région codante de SU dans les fibroblastes NIH3T3 et 208F (119) et par l'insertion de la région SU du JSRV endogène (non transformante) dans JSRV exogène lors la transformation par Env dans les fibroblastes NIH3T3 (129). Le domaine SU joue un rôle dans la transformation *via* son interaction avec le récepteur cellulaire HYAL2 comme cela a été montré dans les cellules épithéliales humaines bronchiques BEAS-2B (120). Dans ces cellules, la fixation de SU sur HYAL2 provoque la libération du récepteur tyrosine kinase RON (Récepteur d'Origine Nantais) qui active à son tour les voies de prolifération cellulaire PI3K/Akt et MAPK (120) ; à l'inverse, en condition normale, RON est séquestré par HYAL2 et son activité est faible.

Le rôle de HYAL2 dans la transformation est toutefois peu clair et semble être dépendant du type cellulaire. Dans la lignée de cellules épithéliales de rat IEC18, la transformation est induite par Env de JSRV mais est indépendante de HYAL2 et de RON (132).

Le domaine intracytoplasmique CT de l'enveloppe de JSRV contient un domaine YXXM. Lorsque la tyrosine (Y) est phosphorylée, YXXM est connu comme étant un site de fixation pour la sous-unité régulatrice p85 de PI3K, kinase activatrice de la voie de signalisation Akt essentielle pour la régulation de la prolifération et de la survie cellulaire. Le domaine YXXM est conservé entre les enveloppes de JSRV et ENTV mais absent des séquences endogènes enJSRV non transformantes (81). La mutation de la tyrosine en phénylalanine ou acide aspartique abolit la transformation des fibroblastes murins NIH3T3 (119, 129) alors que des mutations ou la suppression de YXXM n'affecte pas (ou peu) la transformation des fibroblastes aviaires (127), des fibroblastes murins (130) ou des cellules épithéliales canines MDCK (122, 133). *In vitro*, le rôle du site consensus YXXM de l'enveloppe de JSRV est donc dépendant du type cellulaire.

La voie Akt est impliquée dans la transformation induite par Env...

La voie Akt est activée *in vitro* dans de nombreuses lignées cellulaires transformées par l'enveloppe de JSRV (pour revue (5)) (Figure 12). La voie Akt est également activée lors de la transformation par l'enveloppe d'ENTV dans les lignées cellulaires fibroblastiques NIH3T3 et 208F (125) ainsi que dans les cellules épithéliales MDCK (122). *Ex vivo*, la voie Akt est activée dans les AECII dérivées de tumeurs ovines (134) (Figure 12) et n'est plus dépendante de l'EGF, un des inducteurs de cette voie de signalisation (134). *In vivo*, Akt est phosphorylé dans 37% des tumeurs induites par JSRV (134). L'inhibition de mTOR, un effecteur d'Akt, par la rapamycine inhibe partiellement la transformation dans les cellules NIH3T3 (121). Toutes ces données suggèrent que, si la voie Akt est fortement impliquée dans la transformation induite par JSRV, elle n'est certainement pas la seule voie impliquée dans le processus complexe d'oncogénèse.

Même si les différentes études *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* pointent Akt comme l'un des acteurs de la transformation induite par JSRV et par ENTV, le rôle de la présence du site consensus YXXM des enveloppes de JSRV et de ENTV dans l'activation d'Akt n'est pas clairement établi. La mutation du site YXXM de l'enveloppe de JSRV n'abolit ni la transformation dans de nombreuses lignées cellulaires (122, 126, 127, 133), ni la phosphorylation d'Akt dans les cellules transformées (122, 130, 135). De plus, la phosphorylation de la tyrosine Y de YXXM de

l'enveloppe de JSRV, nécessaire à l'interaction avec PI3K, n'a jamais été mise en évidence dans les cellules transformées par l'enveloppe de JSRV (130). La mutation du site YXXM de l'enveloppe de ENTV n'altère pas la transformation des cellules de lignée MDCK par l'enveloppe de ENTV (122).Toutes ces données mettent en évidence une activation d'Akt indépendante de YXXM chez JSRV et ENTV.

Le rôle de PI3K dans l'activation d'Akt est lui aussi incertain. Alors que dans les fibroblastes NIH3T3 traités par un inhibiteur de PI3K, la phosphorylation d'Akt diminue suggérant une activation d'Akt PI3K-dépendante (121, 130, 135, 136), l'inhibition de PI3K n'abolit pas la transformation des cellules par l'enveloppe de JSRV. Ces résultats suggèrent l'existence d'une autre voie d'activation d'Akt indépendante de PI3K lors de la transformation par l'enveloppe de JSRV (121). L'hypothèse de l'existence d'une voie d'activation d'Akt indépendante une activation d'Akt dans les fibroblastes murins NIH3T3 transformés par l'enveloppe de JSRV déficients pour la sous-unité p85 de PI3K.



Figure 12 : Evènements intracellulaires liés à la transformation induite par Env de JSRV. L'enveloppe de JSRV active plusieurs voies impliquées dans le contrôle de la prolifération cellulaire dont la voie MAPK et la voie Akt. L'activation de ces voies est dépendante des types cellulaires.

Une activation de la télomérase a été mise en évidence dans les AECII primaires dérivées de tumeurs et dans les tissus tumoraux (134) (Figure 12). La télomérase est un complexe ribonucléoprotéique jouant un rôle essentiel dans le contrôle de la sénescence cellulaire. L'activation de la télomérase, en permettant l'allongement des télomères, inhibe la mort cellulaire (137). L'activation de la télomérase *in vivo* dans les tumeurs induites par JSRV et *ex vivo* dans les cellules primaires tumorales suggère une inhibition de la sénescence réplicative, largement impliquée dans la prolifération cellulaire incontrôlée dans les cancers (137).

✤ …, la voie MAPK également

La voie Ras/MEK/MAPK (Ras/ Mitogen Extracellular regulated Kinase/ Mitogen Activated Protein Kinase) est également impliquée dans la transformation induite par l'enveloppe de JSRV (121) (Figure 12). Cette voie de signalisation cellulaire est composée de serine/thréonine kinases appartenant à 4 sous-familles : (i) ERK1/2 (Extracellular signal-Regulated Kinase), appelée aussi p44/42, (ii) SAPK/JNK1, 2 et 3 (Stress-Activated Protein Linase/c-Jun NH₂-terminal Kinase), (iii) p38 MAPKs et (iiii) BMK1/ERK5 (Big Mitogen-activated protein Kinase 1/ Extracellular signal-Regulated Kinase 5). L'activation de Ras induit l'activation par phosphorylation des MAPKKK (MAPK Kinase Kinase), telle que Raf, qui phosphorylent à leur tour les MAPKK (MAPK Kinase), tels que MEK1/2, qui vont phosphoryler les MAPK (138). Lorsque la voie MAPK est activée, il en résulte une translocation des MAPK dans le noyau où elles sont phosphorylées et où elles activent des facteurs de transcription cibles impliqués dans la prolifération, la différenciation et l'apoptose (138). L'activation constitutive de la voie Ras-Raf-MEK-ERK1/2 participe au développement de nombreux cancers viro-induits ou non (139, 140). Cette voie est impliquée dans la transformation induite par JSRV in vitro de lignées cellulaires de fibroblastes NIH3T3 (121, 128) et de cellules épithéliales RK3E (121) (Figure 12). Cependant, si l'inhibiteur de MEK1/2 PD98059 abolit la transformation par Env de JSRV dans ces deux lignées, l'inhibiteur de Ras, FTI-277, n'abolit pas complètement la transformation dans les cellules RK3E suggérant que l'activation de MEK dans les cellules épithéliales est indépendante de Ras (121). La phosphorylation de ERK1/2 a été détectée dans des tumeurs d'adénocarcinomes pulmonaires naturelles ou induites expérimentalement (141). En revanche, la voie MAPK n'est pas activée dans les AECII primaires dérivées de tumeur (Leroux et al., données non publiées).

✤ Objectif

Même s'il est maintenant établi que les voies Akt et MAPK sont impliquées dans la transformation induite par l'enveloppe de JSRV (Figure 12), les étapes initiales menant à l'activation de ces voies sont encore peu connues. Dans ce contexte, mon travail a consisté à analyser les étapes initiales de la transformation et à caractériser les protéines cellulaires permettant la dérégulation de la voie Akt.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

I. Rôle des complexes entre la protéine cellulaire RALBP1 et les enveloppes de bétarétrovirus oncogènes dans la transformation cellulaire

fin de mieux comprendre les étapes précoces de la transformation induite par l'enveloppe de JSRV menant à l'activation des voies de prolifération Akt et/ou MAPK, nous avons identifié des partenaires cellulaires de plusieurs cadres de lecture de JSRV. Cette recherche a été effectuée lors d'un crible double hybride en levure entre la région intracytoplasmique CT de la glycoprotéine transmembranaire TM de l'enveloppe de JSRV et une banque de rate humaine. Le crible double hybride a été effectué en amont de mon travail de thèse dans le cadre du projet IMap (Infectious Mapping) en collaboration avec le Pr C. Rabourdin Combe et le Dr V. Lotteau (U1111/UMR5308 Inserm-CNRS-UCBL-ENS, Lyon) et avait pour but d'identifier des partenaires cellulaires de plusieurs cadres de lecture de JSRV. Plusieurs protéines impliquées dans des voies de contrôle de la prolifération cellulaire et des protéines du cytosquelette ont été identifiées comme partenaires potentiels de CT : RALBP1 (Ral A Binding Protein 1), LMNA (Lamine A), TRIM23 (Tripartite Motif containing 23), MCRS1 (Microspherule protein 1) et LRRC48 (Leucine Rich Repeat Containing 48). Mon travail de recherche a eu comme objectif d'analyser le rôle des complexes protéigues RALBP1/Enveloppe de JSRV dans la transformation cellulaire induite par l'enveloppe virale et dans la dérégulation de la voie de signalisation cellulaire Akt/mTOR/p70S6K, in vitro, ex vivo et in vivo.

I.1 Etat de l'art

✤ RALBP1, effecteur important de la voie de signalisation cellulaire Ras

La voie Ras contient 3 voies principales : la voie des MAPK, la voie Akt-mTOR et la voie RalGDS (Ras Guanine-nucleotide-Dissociation Stimulator) dont font partie les protéines RalGTPases RalA et RalB et un de leurs effecteurs, RALBP1. RALBP1 ou RLIP76 (Ralinteracting protein 76KDa) possède un domaine de fixation avec les RalGTPases RalA et RalB, RBD (Ral Binding Domain), un domaine Rho-GAP capable d'interagir avec les protéines Rho telle que CDC42 et, en partie N-TER, un domaine « *Antennapedia homeodomain homologous peptides* » permettant la translocation de composés à travers la membrane (142). C'est également dans la partie N-TER que se trouve le domaine d'ancrage à la membrane (142). Comme les autres GTPases, RalA et RalB sont activées lorsqu'elles sont liées à un GTP et inactives en liaison avec un GDP (Figure 13). Lorsque Ras est activé, des protéines RalGEF (Ral Guanine-nucleotide Exchange Factor) se fixent sur les protéines RalA et RalB provoquant leur activation par un remplacement du GDP par un GTP. RalA et RalB activées se fixent sur RALBP1 et l'activent (143). RALBP1 est localisé à la membrane grâce à son domaine d'ancrage à la membrane ou lorsqu'il est recruté par les protéines RAL activées. RALBP1 est également localisé dans le cytosquelette *via* son interaction avec CDC42 et dans les mitochondries lorsqu'il est recruté par RalA activé. Une fois activé, RALBP1 interagit avec de nombreux effecteurs, d'où son implication dans de multiples événements cellulaires (Figure 13) :

- L'endocytose médiée par les clathrines
- Le transport de composés pro-apoptotiques
- La réponse au stress
- La fission mitochondriale
- S La dynamique du cytosquelette d'actine



Figure 13 : Mécanismes cellulaires associés à RALBP1.

• RALBP1 et endocytose médiée par les clathrines

Lorsque RalB est activé, il forme un complexe avec RALBP1 qui à son tour se fixe avec le complexe AP2 (Adapter Protein-2). En assurant la liaison avec les parties intracytoplasmiques des récepteurs de molécules à internaliser par endocytose et les clathrines, AP2 induit l'endocytose médiée par les clathrines de nombreux récepteurs dont l'EGFR. L'interaction entre AP2 et RALBP1 empêche l'interaction AP2/récepteurs et inhibe l'endocytose médiée par les clathrines (Figure 13) (144). RALBP1 se lie à RESP1 et RESP2 (RALBP1 associated Eps domain containing 1/2) (145) et à l'Epsin (146). RALBP1, RESP2, Epsin et AP2 forment un complexe qui, lorsque les protéines sont phosphorylées, se désagrège entraînant l'arrêt de l'endocytose durant la mitose (Figure 13) (147). La phosphorylation du complexe est effectuée par la kinase CDK1 (Cycline-Dependent Kinase 1) et est dépendante de RALBP1, qui sert de squelette au complexe et de lien avec CDK1 (Figure 13) (148).

Q RALBP1 et transport membranaire

RALBP1 est un transporteur membranaire ATP-dépendant (149) dont les substrats privilégiés sont les ions glutathions électrophiles ou GS-E (Glutathione-Electrophile conjugates) proapoptotiques produits lors de stress (150) (Figure 13). Les ions GS-E sont générés durant le stress oxydatif et dérivent des alcènes lipidiques électrophiles tels que les 4-HNE (4-Hyroxynonenal) (151), dont RALBP1 assure également le transport hors de la cellule (Figure 13) (152). La déplétion de RALBP1 diminue le transport des ions glutathions aboutissant à l'apoptose induite par leur accumulation (153). RALBP1 est un transporteur à structure non conventionnelle, n'appartenant ni à la famille des transporteurs ABC (ATP Binding Cassette), ni à celle des transporteurs SLC (SoLute Carrier) (149). RALBP1 est un transporteur actif primaire ATP dépendant possédant 3 sites de fixation aux GSE en positions S234, K237 et K244 (149). La formation de complexes entre RALBP1 et ses effecteurs régule négativement sa fonction de RALBP1 de la membranaire. Ainsi la fixation à CDC42 et à CDK1 provoque une dissociation de RALBP1 de la membrane plasmique pour le transférer dans les fuseaux mitotiques (148, 154). La fixation avec HSP90 (Heat Shock 90kDa Protein) et Hsf-1 (Heat Shock Factor-1), ou la surexpression de RESP2 provoquent un blocage de l'activité de transport de RALBP1 (149, 155).

RALBP1 et réponse au stress

En conditions normales, RALBP1 forme un complexe avec Hsf-1, la tubuline, HSP90 (Heat Shock 90kDa Protein) et Ral (149, 156) (Figure 13). Lors d'un stress oxydatif, l'activation de RALBP1 par les protéines RalA et RalB ainsi que la dissociation d'HSP90 du complexe favorisent la migration d'Hsf-1 vers le noyau où il active la transcription de nombreuses protéines HSP (Heat Shock Protein) permettant l'adaptation de la cellule au stress auquel elle est soumise (156). L'interaction entre RALBP1 et les protéines Ral entraîne la dissociation de RALBP1 du complexe permettant la libération de Hsf-1. Le niveau de transcrits des protéines HSP est considérablement augmenté dans des souris déficientes pour RALBP1 (157).

RALBP1 et mitose

L'activation de RalA par la kinase Aurora A entraîne sa translocation dans les mitochondries où RalA recrute RALBP1 (158). Une fois localisé dans les mitochondries, RALBP1 recrute la protéine Drp1 (Dynamin-related protein 1) (Figure 13) et permet la phosphorylation de Drp1 par CDK1 ce qui aboutit à la fission mitochondriale durant la mitose (159).

RALBP1 et cytosquelette d'actine

RALBP1 régule la dynamique du cytosquelette d'actine (160) en se fixant par son domaine RhoGAP à CDC42, une protéine centrale dans l'organisation du cytosquelette d'actine (Figure 13). Le domaine RhoGAP de RALBP1 catalyse l'hydrolyse du GTP lié à CDC42 et l'inactive (161).

O RALBP1 et cancers

RALBP1 et ses activateurs RalA et RalB sont impliqués dans la transformation cellulaire et dans de nombreux cancers. L'activation de Ral est un facteur oncogénique contribuant à la transformation cellulaire (162). L'inhibition de l'expression du gène *ralA* entraîne une réduction significative de la prolifération des cellules cancéreuses par augmentation de l'apoptose et la réduction de l'angiogenèse (143), ainsi qu'une réduction de la taille des tumeurs pulmonaires *in vivo* chez la souris (143). RalA est surexprimé dans le cancer du poumon et dans les cellules souches cancéreuses (143). RALBP1 est quant à lui surexprimé dans de nombreux cancers dont les mélanomes, les cancers du côlon, du foie, des ovaires, de la prostate ou du poumon (157, 163-165) dans lesquels il protège les cellules cancéreuses de l'apoptose notamment grâce à l'efflux des substances pro-apoptotiques. Dans les lignées cellulaires issues de ces cancers,

l'abolition de l'expression de RALBP1 par des siRNA ou le blocage de son rôle de transporteur par la fixation d'anticorps induisent une cytotoxicité (157, 163-165). *In vivo*, la déplétion de RALBP1 chez la souris conduit à la régression de tumeurs du poumon, du colon (165), de la prostate (163), du foie (164) et des mélanomes (157). Enfin, en tant que transporteur capable de créer un efflux des composés et des métabolites cytotoxiques hors des cellules cancéreuses, RALBP1 est impliqué dans la résistance aux médicaments anti-cancéreux (166).

A retenir sur RALBP1 :

- protéine cellulaire ubiquitaire de la famille des RalGTPases.
- sous contrôle des protéines RalA et RalB, activées par Ras.
- Rôles multiples dans :
 - endocytose médiée par les clathrines
 - cytosquelette d'actine
 - apoptose
 - fission mitochondriale
 - réponse au stress
- surexpression dans les cancers, notamment du poumon

RALBP1 participe au contrôle de la voie Akt/mTOR/p70S6K impliquée dans la prolifération cellulaire

✓ Akt

Akt est une sérine/thréonine kinase au cœur de nombreuses voies de signalisation intracellulaire essentielles dans la survie, la croissance, la progression du cycle cellulaire, la migration, la polarité ou encore le métabolisme cellulaires. Akt possède un domaine pleckstrine PH (Pleckstrine Homology) dans sa partie N-terminale et un domaine hydrophobe HM (Hydrophobic Motif) dans sa partie C-terminale.

Akt est activé *via* une voie de récepteurs tyrosine kinase. En l'absence de stimulation par des facteurs de croissance, la kinase Akt est catalytiquement inactive. La stimulation par les facteurs de croissance entraîne l'activation de la kinase PI3K qui est un hétérodimère comprenant une unité régulatrice p85 et une unité catalytique p110. Quand PI3K est activée, elle phosphoryle PIP2 (Phosphatidylinositol-4,5-diphopshate) qui se convertit en PIP3 (Phosphatidylinositol-3,4,5-triphopshate) à la membrane cellulaire et recrute plusieurs molécules dont Akt en se fixant à son

domaine PH (Figure 14). L'interaction avec PIP3 induit des changements conformationnels d'Akt exposant deux sites de phosphorylation : Thr308 dans son domaine kinase et Ser473 dans son domaine HM C-terminal (Figure 14). Une homodimérisation entre les domaines PH d'Akt et de la kinase membranaire PDK1 se produit entraînant l'activation d'Akt par la phosphorylation de la Thr308 par PDK1 et de la Ser473 par la kinase mTORC2 (Figure 14) (167, 168). Les deux phosphorylations sont nécessaires et suffisantes pour une activation pleine et entière d'Akt (169, 170). Après activation, Akt est transloqué dans le noyau où il interagit avec ses substrats. Il existe également une activation d'Akt indépendante de PI3K par phosphorylation aux sites Ser124 et Thr450 observée dans des cellules déprivées en sérum (169).



Figure 14 : la voie Akt/mTOR/S6K active la prolifération cellulaire. Les étoiles sont situées sur les protéines étudiées durant ma thèse.

L'activation aberrante d'Akt est impliquée dans de nombreux cancers (41, 171) et peut être liée à (i) une mutation ou une surexpression des récepteurs aux facteurs de croissance, de Ras ou de PI3K (172); (ii) une perte de la fonction et/ou à la baisse de l'expression de la phosphatase 3' qui convertit PIP3 en PIP2 (172) ; (iii) une mutation ou une surexpression d'Akt lui-même (41) (iiii) une mutation de la phosphatase PHLPP (PH domain and Leucin rich repeat Protein Phosphatases) spécifique de la sérine 473 (173).

✓ mTOR

La phosphorylation par Akt d'une centaine de substrats entraîne leur activation ou leur inhibition, un changement de leur stabilité ou de leur localisation ; ce qui impacte sur la survie et/ou la croissance cellulaires (pour revue (174)). La sérine-thréonine kinase mTOR (Mammalian Target of Rapamycin), membre de la famille des kinases « PI3K-like », est un effecteur de première importance. Elle est au centre de nombreuses cascades de signalisation cellulaire qui coordonnent la croissance et la division cellulaire en réponse aux facteurs de croissance, aux nutriments et à l'énergie cellulaire. La dérégulation de mTOR est impliquée dans de nombreuses canservés au cours de l'évolution et distincts par leurs composants, leurs effecteurs et leur sensibilité à la rapamycine : mTORC1 et mTORC2, respectivement sensible et insensible à la rapamycine (Figure 14) (168, 177). La phosphorylation de mTOR varie selon son appartenance à mTORC1 ou mTORC2. Associée à mTORC1, mTOR est phosphorylée sur la Ser2448 alors qu'associée à mTORC2, mTOR est phosphorylée sur la Ser2481 (178).

Le complexe mTORC1 est un effecteur d'Akt composé de la sous unité catalytique mTOR, du régulateur RAPTOR (Regulatory-Associated Protein of mTOR) et de mLST8 (mammalian Lethal with SEC13 protein 8) (Figure 14). En présence de nutriments et/ou de facteurs de croissance, Akt est activé et phosphoryle (i) le complexe TSC2 (Tuberous Sclerosis Complex-2) inhibant son activité GTPase envers l'activateur de mTOR, RHEB (Ras Homolog Enriched in Brain) (179) (Figure 14) ; (ii) PRAS40 (Proline-Rich Akt Substrate 40 kDa), un inhibiteur de l'activité kinase de mTORC1 (Figure 14) (180, 181). RHEB-GTP active mTORC1 et déplace son inhibiteur PRAS40 de RAPTOR. La protéine mLST8 stabilise le complexe RAPTOR/mTOR lors de la présence de nutriments et permet ainsi une activation de mTOR (182).

RALBP1 est un régulateur négatif de mTORC1 *via* l'inactivation de CDC42. CDC42 active PLD1 (PhosphoLipase D1) induisant l'augmentation de la concentration d'acide phosphatidique intracellulaire (183) activant mTORC1 (184) (Figure 14).

L'activité de mTORC1 est également régulée par la concentration d'ATP (Adénosine Tri-Phosphate) cellulaire. Ainsi, la baisse de la concentration intracellulaire d'ATP entraine l'activation de la kinase AMPK (AMP-activated protein Kinase) qui inhibe l'activité de mTOR.

Le complexe mTORC2 est constitué de (i) la sous-unité catalytique mTOR, (ii) Rictor (Rapamycin-Insensitive Companion of mTOR) dictant la spécificité de mTORC2 pour Akt et contre p70S6K (185), (iii) mLST8 qui joue un rôle positif sur l'activité de mTORC2 (186), (iiii) mSin1 (Mammalian Stress activated protein kinase-INteracting protein 1) nécessaire à l'assemblage de mTORC2 (187) (Figure 14). La fonction principale de mTORC2 est de phosphoryler Akt sur la Ser473 (Figure 14) (188).

✓ p70S6K et 4E-BP1

La kinase p70S6K et le répresseur traductionnel 4E-BP1 (eiF4E-Binding Protein 1) sont les effecteurs principaux de mTORC1 (Figure 14). Ils régulent la biogénèse des ribosomes, la traduction des ARNm, la croissance cellulaire et l'autophagie (189). Leur phosphorylation est dépendante de leur domaine TOS (Tor signaling Sequence) qui se fixe à RAPTOR (190). Quand 4E-BP1 est hyperphosphorylée par mTOR, elle n'interagit plus avec le facteur d'initiation de traduction eucaryote eiF4E ce qui permet l'activation de la traduction des ARNm (Figure 14) (191). La kinase mTOR a également pour cible p70S6K qui active la croissance cellulaire en augmentant la traduction des ARNm (192, 193) codant uniquement pour des composants de la machinerie de traduction tels que les protéines ribosomales ou les facteurs d'élongation. La protéine p70S6K phosphoryle la protéine ribosomale S6 (Figure 14) qui active le recrutement des ARNm par les ribosomes (194) et le facteur d'élongation eiF4B, protéine requise pour le recrutement des ARNm par les ribosomes (195), augmentant ainsi la traduction des ARNm (Figure 14) (196).

RALBP1, en inactivant CDC42 (161), un des activateur de p70S6K (197), est un régulateur négatif de l'activité de p70S6K (Figure 14).

RALBP1 intervient-il dans la transformation induite par l'enveloppe de JSRV ?

Un crible double hydride a permis d'identifier RALBP1 comme un interactant cellulaire de l'enveloppe de JSRV. Le but de mon travail été de confirmer l'interaction entre RALBP1 et l'enveloppe de JSRV puis d'étudier le rôle des complexes RALBP1/Env dans la transformation induite par l'enveloppe virale. Etant donné la participation de RALBP1 dans la régulation de la voie Akt/mTOR/p70S6K et les preuves de l'implication de cette voie de signalisation dans la transformation cellulaire induite par JSRV (pour revue (5)), j'ai également étudié le rôle de RALPB1 dans l'activation de la voie Akt/mTOR/p70S6K par l'enveloppe de JSRV.

I.2 Les étapes précoces de la transformation induite par JSRV impliquent l'interaction entre l'enveloppe virale et la protéine cellulaire RALBP1

Un crible double hydride en levure a permis d'identifier RALBP1 comme un interactant de la partie CT de l'enveloppe de JSRV. L'objectif de mon travail a été dans un premier temps de valider cette interaction puis de définir le rôle des complexes protéiques RALBP1/Env dans la transformation. La modulation de l'expression de RALBP1 par l'enveloppe virale et l'implication de RALBP1 dans l'activation de la voie Akt/mTOR/p70S6K par l'enveloppe ont été étudiées. L'originalité de ce travail réside dans l'identification des différents acteurs *in vitro* dans les cellules de la lignée MDCK sensibles à la transformation par Env de JSRV, *ex vivo* dans des cellules AECII dérivées de tumeurs induites par JSRV et *in vivo* dans les tumeurs. Les principaux résultats sont reportés ci-dessous. Les analyses détaillés sont disponibles dans l'article publié disponible page 41.

Grâce à de expériences d'immunoprécipitation et de Proximity Ligation Assay (PLA), l'interaction entre RALBP1 et l'enveloppe de JSRV a été confirmée *in cellulo* dans des cellules MDCK exprimant naturellement RALBP1 et surexprimant Env (Figure 15). Un immunomarquage a montré la co-localisation de RALBP1 et de l'enveloppe de JSRV dans le cytoplasme et à la membrane des cellules MDCK (198).



Figure 15 : RALBP1 et Env de JSRV forment des complexes protéiques

in cellulo. Un proximity ligation assay (PLA) *in situ* a été effectué dans des cellules MDCK sur-exprimant l'enveloppe marquée par une étiquette Flag en C-ter. Des anticorps primaires anti-RALBP1, anti-Myc pour TRIM23 et anti-Flag pour Env ont été combinés avec des sondes PLA (Olink Bioscience). Les évènements d'interaction entre RALBP1 et Env sont visibles (points verts) dans le cytoplasme. Des contrôles négatifs ont été effectués dans les mêmes conditions avec des cellules MDCK n'exprimant pas Env ou exprimant TRIM23, dont on sait qu'il n'interagit pas avec l'enveloppe. Les noyaux ont été marqués au DAPI. X200.

Un test de transformation permettant la visualisation des évènements de transformation par la formation de sphères par les cellules MDCK cultivées en milieu semi-solide a été utilisé pour étudier la transformation induite par l'enveloppe de JSRV. En utilisant des siRNA éteignant spécifiquement l'expression de RALBP1 dans les cellules MDCK, nous avons mis en évidence le rôle des complexes Env/RALBP1 dans la transformation induite par l'enveloppe de JSRV (Figure 16). RALBP1 joue un double rôle dans la transformation induite par Env ; d'un côté l'inhibition de RALBP1 entraine la diminution de la taille des sphères suggérant que RALBP1 participe à la croissance des cellules transformées (Figure 16). D'un autre côté, l'inhibition de RALBP1 provoque une augmentation du nombre de sphères, suggérant que RALBP1 prévient la transformation cellulaire par l'enveloppe de JSRV (198).



Figure 16 : Les complexes RALBP1/Env sont impliqués dans la transformation induite par l'enveloppe de JSRV. Evolution durant 12 jours des sphères formées par les cellules MDCK transformées par l'enveloppe de JSRV après inhibition de l'expression de RALBP1 (par des siRNA spécifiques) ou dans des conditions contrôles (en absence de siRNA ou avec des siRNA contrôles « Scramble »). Les sphères sont indiquées par des " ▶ ".

Par une semi-quantification de l'expression protéique de RALBP1 dans des cellules MDCK exprimant ou non l'enveloppe, nous avons montré que l'expression de RALBP1 est réprimée *in vitro* par l'enveloppe rétrovirale de JSRV (198). Les mêmes expériences menées dans des tissus et des cellules AECII primaires ont également mis en évidence une sous-expression de RALBP1 *in vivo* dans les poumons tumoraux et *ex vivo* dans les AECII dérivées de tumeurs (198).

Par l'inhibition de l'expression de RALBP1 par des siRNA spécifiques, nous avons montré l'implication de RALBP1 dans l'activation par l'enveloppe de JSRV de la voie de prolifération cellulaire Akt/mTOR/p70S6K, notamment dans la phosphorylation de p70S6K (Figure 17).



Figure 17 : Implication de RALBP1 dans la modulation de la voie Akt/mTOR/p70S6K par l'enveloppe de JSRV. Des cellules MDCK ont été transfectées par Env JSRV en présence de siRNA éteignant RALBP1 ou de siRNA scramble. Après 48H, les protéines totales ont été analysées par Western Blot avec les anticorps adéquats. L'expression des protéines a été semiquantifiée par un ratio "protéine d'intérêt/β-actine" et a été exprimée en pourcentage par rapport aux cellules contrôles (transfectées avec des siRNA scramble). Test de Student, *: $p \le 0.05$; ***: $p \le 0.001$. ---- : niveau d'expression dans les cellules contrôles.

Nous avons mis en évidence l'interaction entre CDC42, un activateur de p70S6K dont l'activité est négativement régulée par RALBP1, et l'enveloppe de JSRV (Figure 18 A). Nous posons l'hypothèse que l'expression de l'enveloppe de JSRV induit une activation de CDC42 v*ia* la diminution de RALBP1, ce qui conduit à l'activation de p70S6K (Figure 18 B).



Figure 18 : CDC42 et Env de JSRV forment des complexes protéiques in cellulo. A : un PLA a été effectué dans des cellules MDCK sur-exprimant l'enveloppe de JSRV marquée par une étiquette Flag en C-ter. Des anticorps primaires anti-CDC42 et anti-Flag ont été combinés à des sondes secondaires PLA (Olink Bioscience). Les évènements d'interaction entre CDC42 et Env JSRV sont visibles (points verts) dans le cytoplasme. Les noyaux ont été marqués au DAPI. X200. B : Hypothèse pour la régulation de la voie Akt/mTOR/p70S6K par l'enveloppe de JSRV basée sur nos résultats. La voie dans les cellules normales (cases bleues) est décrite à gauche et les dérégulations observées lors de l'expression de Env JSRV sont décrites à droite. Les protéines sur-régulées sont indiquées dans des cases rouges et les sous-régulées dans les cases vertes.

Outre JSRV induisant des tumeurs pulmonaires, le bétarétrovirus ENTV apparenté à JSRV est responsable de la transformation de cellules épithéliales nasales chez les petits ruminants. Nous avons analysé l'interaction potentielle entre son enveloppe et RALBP1. Un PLA a été effectué sur des cellules MDCK sur-exprimant l'enveloppe d'ENTV. Nous avons montré que RALBP1 et l'enveloppe d'ENTV interagissent dans le cytoplasme de la cellule, plus particulièrement dans la zone péri-nucléaire (Figure 19).

Env ENTV



Figure 19 : RALBP1 et l'enveloppe de ENTV interagissent in cellulo. Un PLA a été effectué sur des cellules MDCK sur-exprimant l'enveloppe d'ENTV. Des anticorps anti-Env ENTV et anti-RALBP1 ont été combinés avec des sondes secondaires PLA (Olink Bioscience). Les interactions entre RALBP1 et env ENTV sont visibles par des points verts. Un contrôle négatif a été effectué sur des MDCK dans les mêmes conditions en l'absence de l'expression de l'enveloppe d'ENTV. Les noyaux ont été marqués au DAPI, X630.

Grâce à ces travaux, nous avons, pour la première fois, relié l'expression de l'enveloppe de JSRV et la dérégulation de la voie Akt/mTOR/p70S6K lors de la transformation cellulaire *via* la protéine cellulaire RALBP1. RALBP1 interagit avec l'enveloppe de JSRV *in cellulo* et est nécessaire à l'activation de mTOR et p70S6K par l'enveloppe virale. Nous avons également démontré que RALBP1 interagit avec l'enveloppe de ENTV, un bétarétrovirus oncogène apparenté à JSRV et responsable d'un adénocarcinome de l'épithélium nasal. Cela suggère que RALBP1 est une protéine intervenant dans la transformation des deux bétarétrovirus JSRV et ENTV. Afin de confirmer cette hypothèse, le rôle de RALBP1 dans la transformation par l'enveloppe de ENTV et la modulation de l'expression de RALBP1 par l'enveloppe de ENTV vont être étudiés.

Nous avons mis en évidence une baisse de l'expression protéique de RALBP1 en présence de l'enveloppe de JSRV *in vitro* mais également *in vivo* dans les tissus pulmonaires tumoraux et *ex vivo* dans les AECII tumorales. Ces résultats contrastent avec la surexpression de RALBP1 rapportée dans de nombreux cancers dont celui du poumon (pour revue (199)). La sous-expression de RALBP1 observée lors des adénocarcinomes pulmonaires induits par JSRV est peut être spécifique à ce cancer viro-induit et plus précisément semble être la conséquence de l'expression de l'enveloppe de JSRV.

+ Env

sans Env

Nos résultats confirment l'activation de la voie Akt/mTOR/p70S6K par l'enveloppe de JSRV *in vitro* et *ex vivo* dans les AECII, cellules cibles du virus, dérivées de tumeurs pulmonaires. Nos conclusions suggèrent une implication plus importante de mTOR et surtout de p70S6K que de Akt dans l'oncogénèse induite par JSRV, rejoignant ainsi Zavala *et al.* qui n'avaient pas détectés d'Akt phosphorylé dans les tissus tumoraux (135) et Suau *et al.* qui ne l'avait détecté que dans 1/3 des tumeurs analysées (134).

Nous avons montré que RALBP1 joue un double rôle dans la transformation cellulaire médiée par l'enveloppe de JSRV. D'un côté, le nombre d'évènements de transformation induits par l'enveloppe de JSRV est supérieur en l'absence de RALBP1, pouvant nous laisser supposer que l'enveloppe interfère avec RALBP1 et induit sa sous-expression afin d'augmenter sa capacité à induire la transformation. De l'autre, l'inhibition de RALBP1 entraine une diminution de la croissance des cellules transformées, peut être liée avec le rôle anti-apoptotique de RALBP1 permettant la prolifération des cellules cancéreuses (200).

Toutes ces informations ont permis de poser l'hypothèse selon laquelle la sous-expression de RALBP1 induite par l'expression d'Env de JSRV activerait CDC42 et conduirait ainsi à l'activation de p70S6K. CDC42 apparait donc comme une protéine clé dans les dérégulations induites par Env de JSRV. Cette petite RhoGTPase est connue pour être un acteur majeur de l'organisation dynamique du cytosquelette et de la polarisation lors de processus physiologiques divers dont la prolifération, la mobilité et la croissance cellulaires (201, 202). La deuxième partie de ma thèse a donc été orientée sur CDC42 et plus particulièrement sur l'impact de l'enveloppe de JSRV sur l'organisation du cytosquelette d'actine et la polarisation des cellules.



Early Steps of Jaagsiekte Sheep Retrovirus-Mediated Cell Transformation Involve the Interaction between Env and the RALBP1 Cellular Protein

Margaux Monot,^a Alexandra Erny,^a Barbara Gineys,^a Sophie Desloire,^a Christine Dolmazon,^a Anne Aublin-Gex,^b Vincent Lotteau,^b Fabienne Archer,^a Caroline Leroux^a

Université de Lyon, Université Lyon 1, INRA, UMR754, Retrovirus and Comparative Pathology, UMS 3444, SFR BioSciences,^a CIRI U1111, UMR5308, INSERM, CNRS, Université Lyon 1, ENS de Lyon, ^b Lyon, France

ABSTRACT

Ovine pulmonary adenocarcinoma is a naturally occurring lung cancer in sheep induced by the Jaagsiekte sheep retrovirus (JSRV). Its envelope glycoprotein (Env) carries oncogenic properties, and its expression is sufficient to induce in vitro cell transformation and in vivo lung adenocarcinoma. The identification of cellular partners of the JSRV envelope remains crucial for deciphering mechanisms leading to cell transformation. We initially identified RALBP1 (RalA binding protein 1; also known as RLIP76 or RIP), a cellular protein implicated in the ras pathway, as a partner of JSRV Env by yeast two-hybrid screening and confirmed formation of RALBP1/Env complexes in mammalian cells. Expression of the RALBP1 protein was repressed in tumoral lungs and in tumor-derived alveolar type II cells. Through its inhibition using specific small interfering RNA (siRNA), we showed that RALBP1 was involved in envelope-induced cell transformation and in modulation of the mTOR (mammalian target of rapamycin)/p7086K pathway by the retroviral envelope.

IMPORTANCE

JSRV-induced lung adenocarcinoma is of importance for the sheep industry. While the envelope has been reported as the oncogenic determinant of the virus, the cellular proteins directly interacting with Env are still not known. Our report on the formation of RALBP/Env complexes and the role of this interaction in cell transformation opens up a new hypothesis for the dysregulation observed upon virus infection in sheep.

vine pulmonary adenocarcinoma is a contagious tumor that originates from the distal lung upon infection by the Jaagsiekte sheep retrovirus (JSRV). It is now clearly established that JSRV induces tumors via the oncogenic properties of its envelope (1), which is necessary and sufficient to induce transformation (1-3). The oncogenic property of the JSRV envelope has been evidenced in various cell lines (reviewed in reference 4) and *in vivo* in mice (5, 6) and in sheep (7). Beside the transmembrane (TM)region, deletions of surface (SU) glycoproteins from the signal peptide to the junction between the SU and TM subunits can abolish the envelope glycoprotein (Env)-induced cell transformation (1). The cytoplasmic tail of TM is essential for cell transformation (8, 9). This region contains an YXXM motif (3) corresponding to a potential consensus site linked to the SH2 domain of the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), a kinase that activates the serine/threonine kinase Akt. The PI3K/Akt signaling pathway is essential in cell proliferation, survival, and metabolism (10, 11). Mechanisms potentially involved in tumor formation include extensive cell division as a result of oncogenic mutations, inactivation of cellular senescence, tumor suppressor pathways, or apoptosis mechanisms that may otherwise arrest proliferation or induce death of potential cancer cells (12). Telomerase activation is considered mandatory for tumor cells to escape cell senescence and to gain increased proliferative capacities (13). Complex regulation of telomerase activity may include the PI3K pathway through phosphorylation of telomerase reverse transcriptase (TERT) by Akt (14). Telomerase activity is significantly higher in ovine pulmonary adenocarcinomas compared to control lungs; this suggests that inhibition of cell senescence may

be involved in the tumoral process in sheep and in the accumulation of tumoral cells within the lung (15). The regulatory Akt kinase is constitutively activated in ovine tumors and deregulated in primary cultures derived from JSRV-induced cancers; therefore, Akt may be involved in telomerase activation in a proportion of tumors (15). Akt is constitutively activated in various human tumors, including lung cancer (16). In vitro experiments that mimic cellular transformation by JSRV Env expression have implicated Akt as well as Ras/MEK/MAPK (mitogen-activated protein kinase) pathways but in a cell-dependent manner (4, 17, 18).

While the role of the envelope in JSRV-mediated transformation is now well established, the early mechanisms that lead to initiation of cell transformation are still unknown. The importance of HYAL-2, the cellular receptor for ISRV (19), remains unclear and might be cell dependent; it plays no role in transfor-

Received 4 March 2015 Accepted 27 May 2015

Accepted manuscript posted online 3 June 2015

Citation Monot M, Erny A, Gineys B, Desloire S, Dolmazon C, Aublin-Gex A, Lotteau V, Archer F, Leroux C. 2015. Early steps of Jaagsiekte sheep retrovirusmediated cell transformation involve the interaction between Env and the RALBP1 cellular protein. J Virol 89:8462-8473. doi:10.1128/JVI.00590-15. Editor: S. R. Ross

Address correspondence to Caroline Leroux, caroline.leroux@univ-lyon1.fr. F.A. and C.L. contributed equally to this work.

Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved. doi:10.1128/JVI.00590-15

mation of murine cells, but human HYAL-2 suppresses envelopemediated transformation by increasing its degradation (20, 21). The identification of cellular partners of the JSRV envelope remains crucial for deciphering mechanisms that lead to cell transformation. We identified RALBP1 (<u>RalA binding protein 1</u>; also known as RLIP76 or RIP), a cellular protein implicated in the *ras* pathway and an effector of RalA (Ras-like protein A) (22), as a partner of the JSRV envelope by yeast two-hybrid screening and confirmed formation of RALBP1/Env complexes in mammalian cells. Through inhibition of RALBP1 expression using specific small interfering RNA (siRNA), we showed that the cellular protein is involved in envelope-induced cell transformation.

MATERIALS AND METHODS

Biological material. The tumor tissues used in this study were collected immediately postmortem from 10 sheep from milk farms with clinical signs suggestive of lung adenocarcinoma such as dyspnea, altered general status, and evacuation of mucoid fluid through the nostrils. The control lungs were collected from 12 lambs (~3 months of age) with no clinical signs of respiratory disease at the Corbas slaughterhouse (France). Formal authorization for access to the facility was obtained, and access was granted under the supervision of a veterinarian. None of the animals used in this study were engaged in an experimental protocol. Clinical status was confirmed by pathological examination (F. Thivolet-Béjui, Service d'Anatomopathologie Clinique, Louis Pradel Hospital, Lyon, France). The presence of JSRV in the tumors and its absence in healthy lungs was confirmed by detection of viral genome using seminested PCR. Briefly, DNA was extracted from lung tissues (Fast DNA kit; MP Biomedicals, France) as recommended. The PCRs were performed using 100 ng of DNA with 1× KAPA2G Robust HotStart Ready Mix 2× (Clinisciences, France), 0.2 µM each primer, and PCR-grade H₂O up to 25 µl. Primers specific to the exogenous form of JSRV were used, namely, JSRV-53 (5'-GGATTCTTACACAATCACC-3') in U3-LTR (long terminal repeat) and JSRV-98 (5'-GAGTTGAAATGCTGCATATG-3') in env for the first round (290 bp for the expected size of the amplicon) of amplification and JSRV-52 (5'-CACCGGATTCTTATATAATC-3') in U3-LTR and JSRV-98 for the second round (274 bp for the expected size of the amplicon). The initial denaturation step at 95°C for 2 min was followed by 35 cycles, with 1 cycle consisting of 10 s at 95°C, 10 s at 55°C, and 10 s at 72°C.

Ovine primary alveolar type II cells (AECIIs) were isolated from 10 tumors and 8 healthy lungs, phenotypically characterized and cultured as previously described (23). Briefly, cells were plated onto cell culture plates coated with type I and type IV collagens (Sigma) and fibronectin (Millipore) with Quantum 286 synthetic medium (PAA Laboratories, France) selective for epithelial cells complemented with 10 ng/ml human keratinocyte growth factor (KGF) (Abcys, France), 5 ng/ml human hepatocyte growth factor (HGF) (Abcys), 10 U/ml penicillin, and 10 μ g/ml streptomycin (PAA). The cells were grown at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. MDCK (Madin-Darby canine kidney) and HEK 293T (human embryonic kidney 293 with simian virus 40 [SV40] large T-antigen) cells were grown in complete Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (PAA) supplemented with 10% inactivated fetal calf serum (FCS), 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, and 1% nonessential amino acids (PAA) at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂.

Yeast two-hybrid screening for identification of cellular interactants of the cytoplasmic tail. The cytoplasmic tail (CT) domain sequence of JSRV Env, nucleotides (nt) 7063 to 7197 from the full-length sequence of the South African strain of JSRV (GenBank accession no. NC_001494.1; kindly provided by Gilles Quérat, Marseille, France) (24), was PCR amplified with KOD polymerase (Novagen) using *attB1.1* and *attB2.1* recombination sites, respectively, fused to forward and reverse primers. The amplified product was then cloned into pDONR207 (25) using Gateway BP clonase II enzyme mix (Invitrogen) as recommended. After sequencing, the sequence of the CT domain was transferred from pDONR207 into the bait vector (pPC97) using Gateway LR clonase II enzyme mix (Invitrogen) as recommended so that it would be expressed as Gal4-DB fusion in yeast. Bait vectors were introduced in *Saccharomyces cerevisiae* AH109 strain, and a human spleen activation domain (AD) cDNA library (Invitrogen) was screened by transformation as previously described (26). AD cDNAs were PCR amplified, and inserts were sequenced.

Generation of RALBP1 and Env expression plasmids. A RALBP1 expression plasmid carrying an N-terminal (N-ter) Myc-tagged RALBP1 (referred to as "N-ter Myc RALBP1" in this study) was generated using Gateway cloning technology (Invitrogen, USA) as recommended. Briefly, the complete open reading frame of human RALBP1 was amplified from the IRATp970B0836D clone (ImaGenes; GenBank accession no. NM_006788.3) using attB1.1 and attB2.1 recombination sites that were fused to forward and reverse primers, respectively. The ~2-kb amplified full-length RALBP1 was introduced into the pDON207 donor vector using Gateway BP clonase II enzyme mix (Invitrogen) and transferred by homologous recombination into the pCMV-myc destination vector (Invitrogen) using Gateway LR clonase II enzyme mix (Invitrogen). The resulting construct allowed expression of a 90-kDa myc-RALBP1 fusion protein with the complete amino acid sequence of the human RALBP1 fused in the N terminus with the myc epitope under the control of the cytomegalovirus (CMV) promoter. Similarly, a human TRIM23 (tripartite motif-containing protein 23) expression plasmid that carries an N-ter Myc-tagged TRIM23 (referred to "N-ter Myc TRIM23") was constructed from the complete cDNA (ImaGenes; GenBank accession no. NM_033227.2). The expression plasmid for the JSRV envelope fused to Flag in the C terminus (named "C-ter Flag Env" in this study; kindly provided by M. Palmarini, University of Glasgow Veterinary School, United Kingdom) produced an ~72-kDa fusion protein with a C-ter Flag tag under the control of the CMV promoter. The N-ter Flag TM expression plasmid, used solely for immunoprecipitation, was generated using the Gateway Cloning technology (Invitrogen) as recommended. Briefly, the complete open reading frame of JSRV TM (GenBank accession no. NC_001494.1; from nt 6484 to 7197) was introduced into the donor vector pDON207 using attB1.1 and attB2.1 recombination sites that were fused to forward and reverse primers, respectively, and transferred by homologous recombination into the pCI-Neo3XFlag destination vector (Invitrogen) for the expression of a 32-kDa N-ter Flag TM fusion protein. A plasmid named "v-mos" in this study (kindly provided by Hung Fan, Cancer Research Institute, University of California Irvine, USA) allowed expression of the v-mos oncogene. All plasmid DNAs were extracted with the Nucleobond Xtra Midi EF kit (Macherey-Nagel) as recommended and checked by digestion with the appropriate restriction enzymes.

Cell transfection. HEK 293T cells were transfected with N-ter myc RALBP1 or N-ter Flag TM expression plasmid alone or concomitantly. After 24 h of incubation of six-well plates with 8×10^5 HEK 293T cells per well, cells were transfected with a mix of DNA and jetPEI (Polyplus Transfection SA). Briefly, jetPEI and DNA (between 1 and 5 µg per condition according to the plasmid used) were diluted in 150 mM NaCl and then were mixed and incubated at room temperature for 30 min. The DNAjetPEI mix was gently added to the cells, and transfected cells were grown at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ in DMEM supplemented with FCS. MDCK cells were transfected with the C-ter Flag Env, N-ter Myc TRIM23, or v-mos expression vector using the Neon transfection system kit (Invitrogen) and the MP100 Labtech Microporator (Life Technologies, USA) as recommended. Briefly, 5×10^5 cells were resuspended in R buffer (Invitrogen) at 37°C before the addition of 3 µg of the C-ter Flag Env, 3 µg of the N-ter Myc TRIM23, or 5 µg of the v-mos constructs. Transfected cells were grown at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO2 in complete DMEM. RALBP1 knockdown was realized using 25 pmol of a mix of three RALBP1-specific siRNAs targeting different parts of the human RALBP1 mRNA (Stealth siRNA duplexes; Invitrogen). Irrelevant siRNA (Stealth siRNA negative-control duplexes;

Invitrogen), referred to as "scramble siRNA" in this study, were designed to minimize sequence homology with the known vertebrate transcripts and were used as negative controls. The siRNAs were transfected into MDCK cells by electroporation as described above.

Immunoprecipitation of RALBP1/TM complexes in HEK 293T cells. Total proteins were extracted from HEK 293T cells cotransfected with N-ter Myc RALBP1 and N-ter Flag TM expression vectors. Fifty microliters of magnetic microbeads coated with G proteins (Miltenyi Biotech) was added to a mix of 2 µg of mouse anti-Myc antibodies (M4439; Sigma-Aldrich) or mouse anti-Flag antibodies (F3165; Sigma-Aldrich) for the reverse immunoprecipitation (IP), and 1 mg of total proteins diluted in 500 µl of lysis buffer (20 mM Tris HCl [pH 8], 10% glycerol, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 5 mM EDTA, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride [PMSF], and 10 µg/ml of aprotinin and leupeptin). After 30 min at 4°C, mixtures were loaded onto µMACS columns (Miltenyi Biotech) previously rinsed with 200 µl of lysis buffer and placed in a magnetic field using the µMACS separator (Miltenyi Biotech). The flowthrough was collected. After four washes with lysis buffer, columns were loaded with 20 µl of preheated loading buffer (50 mM Tris HCl [pH 6.8], 50 mM dithiothreitol [DTT], 1% SDS, 0.005% bromophenol blue, 10% glycerol). After 5-min incubation at room temperature, protein complexes were eluted with 50 µl of preheated loading buffer. The flowthrough and eluates were analyzed for detection of TM or RALBP1 using Western blot analysis.

Measurement of cell transformation by spheroid formation in soft agar. Twenty-four hours after transfection with C-ter Flag Env or v-mos expression plasmid and scramble siRNA or RALBP1-specific siRNA, the MDCK cells were detached and cultured in $10 \times$ CytoSelect agar matrix (Cell Biolabs) diluted in complete DMEM at 25×10^3 cells per well in 24-well plates. The cells were grown at 37° C, and the number and size of the spheroids formed were monitored daily for 12 days. Twenty-four hours after the cells were cultured in soft agar, we ensured that there were no cell clumps that could be mistaken for spheroids. All spheroids were measured with the Image J software (W. S. Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Cells transfected with C-ter Flag Env alone, v-mos alone, or nontransfected cells were used as controls. Each transformation experiment was performed in triplicate and repeated twice.

Analysis of mRNA expression of RALBP1, Env, and v-mos. RNA from MDCK cells transfected with C-ter Flag Env or v-mos expression plasmid and scramble siRNA or RALBP1-specific siRNA were extracted 48 h posttransfection and analyzed by reverse transcriptase PCR (RT-PCR) to confirm RALPB1, env, and v-mos mRNA expression during the transformation tests. Briefly, RNAs were extracted with the Pure Link RNA minikit (Life Technologies) as recommended; 500 ng of total RNAs was reverse transcribed using Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (M-MLV RT) RNase H minus and random hexamers (Promega, France). A control minus RT was subjected to the procedure in the absence of M-MLV RT. Fifty nanograms of cDNA was amplified using the Kapa Tag DNA polymerase kit (Clinisciences) as recommended using JSRV env-specific primers (forward [FOR] primer, 5'-TCTTATCAATCG CAGCATCC-3'; reverse [REV] primer, 5'-GAGTGTCTATGCCTATGC CG-3'), canine RALBP1-specific primers (FOR primer, 5'-GGAGGAGA TCAGAAGACAGGAGT-3'; REV primer, 5'-ACTGGCGATCTCTTGTG CAA-3'), v-mos-specific primers (FOR primer, 5'-ATCAGTGACTTCGG CTGCTC-3'; REV primer, 5'-TGCCACAGGGTGATTCCAAA-3'), and β-actin-specific primers (FOR primer, 5'-CCAACCGTGAGAAGATGA CC-3'; REV primer, 5'-CCAGAGGCGTACAGGGACAG-3'). The initial denaturation step at 95°C for 3 min was followed by 25 cycles for RALBP1 or 35 cycles for v-mos, Env, and β -actin, with one cycle consisting of 30 s at 95°C, 30 s at 60°C, and 30 s at 72°C.

Immunodetection of RALBP1, CDC42, or Env on fixed cells. MDCK cells were transfected with the C-ter Flag Env construct and cultured in eight-well chamber slides for 48 h. The cells were then rinsed twice with $1 \times$ phosphate-buffered saline (PBS) for 5 min, fixed, and permeabilized with ice-cold acetone for 10 min at -20° C. After rehydration for 20 min in

 $1 \times$ PBS, the cells were incubated overnight at 4°C with mouse anti-Flag (F3165; Sigma-Aldrich) and rabbit anti-RALBP1 (Ab133549; Abcam) or anti-CDC42 (antibody against cell division control protein 42 [CDC42]) (C5747; Sigma-Aldrich) antibodies, respectively, diluted at 1/5,000, 1/1,000, and 1/2,000 in PBS-BSA (1× PBS, 1% bovine serum albumin [BSA]). After washes with 1× PBS, the cells were incubated for 1 h at room temperature with anti-mouse IgG antibody labeled with Dylight 488 (anti-mouse IgG Dylight 488) and anti-rabbit IgG Dylight 594 antibodies (Eurobio) diluted at 1/500 in PBS-BSA. Fixed cells were rinsed with $1 \times$ PBS, and nuclei were stained with 1 µg/ml 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) for 10 min and mounted with Fluoromount G (Electron Microscopy Sciences). Healthy MDCK cells and cells incubated solely with the secondary antibody were used as negative controls. Microscopic examinations were performed using an Axioimager Z1 epifluorescence microscope and an LSM710 confocal microscope, and images were analyzed using the Zen software (Zeiss).

Proximity ligation assay (PLA). Transfected MDCK cells, once fixed and incubated with primary RALBP1, CDC42, Myc, or Flag antibodies, as described above, were washed with $1 \times$ PBS and incubated for 1 h at 37°C with Duolink PLA rabbit plus and PLA mouse minus proximity probes (Olink Bioscience, Sweden). Proximity ligation was performed using the Duolink detection kit (Olink Bioscience) according to the manufacturer's instructions. Controls were subjected to the same conditions on MDCK cells in the absence of Env expression. Microscopic examinations were performed as described above.

Western blot analysis. MDCK cell pellets were resuspended in 200 µl of lysis buffer per 1×10^6 cells and incubated for 15 min on ice. Lysates were homogenized with four sonication cycles for 20 s at 300 W each (Bioblock; Fisher Scientific). After centrifugation at 11,000 × g for 15 min at 4°C, supernatants were harvested. Lung tissue samples were immersed in 400 µl of lysis buffer per 50 mg of tissue in a lysing matrix D tube (MP Biomedicals) as recommended. After tissue dissociation with the FastPrep device (MP Biomedicals) and incubation for 30 min on ice, four sonication cycles of 20 s at 300 W each were applied to the lysates. Supernatants were harvested after centrifugation for 30 min at 15,000 \times g at 4°C. The amount of total proteins was measured with the Quick Start Bradford 1× dye reagent kit (Bio-Rad) and read on a Victor II spectrophotometer (PerkinElmer). After heat denaturation, total proteins (15 µg) were separated by migration on an SDS-polyacrylamide gel and transferred onto a nitrocellulose membrane (Bio-Rad). The membranes were preincubated with TBST-milk (TBST stands for Tris-buffered saline with Tween 20) (25 mM Tris [pH 7.6], 0.15 M NaCl, 0.05% Tween 20, 5% nonfat dry milk) for 1 h at room temperature. After three washes in TBST, the membranes were incubated overnight at 4°C with specific antibodies. RALBP1 protein was detected with a 1/20,000 dilution in TBST-milk of rabbit anti-RALBP1 antibodies (Ab133549; Abcam) in canine MDCK cells or with a 1/250 dilution in TBST-milk of rabbit polyclonal anti-RALBP1 antibodies (sc28575; Santa Cruz) in tissues and cells from sheep. When the N-ter Myc RALBP1 vector was used, expression of the fusion protein was detected with a 1/1,000 dilution in PBS with 0.05% Tween 20 of mouse anti-Myc antibodies (M4439; Sigma-Aldrich). Analysis of the Akt/mTOR (mammalian target of rapamycin) pathway was performed using antibodies directed against Akt (9272; Cell Signaling), phospho-Akt (9271; Cell Signaling), mTOR (2976; Cell Signaling), phospho-mTOR (2971; Cell Signaling), and phospho-p70S6K (9205; Cell Signaling) at a 1/500 dilution in TBST with 5% BSA (TBST-5% BSA) and against CDC42 (Sigma) at a 1/300 dilution in TBST with 5% milk (TBST-5% milk). After overnight incubation with primary antibodies, the membranes were washed in TBST and incubated for 1 h at room temperature with a 1/20,000 dilution of anti-rabbit IgG (whole molecule) antibodies (A0545; Sigma) labeled with peroxidase. Detection of the C-ter Flag Env and β-actin were performed with appropriate antibodies using the SNAP id system (Millipore). Briefly, the membranes were blocked with Superblock T20 buffer (Thermo Scientific), incubated for 10 min with a 1/8,000 dilution of mouse anti-Flag antibodies labeled with peroxidase (anti-Flag peroxidase

antibodies) (A8592; Sigma) or a 1/75,000 dilution of anti- β -actin peroxidase antibodies (Ab A3854; Sigma), and washed in TBST. Immunoreactive bands were detected using the Super Signal reagent (Pierce). Western blots were performed three times for one transfection. The protein expression was semiquantified by densitometry using the image processing software UN-SCAN-IT (Silk Scientific Corporation). The ratio of a protein of interest to β -actin (protein of interest/ β -actin ratio) was calculated.

Statistical analysis. Statistical analyses were performed using the Wilcoxon, Student, or Welsh test using R software (27). All tests were done with a significance threshold of $\alpha = 0.05$.

RESULTS

RALBP1 and Env proteins interact in cellulo. As part of the identification of cellular partners of the JSRV oncogenic envelope, RALBP1 was identified as a cellular interactant of the CT domain by yeast two-hybrid screening. The yeast two-hybrid screen revealed seven cellular proteins interacting with the CT domain. Of these proteins, RALBP1 was the most frequently detected interactant with 15 hits. Interaction in eukaryotic cells was confirmed by formation of viral-cellular protein complexes in HEK 293T cells cotransfected with N-ter Flag TM and N-ter Myc RALBP1 (Fig. 1A). By immunoprecipitation, TM was detected in the fraction retained by the protein G-coated beads coupled to anti-Myc antibodies when N-ter Myc RALBP1 proteins were present in cell lysates (Fig. 1A). The same interaction was evidenced in the reversed IP with detection of RALBP1 retained by the beads coupled with anti-Flag antibodies when N-ter Flag TM was present in lysates (Fig. 1A).

The cellular localization of RALBP1 and Env was analyzed by immunostaining on fixed MDCK cells transfected with the C-ter Flag Env expression construct. During the preliminary steps of our study, we observed that MDCK cells constitutively expressed high levels of RALBP1 (Fig. 1B); this made these cells suitable for our study without the need of RALBP1 overexpression by transfection. JSRV Env was expressed at the cell membrane, in the cytoplasm, and at the periphery of the nucleus (Fig. 1B). RALBP1 was expressed both in the cytoplasm and at the cell membrane (Fig. 1B). RALBP1 and Env colocalized at the cell membrane and in the cytoplasm (Fig. 1B).

In MDCK cells transfected with the C-ter Flag Env, a proximity ligation assay (PLA) demonstrated the interaction between RALBP1 and Env in the cytoplasm, as visualized by green dots (Fig. 1C). As a negative control, the same assay gave no signal on MDCK cells transfected with the C-ter Flag Env and N-ter Myc TRIM23, a cellular protein that we knew does not interact with Env. Taken together, these data confirmed that RALBP1 and Env were able to form protein-protein complexes in mammalian cells; therefore, our initial observation in yeast was validated.

The RALBP1/Env complexes are involved in Env-mediated transformation. To study the role of RALBP1/Env complexes during Env-induced cell transformation, we experimentally controlled RALBP1 expression in MDCK cells using siRNA targeting this cell protein. We monitored the expression of RALBP1 mRNAs and proteins in MDCK cells transfected with RALBP1-specific siRNAs or scramble siRNAs as negative controls. Two days after transfection, there was no detectable expression of RALBP1 mRNAs, unlike cells transfected with scramble siRNAs (Fig. 2). This inhibition was maintained for up to 5 days after transfection with a low but detectable level of protein and mRNA

expression compared to controls (Fig. 2). By day 9, the level of expression was restored (Fig. 2). The siRNA targeting RALBP1 proved to efficiently extinguish expression of RALBP1 mRNAs and proteins in MDCK cells.

RALBP1 in JSRV Env-Induced Cell Transformation

To evaluate the contribution of RALBP1/Env complexes during Env-mediated transformation, we measured the induction of MDCK spheroids in soft agar upon Env expression in the absence (RALBP1-specific siRNAs) or presence (scramble siRNA or none) of RALBP1 (Fig. 3). The number and size of spheroids indicative of cell transformation were recorded over 12 days. When cultured in soft agar, control MDCK cells did not form spheroids after 12 days (data not shown). When the cells were transfected with C-ter Flag Env, spheroids were readily visible by day 9 (Fig. 3A). Transfection of Env-expressing MDCK cells with control scramble siRNA had no effect on the size and number of spheroids (Fig. 3A and B) compared to Env-transfected cells. In clear contrast, silencing of RALBP1 significantly increased the number of spheroids (Fig. 3B) and reduced their size (Fig. 3A and C) compared to nontransfected or scramble siRNA-transfected cells. We concluded that RALBP1 had a dual effect during the early steps of transformation: on one hand, RALBP1 inhibition resulted in an increased number of spheroids compared to the controls, suggesting that RALBP1 prevents cell transformation; on the other hand, RALBP1 inhibition slowed down the spheroid expansion in Envtransfected MDCK cells, suggesting that RALBP1 participates in the growth of spheroids.

In order to control that the observed effects were specifically attributable to the formation of RALBP1/Env complexes, the same tests were performed using the v-mos oncogene as an inductor of MDCK cell transformation (Fig. 3A). In the presence of v-mos, RALBP1 inhibition using specific siRNA did not alter the number or size of spheroids (Fig. 3B and C). We concluded that RALBP1 inhibition had no effect on the transformation mediated by v-mos; this suggests that RALBP1 is not a ubiquitous partner of the viral oncogenes but rather that it interacts specifically with JSRV Env during cell transformation.

RALBP1 is downregulated in Env-expressing cells, tumoral AECIIs, and tumoral lung tissues. The level of RALBP1 expression was analyzed in healthy or Env-transfected MDCK cells. Each experiment was performed in triplicate. In the presence of JSRV envelope, there was a twofold decrease in RALBP1 expression (P = 0.0095) from the level in healthy MDCK cells (Fig. 4A and B); this suggests that downregulation of RALBP1 occurs upon envelope expression. Similarly, downregulation of RALBP1 expression was highlighted in HEK 293T cells in the presence of Env (data not shown). We then investigated the level of RALBP1 expression in JSRV-induced tumors and in tumor-derived AECIIs. We compared the level of RALBP1 expression measured as the RALBP1/ β -actin ratio in lung cancers (n = 10) and healthy lungs (n = 12) and AECIIs derived from lung tumors (n = 10) or healthy lungs (n = 8) (Fig. 6). Interestingly, as shown in Env-expressing MDCK cells (Fig. 4), there was a twofold reduction of RALBP1 protein expression (P = 0.003) in lung tumors and in tumor-derived AECIIs compared to normal conditions (see Fig. 6). In conclusion, lung tumors and AECIIs derived from JSRV-induced lung tumors expressed less RALBP1 proteins than their healthy counterparts.

The Akt/mTOR/p70S6K pathway is activated by the JSRV envelope in MDCK cells. We then studied the activation of the Akt/ mTOR/p70S6K pathway in Env-transfected MDCK cells by mea-





C: Proximity ligation assay



FIG 1 Env and RALBP1 formed protein-protein complexes. (A) Coimmunoprecipitation of RALBP1 and TM in HEK 293T cells. Lysates of HEK 293T cells overexpressing N-ter Flag TM (+) in the presence (+) or absence (-) of N-ter Myc RALBP1 were incubated with protein G-coated beads coupled with anti-Myc antibody (RALBP1 pulldown) or anti-Flag (TM pulldown) antibodies. TM (32 kDa) or RALBP1 (90 kDa) was detected by Western blotting using anti-Flag antibodies or anti-Myc antibodies, respectively. (B) Colocalization of RALBP1 and Env proteins in MDCK cells. C-ter Flag Env was overexpressed by transfection in MDCK cells, spontaneously expressing high levels of RALBP1. RALBP1 and Env were detected using anti-Flag antibodies, respectively. The overlay shows the colocalization of Env and RALBP1 (indicated by white arrows) in cells. The nuclei were stained with DAPI (blue). (C) Proximity ligation assay (PLA). An *in situ* proximity ligation assay was performed on MDCK cells overexpressing C-ter Flag Env. Primary anti-RALBP1, anti-Myc for TRIM23, and anti-Flag antibodies for Env were combined with secondary PLA probes (Olink Bioscience). The interaction events between Env and RALBP1 are visible as green dots in the cytoplasm. Negative controls were performed in the same conditions on MDCK cells in the absence of Env expression (w/o Env) or using TRIM23, which we know does not interact with Env. Nuclei were stained with DAPI. Magnification, ×200.



FIG 2 RALBP1 expression was efficiently reduced by specific siRNAs. MDCK cells spontaneously expressing high levels of RALBP1 were cotransfected with a mixture of three siRNAs targeting RALBP1 (+) or irrelevant scramble siRNA (-) as controls. The expression of mRNA and RALBP1 protein was monitored for 12 days posttransfection. Untreated MDCK cells were used as a negative control (- CTRL). β -Actin was used as a positive control for RNA expression and protein load.

suring expression of total and phosphorylated Akt (P-Akt), mTOR (P-mTOR), and p70S6K (P-p70S6K) proteins. Each experiment was performed in triplicate, and the signals were semiquantified. The quantity of total proteins was constant in all tested conditions as determined by expression of β -actin (Fig. 4A). We observed a twofold decrease in expression of total Akt and mTOR upon Env expression (Fig. 4A and B). In the presence of JSRV envelope, we observed a twofold increase in the expression of PmTOR and a moderate increase in the expression of P-Akt and P-p70S6K (Fig. 4A and B). These results highlight activation of the Akt/mTOR/p70S6K pathway mediated by JSRV envelope.

RALBP1 is involved in Env-driven modulation of the Akt/ mTOR/p70S6K pathway. To determine the role of RALBP1 in activation of the Akt/mTOR/p70S6K pathway, expression of key proteins was evaluated after siRNA silencing of RALBP1 in Envtransfected MDCK cells (Fig. 5A). Each experiment was performed in triplicate. The quantity of total proteins was constant in all tested conditions as determined by expression of β -actin. While the levels of total Akt and mTOR were not markedly changed upon inhibition of RALPB1 in Env-expressing MDCK cells (Fig. 5B), their phosphorylated forms were negatively modulated with a marked twofold reduction of P-mTOR (P = 0.015) (Fig. 5B). Interestingly, inhibition of RALBP1 in Env-expressing MDCK cells completely abolished the phosphorylation of P-p70S6K (Fig. 5B). These results highlighted that in Env-expressing MDCK cells, RALBP1 regulates the expression of proteins of the Akt/mTOR/p70S6K pathway and stimulates activation of the Akt, mTOR, and p70S6K key proteins.

The Akt/mTOR/p70S6K pathway is modulated in JSRV-induced tumors and tumor-derived AECIIs. We investigated the activation of Akt, mTOR, and p70S6K in JSRV-induced lung tumors and tumor-derived AECIIs. The expression of protein was semiquantified using the protein of interest/β-actin ratio. In lung tissues, the dysregulation of the Akt/mTOR/p70S6K pathway was noticeable with a marked and significant decrease of mTOR expression (P = 0.0002) down to 20% of the level observed in the healthy lungs and a complete abolishment of its activation (P =0.0008) (Fig. 6). The mTOR or P-mTOR protein expression was not significantly disturbed in tumor-derived AECIIs compared to healthy cells (Fig. 6). Remarkably, P-p70S6K was significantly overexpressed in tumors and in tumor-derived AECIIs: there was almost a 2-fold increase in lungs (P = 0.0015) and a 2.5-fold increase in AECIIs (P = 0.02) compared to normal conditions (Fig. 6). To summarize, we demonstrated a dysregulation of the

Akt/mTOR/p70S6K pathway with a marked activation of p70S6K in lung tumors.

CDC42 is overexpressed in epithelial cells derived from ovine tumors and formed complexes with Env. We analyzed the level of total CDC42 protein in ovine tumors and in AECIIs isolated from tumors. If no major difference of expression was noticeable between tumoral and healthy lungs, a significant overexpression (P < 0.05) of CDC42 was evidenced in AECIIs derived from tumors (Fig. 6). We then analyzed the localization of CDC42 and envelope proteins in MDCK overexpressing the C-ter Flag Env and demonstrated that the two proteins were colocalized in the cytoplasm of the cells (Fig. 7A). Finally, CDC42 and the JSRV envelope formed protein-protein complexes as shown by PLA (Fig. 7B).

DISCUSSION

To decipher the early steps of JSRV-induced cell transformation, we identified cellular partners of the cytoplasmic tail of its envelope by yeast two-hybrid screening. Among the identified cell partners, we focused on the interaction between the envelope of JSRV and RALBP1, a cellular protein implicated in the *ras* pathway and effector of RalA (Ras-like protein A) (22). We demonstrated the formation of RALBP1/Env complexes in mammalian cells by visualizing their colocalization as well as protein-protein interaction using a proximity ligation assay. We studied how the disruption of the RALBP1/Env complexes might modify the transformation process and subsequent activation of signaling pathways.

RALBP1 is ubiquitously expressed and acts as a multifunctional cellular protein. It contains a region of homology with the GTPase-activating protein (GAP) domain involved in regulation of GTPases of the Rho family. By recruitment of CDC42 (cell division control protein 42) through its GAP domain, RALBP1 participates in the remodeling of the actin cytoskeleton (28). RALBP1 regulates various endocytic pathways, including those mediated by receptors for epidermal growth factor, transferrin, or insulin (29, 30). RALBP1 is involved in cell cycle progression; it promotes mitochondrial fission during mitosis via its interaction with CDK1 (31). It also acts as a non-ABC transporter, and thus, it participates in resistance to small chemotherapeutic drugs (32). Importantly, RALBP1 has been identified as an important neoplastic player by its crucial role in some of the key cellular functions. Depletion of RALBP1 in xenografts has efficiently cured



FIG 3 RALBP1/Env complexes are involved in Env-mediated cell transformation. (A) Changes over time in the number and size of spheroids were monitored in MDCK cells transformed by C-ter Flag Env or v-mos plasmid upon inhibition of RALBP1 expression (by RALBP1-specific siRNA) or in control conditions (in the presence or absence of irrelevant scramble siRNA) over 12 days. Spheroids are indicated by black arrowheads. (B) Number of spheroids after 12 days in MDCK cells transfected with JSRV Env or v-mos and treated with RALBP1 siRNA or scramble siRNA or not treated (none). Statistical analysis was performed using the Wilcoxon test, and values that are significantly different are indicated by bars and asterisks as follows: *, $P \le 0.05$; **, $P \le 0.01$. (C) Size of spheroids (in micrometers) after 12 days in MDCK cells transfected with C-ter Flag Env or v-mos and treated with RALBP1 siRNA (\blacklozenge) or scramble siRNA (\square) or not treated (\bigcirc). Statistical analysis was performed with the Welsh test; *, $P \le 0.05$; **, $P \le 0.01$.



FIG 4 Modulation of RALBP1 and Akt/mTOR/p7086K pathway by JSRV Env. (A) In MDCK cells not transfected (control [CTRL]) or transfected by C-ter Flag Env, total and phosphorylated proteins were analyzed by Western blotting 48 h after transfection using antibodies directed against total Akt, phosphorylated Akt (P-Akt), mTOR, phosphorylated mTOR (P-mTOR), phosphorylated p7086K (P-p7086K), RALBP1, and β -actin. Upon transfection with the C-ter Flag Env expression vector, both the full-length Env and TM proteins were detected; only the 72-kDa full-length protein is shown. (B) Total protein expression was semiquantified by the protein of interest/ β -actin ratio and showed as the percentage of the control cells in the absence of Env used as the 100% threshold (indicated by the dashed line). Statistical analysis was performed with the *t* test; **, $P \leq 0.01$.

skin (33), lung (34), colon (35), prostate (36), and kidney (37) cancers. Inhibition of RAL-A, an activator of RALBP1, leads to reduction of cell proliferation in cells derived from non-small cell lung cancers (38). RALBP1 has an important antiapoptotic role with the transport of glutathione conjugates of electrophilic pro-

apoptotic compounds produced during oxidative stress (32, 39) and is involved in the oxidative stress response through its interaction with HSF1 (heat shock factor 1) (40).

Interestingly, in our study, RALBP1 was underexpressed in MDCK cells expressing the JSRV envelope and in ovine lung tu-



FIG 5 Involvement of RALBP1 in modulation of the Akt/mTOR/p70S6K pathway by JSRV Env. (A) MDCK cells were transfected with C-ter Flag Env and siRNA targeting RALBP1 or scramble siRNA. Total proteins were extracted and analyzed by Western blotting 48 h after transfection using antibodies directed against Akt, P-Akt, mTOR, P-mTOR, P-p70S6K, and RALBP1. (B) Protein expression was semiquantified using the protein of interest/ β -actin ratio and expressed as a percentage of the control cells transfected with the scramble siRNA used as the 100% threshold (indicated by the dashed line). Statistical analysis was performed with the *t* test; *, $P \le 0.05$; ***, $P \le 0.001$.



FIG 6 Modulation of RALBP1 and Akt/mTOR pathway in lungs and primary AECIIs. Expression of RALBP1, mTOR, P-mTOR, P-p70S6K, and CDC42 was analyzed by Western blotting in lungs (10 lungs with tumors and 12 healthy lungs) and AECIIs (10 derived from JSRV-induced tumors and 8 derived from healthy lungs). Protein expression was semiquantified by the protein of interest/ β -actin ratio and is shown as a percentage from the nontumoral lungs (black bars) and AECIIs (gray bars) used as the 100% threshold (indicated by the horizontal dashed line). Statistical analysis was performed with the Wilcoxon, Welsh, and *t* tests. Values that are significantly different are indicated by asterisks as follows: *, $P \leq 0.05$; **, $P \leq 0.01$; ***, $P \leq 0.001$.

A: CDC42-Env co-localization B: CDC42-Env PLA



mors and tumor-derived AECIIs. These results are in contrast with reports on RALBP1 overexpression in lung, prostate, or ovary cancers (41), among others, as well as in cell lines derived from non-small cell lung cancers (38). The RALBP1 down-expression that we observed in ovine pulmonary adenocarcinomas might be specifically associated with JSRV and associated with envelope expression as shown by the negative regulation of endogenous RALPB1 in MDCK cells expressing Env.

We analyzed activation of the Akt/mTOR/p70S6K pathway in cells overexpressing the envelope and in tissues and AECIIs derived from JSRV-induced tumors. We report the activation of p70S6K in MDCK cells overexpressing Env and in tumor-derived AECIIs and its downregulation upon siRNA-mediated inhibition of RALBP1. The Akt/mTOR/p70S6K signaling pathway is crucial for cell growth and survival in physiological and pathological situations and is activated by multiple factors, e.g., hormones, growth factors, or mutations of components of the tyrosine kinase pathways (11, 42, 43). When phosphorylated, Akt activates the mTOR kinase (44), which controls cell growth by promoting translation and ribosome biogenesis by phosphorylation of p70S6K and 4E-BP1 (45). The p70S6K kinase controls cellular growth by promoting mRNA translation (45). Activation of the PI3K/Akt pathway has been reported in various JSRV-transformed cell lines (8, 46, 47) and confers a growth advantage. Over-

C: Putative regulation of the Akt/ mTOR/ p70S6K pathway upon Env expression



FIG 7 Formation of Env/CDC42 complexes. (A) Colocalization of endogenous CDC42 and Env proteins in MDCK cells. C-ter Flag Env was overexpressed by transfection in MDCK cells. CDC42 and Env were detected using anti-CDC42 or anti-Flag antibodies, respectively. The overlay shows the colocalization of Env and CDC42 in cells (indicated by white arrows). (B) PLA was performed on MDCK cells transfected with C-ter Flag Env. Primary anti-CDC42 and anti-Flag antibodies were combined with secondary PLA probes (Olink Bioscience). The interaction events between Env and CDC42 are visible as green dots in the cytoplasm. Nuclei were stained with DAPI. Magnification, ×200. (C) Putative regulation of the Akt/mTOR/p70S6K pathway upon Env expression based on our results. The pathway in healthy cells (light blue boxes) is shown in the left panel and the observed dysregulation in Env-expressing cells is shown in the right panel. Upregulated proteins (red boxes) and downregulated proteins (green boxes) are indicated.

all, the role of the PI3K/Akt pathway appears to be cell line dependent with murine cells depending on Akt activation, while chicken cell lines can be transformed by mutant cells with mutations in the YXXM motifs that fail to activate Akt (47).

In this report, we studied mechanisms of Env-mediated transformation in MDCK cells when maintained in a three-dimensional (3D) semisolid matrix (soft agar). When MDCK cells were transfected with Env, we observed the formation of MDCK spheroids due to the ability of these cells to grow in the absence of anchorage, a hallmark of cellular transformation and uncontrolled cellular growth (48). As previously reported (9, 49), we showed activation of the Akt/mTOR pathway with moderate activation of Akt and strong activation of mTOR and p7086K in Env-expressing cells. The mTOR and p7086K proteins were activated in AECIIs derived from JSRV-induced tumors; this suggested the role of JSRV in activation of these key proteins. The activation of the Akt/mTOR/p70S6K pathway may participate in telomerase activation that leads to inhibition of apoptosis in AECIIs derived from tumors (15). Interestingly, phosphorylated Akt was not detected (47) or was detected only in one-third (15) of the tested ovine lung adenocarcinomas. We previously demonstrated that primary AECIIs were insensitive to stimulation by epidermal growth factor, an activator of the PI3K/Akt/mTOR pathway, suggesting impairment of this pathway in cells transformed by JSRV (15). Taken together, these results reinforce the role of the PI3K/Akt/mTOR pathway in the JSRV Env-induced transformation and suggest that mTOR and p70S6K might be more important than Akt during the transformation process. Note that many viruses, including Epstein-Barr virus, papillomaviruses, polyomaviruses, human herpesvirus 8, hepatitis B virus, hepatitis C virus, human immunodeficiency viruses, cytomegalovirus, respiratory syncytial virus, or rubella virus require upregulation of the PI3K/Akt pathway to sustain long-standing infections and to create a favorable environment for cell transformation or virus replication (42).

We observed that envelope overexpression induced decreases in RALBP1 proteins in MDCK cells in parallel with activation of the Akt/mTOR pathway. Visualization of Env-RALBP1 interactions 2 days posttransfection by the proximity ligation assay, which enables visualization of individual protein-protein interactions in cells, evidenced a punctiform and cytoplasmic localization of the protein-protein complexes in MDCK cells expressing JSRV Env. We demonstrated that extinction of RALBP1 expression using RALBP1-specific siRNAs turned down the activation of mTOR and p70S6K in Env-transfected cells, while activation of Akt was not significantly altered compared to controls. Moreover, the reduction of RALBP1 expression was associated with a dual effect on the appearance and development of spheroids in Envtransformed MDCK cells. On one hand, the absence of RALBP1 increased the number of transformation events induced by Env, while on the other hand, it prevented expansion of the foci in terms of size. The capacity of Env to transform cells and to generate spheroids was amplified in the absence of RALBP1 expression. This suggests that Env may downregulate or interfere with the multifunctional RALBP1 protein in order to be more efficient at initiating transforming events. It would be interesting to look at the efficiency of RALBP1 overexpression to prevent the transformation process. On the other hand, when inhibiting expression of RALBP1 with siRNA, the size of growing spheroids was reduced at 12 days posttransfection, which implies the involvement of RALBP1 in the proliferation and/or maintenance of Env-transformed cells. After a few days posttransfection, RALBP1 tends to recover its normal expression level (siRNA being efficient up to 5 days posttransfection). This suggests that development in the size of the spheroid may not be under the control of Env expression, but rather it may be modulated by RALBP1 reexpression. This is in agreement with the reported capacity of RALBP1 to suppress apoptosis and to promote cell proliferation (50).

RALBP1 interacts with a number of cellular proteins. By its GAP domain, it inactivates Rho GTPases such as CDC42 (a small GTPase of the Rho family) by hydrolyzing its GTP into GDP (51, 52). In its active form (bound to GTP), CDC42 is able to mediate signaling cascades leading to activation of more than 20 downstream effectors involved in proliferation, migration, adhesion, and cytoskeleton remodeling (51); mTOR and p70S6K are among the effectors activated by CDC42 (53, 54). From our results, we propose that RALBP1 plays a role in JSRV Env-mediated transformation through CDC42, which in turn activates p70S6K (Fig. 7C). Moreover, CDC42 is upregulated in various tumors, such as colon, breast, and lung cancers, and its overexpression has been associated with carcinogenesis and progression (55, 56). As in other cancers, we reported the upregulation of CDC42 in ovine tumor-derived epithelial cells.

In conclusion, our study shows that the PI3K/Akt/mTOR pathway plays a critical role in JSRV-induced transformation and that activation of mTOR and p70S6K is a determinant event for envelope-mediated transformation. RALBP1 is an important player in this process, as its inhibition reduces mTOR activation and abolishes p70S6K activation, limiting the expansion of spheroids. We showed that RALBP1/Env complexes have a dual effect during the early steps of cell transformation. In Env-transfected cells, RALBP1 reduced the number of transformation events but promotes expansion of the foci in terms of size. Therefore, RALBP1 has a positive effect on the progression of cell transformation triggered by the JSRV envelope. Interactions of RALBP1 with viruses are poorly described, and for the first time, this work emphasizes its involvement in tumors associated with a retroviral oncogene. In accordance with the multifunctional properties attributed to the RALBP1 pathway, we hypothesize that CDC42 might be a major key player in this process through activation of p70S6K during envelope-induced transformation associated with alteration of cytoskeleton or modification of endocytosis processes.

ACKNOWLEDGMENTS

This work has been funded by the Ligue Nationale de Recherche sur le Cancer (Ardèche committee), the Plan Cancer, and the Rhône Alpes Region. The imaging platform Platim is part of the SFR BioSciences Gerland-Lyon Sud (UMS 3444/US8). M.M. was the recipient of a Ph.D. fellowship from the French Ministry of Research.

We thank François Guiguen, Jean-Christophe Natorp, and Rémy Falguière for the collection of *postmortem* lungs and Guillaume Poupy for preliminary experiments.

REFERENCES

- 1. Hofacre A, Fan H. 2004. Multiple domains of the Jaagsiekte sheep retrovirus envelope protein are required for transformation of rodent fibroblasts. J Virol 78:10479–10489. http://dx.doi.org/10.1128/JVI.78.19.10479-10489.2004.
- 2. Chow YH, Alberti A, Mura M, Pretto C, Murcia P, Albritton LM, Palmarini M. 2003. Transformation of rodent fibroblasts by the Jaagsiekte sheep retrovirus envelope is receptor independent and does not require

the surface domain. J Virol 77:6341–6350. http://dx.doi.org/10.1128/JVI .77.11.6341-6350.2003.

- Hull S, Fan H. 2006. Mutational analysis of the cytoplasmic tail of Jaagsiekte sheep retrovirus envelope protein. J Virol 80:8069–8080. http: //dx.doi.org/10.1128/JVI.00013-06.
- 4. Leroux C, Girard N, Cottin V, Greenland T, Mornex JF, Archer F. 2007. Jaagsiekte sheep retrovirus (JSRV): from virus to lung cancer in sheep. Vet Res 38:211–228. http://dx.doi.org/10.1051/vetres:2006060.
- Wootton SK, Halbert CL, Miller AD. 2005. Sheep retrovirus structural protein induces lung tumours. Nature 434:904–907. http://dx.doi.org/10 .1038/nature03492.
- Linnerth-Petrik NM, Santry LA, Yu DL, Wootton SK. 2012. Adenoassociated virus vector mediated expression of an oncogenic retroviral envelope protein induces lung adenocarcinomas in immunocompetent mice. PLoS One 7:e51400. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0051400.
- Caporale M, Cousens C, Centorame P, Pinoni C, De las Heras M, Palmarini M. 2006. Expression of the Jaagsiekte sheep retrovirus envelope glycoprotein is sufficient to induce lung tumors in sheep. J Virol 80:8030– 8037. http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00474-06.
- Palmarini M, Maeda N, Murgia C, De-Fraja C, Hofacre A, Fan H. 2001. A phosphatidylinositol 3-kinase docking site in the cytoplasmic tail of the Jaagsiekte sheep retrovirus transmembrane protein is essential for envelope-induced transformation of NIH 3T3 cells. J Virol 75:11002–11009. http://dx.doi.org/10.1128/JVI.75.22.11002-11009.2001.
- 9. Liu SL, Miller AD. 2005. Transformation of Madin-Darby canine kidney epithelial cells by sheep retrovirus envelope proteins. J Virol 79:927–933. http://dx.doi.org/10.1128/JVI.79.2.927-933.2005.
- 10. Cully M, You H, Levine AJ, Mak TW. 2006. Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. Nat Rev Cancer 6:184–192. http://dx.doi.org/10.1038/nrc1819.
- Porta C, Paglino C, Mosca A. 2014. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling in cancer. Front Oncol 4:64. http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2014.00064.
- Hanahan D, Weinberg RA. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 144:646–674. http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Mathon NF, Lloyd AC. 2001. Cell senescence and cancer. Nat Rev Cancer 1:203–213. http://dx.doi.org/10.1038/35106045.
- Kang SS, Kwon T, Kwon DY, Do SI. 1999. Akt protein kinase enhances human telomerase activity through phosphorylation of telomerase reverse transcriptase subunit. J Biol Chem 274:13085–13090. http://dx.doi.org/10 .1074/jbc.274.19.13085.
- Suau F, Cottin V, Archer F, Croze S, Chastang J, Cordier G, Thivolet-Bejui F, Mornex JF, Leroux C. 2006. Telomerase activation in a model of lung adenocarcinoma. Eur Respir J 27:1175–1182. http://dx.doi.org/10 .1183/09031936.06.00125105.
- Shah A, Swain WA, Richardson D, Edwards J, Stewart DJ, Richardson CM, Swinson DE, Patel D, Jones JL, O'Byrne KJ. 2005. Phospho-akt expression is associated with a favorable outcome in non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res 11:2930–2936. http://dx.doi.org/10.1158/1078 -0432.CCR-04-1385.
- Linnerth-Petrik NM, Santry LA, Petrik JJ, Wootton SK. 2014. Opposing functions of Akt isoforms in lung tumor initiation and progression. PLoS One 9:e94595. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0094595.
- Liu SL, Miller AD. 2007. Oncogenic transformation by the Jaagsiekte sheep retrovirus envelope protein. Oncogene 26:789–801. http://dx.doi .org/10.1038/sj.onc.1209850.
- Rai SK, Duh FM, Vigdorovich V, Danilkovitch-Miagkova A, Lerman MI, Miller AD. 2001. Candidate tumor suppressor HYAL2 is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored cell-surface receptor for Jaagsiekte sheep retrovirus, the envelope protein of which mediates oncogenic transformation. Proc Natl Acad Sci U S A 98:4443–4448. http://dx.doi.org/10 .1073/pnas.071572898.
- Liu SL, Duh FM, Lerman MI, Miller AD. 2003. Role of virus receptor Hyal2 in oncogenic transformation of rodent fibroblasts by sheep betaretrovirus Env proteins. J Virol 77:2850–2858. http://dx.doi.org/10.1128/JVI .77.5.2850-2858.2003.
- Miller AD. 2008. Hyaluronidase 2 and its intriguing role as a cell-entry receptor for oncogenic sheep retroviruses. Semin Cancer Biol 18:296–301. http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2008.03.010.
- Kashatus DF. 2013. Ral GTPases in tumorigenesis: emerging from the shadows. Exp Cell Res 319:2337–2342. http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr .2013.06.020.
- 23. Archer F, Jacquier E, Lyon M, Chastang J, Cottin V, Mornex JF, Leroux C. 2007. Alveolar type II cells isolated from pulmonary adenocarcinoma:

a model for JSRV expression in vitro. Am J Respir Cell Mol Biol **36:**534–540. http://dx.doi.org/10.1165/rcmb.2006-0285OC.

- 24. York DF, Vigne R, Verwoerd DW, Querat G. 1992. Nucleotide sequence of the Jaagsiekte retrovirus, an exogenous and endogenous type D and B retrovirus of sheep and goats. J Virol 66:4930–4939.
- Rual JF, Hirozane-Kishikawa T, Hao T, Bertin N, Li S, Dricot A, Li N, Rosenberg J, Lamesch P, Vidalain PO, Clingingsmith TR, Hartley JL, Esposito D, Cheo D, Moore T, Simmons B, Sequerra R, Bosak S, Doucette-Stamm L, Le Peuch C, Vandenhaute J, Cusick ME, Albala JS, Hill DE, Vidal M. 2004. Human ORFeome version 1.1: a platform for reverse proteomics. Genome Res 14:2128–2135. http://dx.doi.org/10.1101/gr.2973604.
- 26. Li S, Armstrong CM, Bertin N, Ge H, Milstein S, Boxem M, Vidalain PO, Han JD, Chesneau A, Hao T, Goldberg DS, Li N, Martinez M, Rual JF, Lamesch P, Xu L, Tewari M, Wong SL, Zhang LV, Berriz GF, Jacotot L, Vaglio P, Reboul J, Hirozane-Kishikawa T, Li Q, Gabel HW, Elewa A, Baumgartner B, Rose DJ, Yu H, Bosak S, Sequerra R, Fraser A, Mango SE, Saxton WM, Strome S, Van Den Heuvel S, Piano F, Vandenhaute J, Sardet C, Gerstein M, Doucette-Stamm L, Gunsalus KC, Harper JW, Cusick ME, Roth FP, Hill DE, Vidal M. 2004. A map of the interactome network of the metazoan C. elegans. Science 303:540–543. http://dx.doi.org/10.1126/science.1091403.
- 27. R Development Core Team. 2010. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. http://www.R-project.org.
- Boissel L, Houssin N, Chikh A, Rynditch A, Van Hove L, Moreau J. 2007. Recruitment of Cdc42 through the GAP domain of RLIP participates in remodeling of the actin cytoskeleton and is involved in Xenopus gastrulation. Dev Biol 312:331–343. http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.09.027.
- 29. Jullien-Flores V, Mahe Y, Mirey G, Leprince C, Meunier-Bisceuil B, Sorkin A, Camonis JH. 2000. RLIP76, an effector of the GTPase Ral, interacts with the AP2 complex: involvement of the Ral pathway in receptor endocytosis. J Cell Sci 113:2837–2844.
- Nakashima S, Morinaka K, Koyama S, Ikeda M, Kishida M, Okawa K, Iwamatsu A, Kishida S, Kikuchi A. 1999. Small G protein Ral and its downstream molecules regulate endocytosis of EGF and insulin receptors. EMBO J 18:3629–3642. http://dx.doi.org/10.1093/emboj/18.13.3629.
- Kashatus DF, Lim KH, Brady DC, Pershing NL, Cox AD, Counter CM. 2011. RALA and RALBP1 regulate mitochondrial fission at mitosis. Nat Cell Biol 13:1108–1115. http://dx.doi.org/10.1038/ncb2310.
- 32. Awasthi S, Cheng J, Singhal SS, Saini MK, Pandya U, Pikula S, Bandorowicz-Pikula J, Singh SV, Zimniak P, Awasthi YC. 2000. Novel function of human RLIP76: ATP-dependent transport of glutathione conjugates and doxorubicin. Biochemistry 39:9327–9334. http://dx.doi.org /10.1021/bi992964c.
- Singhal SS, Awasthi YC, Awasthi S. 2006. Regression of melanoma in a murine model by RLIP76 depletion. Cancer Res 66:2354–2360. http://dx .doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3534.
- Singhal SS, Singhal J, Nair MP, Lacko AG, Awasthi YC, Awasthi S. 2007. Doxorubicin transport by RALBP1 and ABCG2 in lung and breast cancer. Int J Oncol 30:717–725.
- 35. Singhal SS, Singhal J, Yadav S, Dwivedi S, Boor PJ, Awasthi YC, Awasthi S. 2007. Regression of lung and colon cancer xenografts by depleting or inhibiting RLIP76 (Ral-binding protein 1). Cancer Res 67: 4382–4389. http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4124.
- Singhal SS, Roth C, Leake K, Singhal J, Yadav S, Awasthi S. 2009. Regression of prostate cancer xenografts by RLIP76 depletion. Biochem Pharmacol 77:1074–1083. http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2008.11.013.
- Singhal SS, Singhal J, Yadav S, Sahu M, Awasthi YC, Awasthi S. 2009. RLIP76: a target for kidney cancer therapy. Cancer Res 69:4244–4251. http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3521.
- Male H, Patel V, Jacob MA, Borrego-Diaz E, Wang K, Young DA, Wise AL, Huang C, Van Veldhuizen P, O'Brien-Ladner A, Williamson SK, Taylor SA, Tawfik O, Esfandyari T, Farassati F. 2012. Inhibition of RalA signaling pathway in treatment of non-small cell lung cancer. Lung Cancer 77:252–259. http://dx.doi.org/10.1016/j.lungcan.2012.03.007.
- Awasthi S, Singhal SS, Awasthi YC, Martin B, Woo JH, Cunningham CC, Frankel AE. 2008. RLIP76 and cancer. Clin Cancer Res 14:4372– 4377. http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0145.
- Hu Y, Mivechi NF. 2003. HSF-1 interacts with Ral-binding protein 1 in a stress-responsive, multiprotein complex with HSP90 in vivo. J Biol Chem 278:17299–17306. http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M300788200.
- 41. Vatsyayan R, Lelsani PC, Awasthi S, Singhal SS. 2010. RLIP76: a versatile
transporter and an emerging target for cancer therapy. Biochem Pharmacol **79:**1699–1705. http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2010.01.016.

- 42. Cooray S. 2004. The pivotal role of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt signal transduction in virus survival. J Gen Virol 85:1065–1076. http://dx .doi.org/10.1099/vir.0.19771-0.
- Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. 1999. Cellular survival: a play in three Akts. Genes Dev 13:2905–2927. http://dx.doi.org/10.1101/gad.13.22.2905.
- Liao Y, Hung MC. 2010. Physiological regulation of Akt activity and stability. Am J Transl Res 2:19–42.
- Hay N, Sonenberg N. 2004. Upstream and downstream of mTOR. Genes Dev 18:1926–1945. http://dx.doi.org/10.1101/gad.1212704.
- 46. Liu SL, Lerman MI, Miller AD. 2003. Putative phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) binding motifs in ovine betaretrovirus Env proteins are not essential for rodent fibroblast transformation and PI3K/Akt activation. J Virol 77: 7924–7935. http://dx.doi.org/10.1128/JVI.77.14.7924-7935.2003.
- Zavala G, Pretto C, Chow YH, Jones L, Alberti A, Grego E, De las Heras M, Palmarini M. 2003. Relevance of Akt phosphorylation in cell transformation induced by Jaagsiekte sheep retrovirus. Virology 312:95–105. http://dx.doi.org/10.1016/S0042-6822(03)00205-8.
- Chitra E, Lin YW, Davamani F, Hsiao KN, Sia C, Hsieh SY, Wei OL, Chen JH, Chow YH. 2010. Functional interaction between Env oncogene from Jaagsiekte sheep retrovirus and tumor suppressor Sprouty2. Retrovirology 7:62. http://dx.doi.org/10.1186/1742-4690-7-62.
- Johnson C, Sanders K, Fan H. 2010. Jaagsiekte sheep retrovirus transformation in Madin-Darby canine kidney epithelial cell threedimensional culture. J Virol 84:5379–5390. http://dx.doi.org/10.1128/JVI .02323-09.

- Wang Q, Wang JY, Zhang XP, Lv ZW, Fu D, Lu YC, Hu GH, Luo C, Chen JX. 2013. RLIP76 is overexpressed in human glioblastomas and is required for proliferation, tumorigenesis and suppression of apoptosis. Carcinogenesis 34:916–926. http://dx.doi.org/10.1093/carcin/bgs401.
- 51. Arias-Romero LE, Chernoff J. 2013. Targeting Cdc42 in cancer. Expert Opin Ther Targets 17:1263–1273. http://dx.doi.org/10.1517/14728222 .2013.828037.
- Mott HR, Owen D. 2014. Structure and function of RLIP76 (RalBP1): an intersection point between Ras and Rho signalling. Biochem Soc Trans 42:52–58. http://dx.doi.org/10.1042/BST20130231.
- Chou MM, Masuda-Robens JM, Gupta ML. 2003. Cdc42 promotes G1 progression through p70 S6 kinase-mediated induction of cyclin E expression. J Biol Chem 278:35241–35247. http://dx.doi.org/10.1074 /jbc.M305246200.
- Fang Y, Park IH, Wu AL, Du G, Huang P, Frohman MA, Walker SJ, Brown HA, Chen J. 2003. PLD1 regulates mTOR signaling and mediates Cdc42 activation of S6K1. Curr Biol 13:2037–2044. http://dx.doi.org/10 .1016/j.cub.2003.11.021.
- 55. Fritz G, Just I, Kaina B. 1999. Rho GTPases are overexpressed in human tumors. Int J Cancer 81:682–687. http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097 -0215(19990531)81:5<682::AID-IJC2>3.0.CO;2-B.
- 56. Tucci MG, Lucarini G, Brancorsini D, Zizzi A, Pugnaloni A, Giacchetti A, Ricotti G, Biagini G. 2007. Involvement of E-cadherin, beta-catenin, Cdc42 and CXCR4 in the progression and prognosis of cutaneous melanoma. Br J Dermatol 157:1212–1216. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365 -2133.2007.08246.x.

II. L'enveloppe de JSRV désorganise le cytosquelette d'actine

Nous avons montré que CDC42 interagissait avec l'enveloppe de JSRV *in cellulo* et nous avons posé l'hypothèse que cette RhoGTPase jouait un rôle dans la transformation cellulaire induite par JSRV. Etant donné l'implication importante de CDC42 dans l'organisation du cytosquelette d'actine, nous nous sommes intéressés à l'effet de l'enveloppe de JSRV sur le cytosquelette d'actine.

II.1 Etat de l'art

CDC42 contrôle la dynamique du cytosquelette d'actine et la polarisation

CDC42 est une Rho-GTPase appartenant à la voie Rho. CDC42 est activée par liaison avec un GTP et inactivée par liaison avec un GDP (Figure 20). Ce cycle d'activation est régulé par l'activité GTPase intrinsèque de CDC42 ainsi que par son interaction avec les GEFs (Guanine Exchange Factors), les GDIs (Guanine Dissociation Inhibitors) et les GAPs (GTPase Activating Proteins) (203, 204) (Figure 20). Les GEFs activent le relargage du GDP ce qui permet la fixation du GTP et ainsi l'activation de CDC42 (204). A l'inverse, les protéines GAPs, telle que RALBP1, stimulent la faible activité GTPase de CDC42 ce qui entraîne l'hydrolyse du GTP et inactive la protéine. Les protéines RhoGDI sont une autre classe de protéines inhibitrices des protéines GTPase : elles se fixent sur celles-ci et les maintiennent associées aux GDP donc inactives. Lorsque CDC42 est liée aux RhoGDI, elle devient soluble et est alors située dans le cytosol, plus particulièrement dans l'appareil de Golgi. Lors de son activation par les GEFs, CDC42 transloque à la membrane plasmique. Lorsque CDC42 est activée, elle joue un rôle essentiel dans :

- La prolifération cellulaire
- 2 La polarisation
- La progression du cycle cellulaire
- Le transport vésiculaire
- L'organisation du cytosquelette d'actine



Figure 20 : CDC42 possède de nombreux effecteurs. Une fois activé par liaison à un GTP, CDC42 est impliqué dans la polymérisation des filaments d'actine, la prolifération cellulaire, la transition G1/S du cycle cellulaire, le transport vésiculaire, l'orientation des microtubules et la polarisation cellulaire.

• CDC42 et prolifération cellulaire

Lorsque CDC42 est liée à un GTP, elle active p70S6K qui, v*ia* ses effecteurs, entraine une augmentation de la prolifération cellulaire (Figure 14 et 20) (197).

OCDC42 et polarisation

CDC42 est une protéine centrale dans la signalisation intracellulaire contribuant à mettre en place la polarité cellulaire (205). CDC42 induit la polarisation des cellules *via* le transport vésiculaire de protéines jusqu'au pôle apical de la cellule par interaction avec le complexe Par6/aPKC (Polarity protein partitioning-defective-6/atypical Protein Kinase C) (Figure 20). Ce complexe régule également la polarisation des cellules par le contrôle de l'orientation du fuseau mitotique durant la division cellulaire (206, 207) (Figure 20). Dans les cellules migrantes, CDC42 est accumulé au pôle migrant grâce à un transport vésiculaire engendrant une polymérisation des faisceaux d'actine nécessaires à la migration cellulaire (208).

CDC42 et cycle cellulaire

CDC42 est important dans la transition G1/S du cycle cellulaire ainsi que dans la mitose (209). L'inhibition de CDC42 bloque le cycle cellulaire en phase G1 dans de nombreux types cellulaires. CDC42 intervient sur la phase G1 *via* la cycline D1 en contrôlant ses facteurs de transcription notamment NFκB (Nuclear Factor kappa B) (210, 211) (Figure 20). De plus, CDC42 stimule l'expression de la cycline E *via* l'activation de la kinase p70S6K (212) (Figure 20). Des fibroblastes embryonnaires murins MEF déficients pour CDC42 montrent un défaut dans la transition G1/S du cycle cellulaire et leur survie est affectée (213).

OCDC42 et transport vésiculaire

CDC42 activé est capable de se lier avec le complexe COPI (Coat Protein I) impliqué dans le transport rétrograde des vésicules de l'appareil de Golgi vers le réticulum endoplasmique (Figure 20) dans les cellules épithéliales de lignée MDCK polarisées (206). Le traitement par la sécramine, un inhibiteur du transport depuis l'appareil de Golgi, inhibe l'activation de CDC42 ce qui a pour effet de perturber le transport vésiculaire et la polarisation dans les cellules migrantes (214). L'inactivation ou la mutation de CDC42 dans des cellules MDCK interrompt le transport baso-latéral de protéines d'adhésion cellules/cellules dans les épithéliums, les E-cadhérines, provoquant leur accumulation dans l'appareil de Golgi et un défaut d'adressage à la membrane latérale. CDC42 régule le transport post-Golgi des E-cadhérines *via* le contrôle de la polymérisation des filaments d'actine (215).

G CDC42 et cytosquelette d'actine

CDC42 joue un rôle fondamental dans l'organisation du cytosquelette d'actine. L'injection dans des cellules de mammifères de CDC42 constitutivement actif entraîne la formation de minces protrusions cellulaires ou filopodes, contenant des faisceaux parallèles de filaments d'actine polymérisée (216). Les filopodes fonctionnent comme une sonde sensorielle pour de nombreuses cellules migrantes et permettent d'établir des contacts cellule/cellule (217). CDC42 induit la polymérisation de l'actine en se fixant au complexe WASP (Wiskott-Aldrich Syndrome Protein) activant le complexe Arp2/3 (Actin-related protein 2/3) (205, 218) (Figure 20). L'activation par CDC42 de la kinase PAK (p21-Activated Kinase) entraîne également la phosphorylation de la kinase LIMK (LIM kinase) stabilisant les filaments d'actine F (218) (Figure 20).

Il faut toutefois noter que le rôle de CDC42 dans les différents processus cellulaires décrits cidessus est dépendant du type cellulaire (201, 219).

G CDC42 et pathologies

La dérégulation de CDC42 est impliquée dans de nombreuses maladies dont les troubles neurodégénératifs, les maladies cardiovasculaires et les cancers (220, 221). L'implication de cette Rho-GTPase varie selon les cellules et les tissus. Ainsi, si dans la majorité des contextes CDC42 participe à la formation des tumeurs, il peut parfois être anti-tumoral (222). CDC42 est indispensable à la transformation cellulaire de fibroblastes induite par Ras (223) et est activé lors de l'expression de ce dernier (224, 225). Dans les cellules transformées par Ras, le blocage de CDC42 inhibe la prolifération cellulaire (226). Dans la lignée de lymphocytes T Jurkat, CDC42 a au contraire un rôle anti-tumoral. En effet, la surexpression de CDC42 activé induit l'apoptose via l'activation de la voie des caspases et inhibe la prolifération des cellules (227). CDC42 est également impliquée dans le cycle de régulation de l'EGFR. CDC42 est lié à une ubiquitine ligase spécifique de l'EGFR. Lorsque CDC42 est activé, cette ubiquitine ligase est séguestrée, l'EGFR n'est pas dégradé et s'accumule pour, au final, induire la transformation cellulaire (228). Au contraire de nombreuses autres protéines impliquées dans la transformation cellulaire, CDC42 n'est pas mutée dans les cancers. Son implication dans la carcinogénèse est due à une activation et/ou une expression aberrante de la protéine entrainée par la dérégulation de ses régulateurs (229).

A retenir sur CDC42 :

- protéine cellulaire ubiquitaire de la famille des RhoGTPases.
- activée par fixation avec un GTP, inactivée par fixation avec un GDP
- inactivée par RALBP1
- Rôles multiples dans
 - prolifération cellulaire
 - transition G1/S du cycle cellulaire
 - transport vésiculaire
 - polarisation
 - polymérisation de l'actine
 - de nombreuses maladies dont les cancers

✤ Le cytosquelette d'actine est une structure fondamentale de la cellule

e cytosquelette est un réseau interactif de 3 structures filamenteuses : (i) les microtubules qui sont des structures cylindriques creuses dont la paroi est composée de tubuline, (ii) les filaments intermédiaires qui sont des fibres résistantes en forme de cordes, (iii) les microfilaments qui sont de minces structures pleines composées d'actine. Le cytosquelette intervient dans différents évènements cellulaires comme la migration, l'adhésion ou le trafic vésiculaire. L'actine y est présente sous deux formes : une forme monomérique globulaire G et une forme polymérisée F. En présence d'ATP, les monomères d'actine G se polymérisent pour former des filaments flexibles composés de deux cordons d'actine globulaire enroulés formant une double hélice. Les filaments d'actine sont organisés en différentes structures (Figure 21) : (i) les fibres de stress sont contractiles, elles traversent la cellule d'un pôle à l'autre et sont liées à la matrice extra-cellulaire via les points focaux d'adhérence (Figure 21). La Rho-GTPase Rho régule leur formation (218) ; (ii) les lamellipodes sont de larges extensions membranaires faites de polymères d'actine F que la cellule utilise pour explorer son environnement. C'est une structure saillante riche en actine permettant la migration (Figure 21). La Rho-GTPase Rac régule leur formation (218) ; (iii) les filopodes sont des structures fines et cylindriques en forme de doigts composées de fibres d'actine parallèles serrées (Figure 21) et CDC42 contrôle leur formation (218). Dans les cellules polarisées, la membrane apicale est fortement associée aux microfilaments d'actine. Dans les épithéliums monocouches, tel que l'épithélium respiratoire, les cellules restreignent le mouvement dans l'espace intercellulaire des molécules et des pathogènes via des jonctions entre les cellules adjacentes et un réseau de filaments d'actine qui fournit un support aux complexes de jonctions. Les jonctions entre les cellules polarisées forment un réseau complexe et hautement régulé qui maintient l'homéostasie cellulaire. L'épithélium forme ainsi une barrière physique empêchant notamment la pénétration des virus (230). Les virus, afin de faciliter l'entrée virale et la transmission intercellulaire, manipulent souvent le cytosquelette d'actine dès les étapes précoces de l'infection et durant tout le cycle viral (4).

Dans ce contexte nous avons posé l'hypothèse de la modulation de la structure du réseau d'actine par l'enveloppe de JSRV.



Figure 21 : Structures cellulaires composées par l'actine. Au sein de la cellule, les filaments d'actine forment diverses structures. Les fibres de stress sont de longs assemblages de filaments d'actine qui peuvent s'étendre d'un bout à l'autre de la cellule. La présence de myosine permet aux fibres de stress de se contracter. Sous la membrane plasmique se trouve un réseau d'actine peu organisé appelé actine corticale. Les filaments d'actine peuvent également former des podosomes, lamellipodes, filopodes et microvillosités. Les podosomes, structures riches en actine servant de point d'ancrage à la matrice extracellulaire, contiennent plusieurs protéines liées à l'actine représentées par des points noirs. ER : réticulum endoplasmique. D'après (4).

II.2 Matériel et Méthodes

II.2.1 Expression de l'enveloppe de JSRV dans les cellules MDCK

Des cellules MDCK ont été cultivées dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium, PAA) supplémenté avec 2mM de L-glutamine, 10% de sérum de veau fœtal (PAA) décomplémenté à la chaleur, 1% d'acides aminés non essentiels (PAA). Les cellules ont été incubées sous atmosphère humide à 37°C sous 5% de CO₂. Les cellules MDCK ont été

transfectées par le plasmide d'expression de l'enveloppe de JSRV pCMVa-JS21flag, nommé ici pEnv-Flag, gracieusement fourni par le Pr M. Palmarini (Institute of comparative Medicine, University of Glasgow Veterinary School, Glasgow, Scotland, UK). Il permet l'expression d'une protéine fusion Env-Flag (70 kDa) avec l'étiquette Flag (Asp-Tyr- Lys- Asp- His- Asp) en C-ter sous le contrôle du promoteur CMV. Les cellules MDCK ont également été transfectées avec le pCMV-GFP, un plasmide permettant l'expression de la protéine GFP (Green Fluorescent Protein) sous le contrôle du promoteur CMV.

Des cellules MDCK ont été transfectées avec le pEnv-Flag en utilisant le système TransIT-X2 (Euromedex) selon les recommandations du fournisseur. Brièvement, un mélange de 3 μ g de plasmide avec 250 μ L d'OptiMEM (Invitrogen) et 8 μ L de TransIT-X2 a été ajouté à 0,5.10⁶ cellules ensemencées la veille en DMEM complet. Le milieu a été renouvelé 24 heures après la transfection. Les cellules ont été incubées à 37 °C sous 5% de CO₂ en milieu DMEM complet.

Afin de générer une lignée de cellules MDCK exprimant stablement l'enveloppe de JSRV, les cellules MDCK ont été transfectées avec le pEnv-Flag par électroporation avec le kit Neon[™] Transfection System (Invitrogen) selon les instructions du fournisseur. Brièvement 0,5.10⁶ cellules ont été mises en suspension dans 48 µL de tampon R (Neon [™] Transfection System, Invitrogen) à 37°C et déposées sur 3 µg d'ADN plasmidique. Les cellules ont été incubées à 37 °C sous 5% de CO₂ en milieu DMEM complet. Une sélection clonale par dilution limite a été effectuée. Le maintien de l'expression de l'enveloppe virale a été vérifié par RT-PCR, PCR, Western Blot et immunomarquage.

II.2.2 Culture des cellules MDCK en système tridimensionnel

Des cellules MDCK ont été ensemencées à raison de 1.10⁴ cellules par puits en chambre de culture 8 puits sur lame (Lab-TEK, BD-Falcon[™]) préalablement traitée avec 5 µL de matrigel (BD-Flacon) par puits. Les cellules ont été cultivées 4 jours en milieu DMEM complet additionné de 2% matrigel à 37 °C sous 5% de CO₂.

II.2.3 Immunodétection de l'actine et de CDC42 sur cellules fixées

L'expression de Env et CDC42 ainsi que l'organisation du cytosquelette d'actine ont été étudiées dans des cellules MDCK exprimant stablement ou transitoirement l'enveloppe. Après

incubation dans une chambre multi-puits sur lame (Lab-TEK, BD-Falcon™), les cellules ont été lavées en PBS puis fixées et perméabilisées par traitement à l'acétone froid 10 minutes à -20°C. Après une réhydratation de 20 minutes en PBS, elles ont été incubées la nuit à 4°C avec des anticorps anti-Flag (F3165, Sigma), anti-Flag couplé Alexa 488 (5407S, Ozyme), anti-β-actine (A5441, Sigma), anti-CDC42 (C5747, Sigma). Les anticorps ont été dilués respectivement au 1/5000, 1/200, 1/2000, 1/2000, 1/50, en PBS/ 1% BSA (Bovine Serum Albumin). Après 3 lavages de 5 minutes en PBS, les cellules ont été incubées à l'abri de la lumière 1 h à température ambiante avec des anticorps anti-lgG de lapin couplés Dylight 594 (072-09-15-06, Eurobio), anticorps anti-IgG de souris couplés Dylight 594 (072-09-18-06, Eurobio), anticorps anti-IgG de souris couplés Dylight 488 (072-03-18-06, Eurobio), anticorps anti IgG de souris couplés Alexa 647 (ab150119, Abcam) ou anticorps anti IgG de lapin couplés Alexa 546 (A11010, Invitrogen). Toutes les dilutions ont été faites au 1/500 en PBS/ 1% BSA. Les cellules ont été rincées 2 fois 5 minutes en PBS puis les noyaux ont été marqués avec 1 µg/mL de DAPI (4-6-diamidino-2phenylindole) en PBS pendant 10 minutes à l'abri de la lumière. Après 2 lavages en PBS, les cellules ont été montées entre lame et lamelle avec du fluoromount G (Electron Microscopy Sciences) et conservées à 4°C à l'abri de la lumière. La lecture des lames a été réalisée sur un microscope à fluorescence Axioimager.Z1 (ZEISS) et sur un microscope confocal LSM710 (ZEISS) (PLATIM, SFR BioSciences Gerland-Lyon Sud). Les images ont été traitées avec le logiciel Zen (ZEISS).

II.3 Résultats

II.3.1 L'expression de l'enveloppe de JSRV désorganise le cytosquelette d'actine en culture monocouche

L'organisation du cytosquelette d'actine a été comparée entre les cellules MDCK exprimant stablement ou transitoirement l'enveloppe et des MDCK non transfectées par des immunomarquages de l'actine sur les cellules cultivées en monocouche. Dans les cellules MDCK non transfectées, l'actine était polymérisée formant des fibres de stress traversant la cellule et le réseau d'actine cortical sous-membranaire (Figures 22). Au contraire, dans les MDCK exprimant l'enveloppe de JSRV de manière transitoire ou stable, ni le réseau d'actine corticale ni les fibres de stress n'étaient visibles, l'actine y étant présente de façon diffuse dans le cytoplasme (Figure 22). Cela suggère que l'expression transitoire ou stable de l'enveloppe de JSRV dans les cellules

MDCK cultivées en monocouche entraîne un défaut de polymérisation de l'actine et la désorganisation du cytosquelette d'actine. La désorganisation du cytosquelette d'actine n'est pas imputable à la transfection. En effet, dans des cellules transfectées avec pCMV-GFP, l'organisation du cytosquelette d'actine était identique à celle des cellules non transfectées (Figure 22).



Figure 22 : L'expression de l'enveloppe de JSRV désorganise le cytosquelette d'actine. Détection du cytosquelette d'actine par immunomarquage dans les cellules MDCK exprimant stablement ou transitoirement l'enveloppe de JSRV. Les contrôles sont effectués avec des cellules MDCK non transfectées ou exprimant la protéine GFP. La détection de la β -actine a été faite en utilisant un anticorps anti β -actine (rouge). Les noyaux ont été marqués au DAPI (bleu) (X630).

II.3.2 L'expression de l'enveloppe de JSRV prévient la formation d'acini et la polarisation des cellules MDCK en condition de culture tridimensionnelle

Afin d'étudier l'effet de l'expression de l'enveloppe de JSRV sur le cytosquelette d'actine et sur la localisation de CDC42 dans des cellules polarisées, des cellules MDCK exprimant stablement l'enveloppe de JSRV ont été cultivées en matrigel, une matrice extracellulaire permettant l'étude de la polarisation des cellules, durant 4 jours. Le cytosquelette d'actine et la localisation de CDC42 ont été étudiés par immunomarquages.

Les cellules MDCK cultivées en matrigel formaient des acini (Figure 23 A) constitués de cellules organisées autour d'une lumière (Figure 23 B) avec expression de l'actine au pôle apical des cellules (Figure 23 B). La protéine CDC42 était majoritairement exprimée au pôle apical, attestant de la polarisation des cellules (Figure 23 B). Au contraire, les cellules MDCK exprimant constitutivement l'enveloppe étaient organisées en « fibres » constituant un réseau dans le matrigel (Figure 23) et montraient un défaut de polarisation avec une absence de localisation apicale de l'actine et de CDC42 (Figure 23 B).

Α

MDCK

MDCK/EnvSTABLE



В

 MDCK
 MDCK/Env-FlagST

 Actine
 Image: Constraint of the state of the

Figure 23 : l'expression constitutive de l'enveloppe de JSRV prévient la polarisation des cellules MDCK en matrigel. Des cellules MDCK exprimant stablement Env ou non ont été cultivées en matrigel durant 4 jours. A : L'évolution des formations cellulaires en matrigel a été suivie durant 4 jours (X10). B : Le cytosquelette d'actine, CDC42 et l'enveloppe de JSRV ont été détectés par immunomarquage avec respectivement de la phalloïdine-TRITC (orange), un anticorps anti CDC42 (orange) et un anticorps anti-Flag (rouge). Les noyaux ont été marqués au DAPI (bleu) (X630). LU : lumière ; ► : pôle apical.

53

II.4 Discussion

fin d'étudier l'impact de l'expression de l'enveloppe de JSRV sur l'organisation du Levtosquelette d'actine, des immunomarquages ont été effectués sur des cellules épithéliales de la lignée MDCK cultivées en monocouche et exprimant l'enveloppe de JSRV de façon stable ou transitoire. Nous avons mis en évidence une désorganisation du cytosquelette d'actine sous l'effet de l'expression de Env. En effet, ni les fibres de stress constitués d'actine polymérisée ni le réseau d'actine corticale n'étaient visibles dans les cellules exprimant l'enveloppe, l'actine y apparaissant majoritairement non polymérisée avec une localisation cytoplasmique et péri-nucléaire. La diminution des fibres de stress dans les cellules a été observée lors d'infection avec d'autres virus. Lors de l'infection par le rétrovirus RSV, le produit de l'expression de l'oncogène src induit une diminution des fibres de stress d'actine dans des fibroblastes murins NIH3T3 (231). La diminution des fibres de stress n'est pas due à un défaut de polymérisation de l'actine F mais plutôt à une réorganisation de l'actine F en agrégats localisés aux points focaux d'adhésion (232). Dès les étapes précoces de l'infection par HPV, une diminution des fibres de stress et une forte induction de la formation de filopodes sont observées (233). Le virus de la rage induit une diminution de l'actine F due, non pas à une action directe sur la polymérisation de l'actine, mais plutôt à une action de la nucléocapside sur des protéines se liant à l'actine et permettant sa polymérisation (234). La désorganisation du cytosquelette d'actine au sein des cellules épithéliales infectées par un virus induit une perte d'adhérence des cellules et un relâchement des jonctions cellules/cellules permettant aux virus de mieux pénétrer dans l'épithélium qui agit comme une barrière vis-à-vis de l'infection virale (230).

Afin de se rapprocher des conditions physiologiques présentes dans un épithélium et d'étudier l'effet de l'enveloppe de JSRV sur la polarisation des cellules, les cellules MDCK ont été cultivées sur du Matrigel, une matrice extracellulaire produit par les cellules de sarcome murin Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) et composé principalement de laminine, de collagène IV et d'entactine (235) . La culture des cellules MDCK en Matrigel est un outil reconnu pour l'étude de l'organisation des épithéliums, de la formation des lumières et de la polarisation des cellules dans des conditions proches des conditions physiologiques (236). Des cellules MDCK exprimant l'enveloppe de JSRV de façon stable ont été cultivées en Matrigel et l'organisation des cellules, le cytosquelette d'actine et la localisation de CDC42 ont été comparés avec les cellules MDCK normales. Les cellules MDCK formaient comme attendu des acini, composés d'un ensemble de cellules organisées autour d'une lumière. L'actine et CDC42 étaient concentrés au pôle apical des cellules, conformément aux précédentes descriptions (236, 237), attestant d'une polarisation des cellules dont le pôle apical est situé vers la lumière (235). En effet, l'accumulation de CDC42 actif au pôle apical permet la polarisation des cellules *via* le recrutement du complexe Par6/aPKC (237). Martin-Bellemonte *et al.* ont montré que la protéine CDC42 localisée à la membrane plasmique apicale était active (237). CDC42 est indispensable à la formation des lumens en permettant l'exocytose de larges vacuoles cellulaires grâce au réarrangement du cytosquelette d'actine qu'il induit (237).

Dans des conditions de culture tridimensionnelles, les cellules MDCK exprimant stablement l'enveloppe de JSRV forment des fibres organisées en réseau et non des acini. D'autres cellules forment ces structures quand elles sont cultivées avec une matrice extracellulaire comme les fibroblastes murins NIH3T3 (238), des cellules épithéliales de rétine (239) ou des cellules de Leydig (240). De façon intéressante, des cellules épithéliales primaires de rein de jeunes souris cultivées en Matrigel sont capables de former des structures tubulaires en présence de facteurs de croissances et/ou d'hormones définis (241). La formation de structures tubulaires organisées en réseau par les cellules épithéliales de rein MDCK exprimant stablement l'enveloppe de JSRV peut être due à l'acquisition de caractères propres aux cellules transformées avec notamment un état de différenciation moins poussé que dans les cellules épithéliales normales.

Nous avons établi que CDC42 interagit avec l'enveloppe virale de JSRV dans les cellules MDCK ce qui pourrait prévenir l'interaction entre CDC42 et ses effecteurs et, par conséquent, la polarisation des cellules et les réarrangements de l'actine nécessaires à la mise en place des acini. En effet, quand CDC42 est inhibé par des siRNA dans les cellules MDCK cultivées en Matrigel, plus de 80 % des sphères formées possèdent plusieurs petits lumières et présentent une diminution de l'actine F et du réseau cortical d'actine (237). Le défaut de polarisation dans les cellules MDCK induit par l'inhibition de CDC42 empêche la formation de la lumière centrale par exocytose et promeut la formation de nombreuses petites lumières par apoptose dans les cellules au centre de la sphère (235).

Au cours de notre étude, nous avons montré que l'expression de l'enveloppe de JSRV dans des cellules MDCK désorganise le cytosquelette d'actine lorsque les cellules sont cultivées en monocouche. En effet les fibres de stress d'actine F et le réseau d'actine cortical ne sont plus

visibles. L'expression stable de l'enveloppe dans les MDCK cultivées en conditions tridimensionnelles ne permet pas la formation normale d'acini et entraine le développement de structures tubulaires organisées en réseau. Les cellules exprimant stablement l'enveloppe montrent un défaut de polarisation et d'organisation du cytosquelette d'actine comme le montrent les localisations diffuses de CDC42 et de l'actine dans le cytoplasme des cellules. Au contraire, les cellules MDCK normales se polarisent comme le montre l'accumulation de CDC42 et de l'actine au pôle apical des cellules. L'effet délétère de l'enveloppe de JSRV sur la mise en place de la polarisation des cellules et sur le cytosquelette d'actine pourrait être un avantage pour le rétrovirus lui permettant ainsi de mieux pénétrer dans les épithéliums bronchiolaires et alvéolaires qu'il infecte.



Discussion générale

fin de mieux comprendre les évènements précoces de la transformation induite par l'enveloppe de JSRV, les protéines cellulaires interagissant avec l'enveloppe de JSRV ont été identifiées par crible double hybride en levure. Parmi les partenaires potentiels, mon travail a porté sur le rôle de la protéine RALBP1.

La formation de complexes RALBP1/Env *in cellulo* a été confirmée par immunoprécipitation et Proximity Ligation Assay (PLA). Le PLA nous a permis de visualiser les évènements d'interaction entre RALBP1 et l'enveloppe de JSRV dans le cytoplasme et à la membrane plasmique des cellules MDCK.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'effet de l'enveloppe de JSRV sur l'expression de RALBP1 dans les cellules MDCK. RALBP1 est sous-exprimé dans les cellules exprimant l'enveloppe, suggérant une régulation négative de RALBP1 par l'enveloppe. Nous avons également mis en évidence une sous-expression de RALBP1 *in vivo* dans des tissus pulmonaires tumoraux et *ex vivo* dans des AECII dérivées de poumons tumoraux. Grâce à nos résultats obtenus dans les cellules MDCK, nous pouvons poser l'hypothèse selon laquelle la sous-expression de RALBP1 dans les tissus tumoraux et dans les cellules primaires tumorales pourrait être liée à l'expression de l'enveloppe de JSRV. Ces résultats contrastent avec la surexpression de RALBP1 rapportée dans de nombreux cancers dont celui du poumon (pour revue (199)). La sous-expression de RALBP1 observée lors des adénocarcinomes pulmonaires provoqués par JSRV pourrait être spécifique à ce cancer viro-induit et plus précisément pourrait être la conséquence de l'expression de l'enveloppe de JSRV.

Nous avons récemment mis en évidence un niveau d'expression des transcrits de RALBP1 similaires dans les tumeurs ou les AECII dérivées de tumeur par rapport à leur contreparties normales. Ceci nous permet de supposer que la régulation négative de l'expression de RALBP1 lors de l'infection par JSRV a lieu au niveau protéique et non transcriptionnel.

Afin d'étudier le rôle des complexes RALBP1/Env dans la transformation induite par l'enveloppe de JSRV, des siRNA spécifiques de RALBP1 ont été utilisés lors des tests de transformation en milieu semi-solide. Nous avons établi que RALBP1 joue un double rôle dans la transformation cellulaire médiée par l'enveloppe de JSRV. D'un côté, l'inhibition de RALBP1

entraine l'augmentation du nombre d'évènements de transformation induits par l'enveloppe de JSRV, ce qui suggère que l'enveloppe interfère avec RALBP1 et induit sa sous-expression afin d'augmenter sa capacité à induire la transformation. De l'autre, l'inhibition de RALBP1 entraîne un ralentissement de la croissance des sphères formées par les cellules transformées, ce qui peut être relié au rôle anti-apoptotique de RALBP1 permettant la prolifération des cellules cancéreuses (200). En effet, dans les lignées cellulaires issues de différents cancers, l'abolition de l'expression de RALBP1 par des siRNA ou le blocage de son rôle de transporteur par la fixation d'anticorps induisent une cytotoxicité (157, 163-165). Chez la souris, l'inhibition de RALBP1 *in vivo* entraîne la régression de tumeurs du poumon (165), du colon (165), de la prostate (163), des reins (164) et de mélanome (157). Il faut également noter que l'inhibition de l'expression de *ralA*, activateur de RALBP1, conduit à une réduction significative de la prolifération et du caractère métastasique des cellules cancéreuses dans des cellules murines dérivées de cancer du poumon non à petites cellules (143).

Nous avons voulu savoir si RALBP1 était une protéine impliquée uniquement dans la transformation par JSRV ou si son rôle était transposable à d'autres rétrovirus. Nous avons choisi d'étudier l'interaction entre RALBP1 et l'enveloppe du bétarétrovirus ENTV, proche de JSRV et responsable des tumeurs nasales chez les petits ruminants. Nous avons montré que RALBP1 interagit avec l'enveloppe d'ENTV dans des cellules MDCK, suggérant un rôle de RALBP1 dans la transformation induite par ENTV. Le rôle de RALBP1 dans la transformation par l'enveloppe d'ENTV sera évalué lors des tests de transformation avec des cellules MDCK exprimant l'enveloppe d'ENTV en présence de siRNA spécifiques de RALBP1.

Nos résultats montrent l'activation de la voie Akt/mTOR/p70S6K par l'enveloppe de JSRV *in vitro, ex vivo* et *in vivo,* confirmant de précédentes études réalisées majoritairement sur des lignées cellulaires (pour revue (5)). Nos conclusions suggèrent une implication plus importante de mTOR et de p70S6K que de Akt dans l'oncogénèse induite par JSRV rejoignant ainsi de précédents travaux montrant une faible implication d'Akt dans la transformation induite par JSRV (134, 135). Nous avons montré que RALBP1 est impliqué dans l'activation de mTOR et p70S6K lors de la transformation par l'enveloppe de JSRV. Similairement, l'implication de RALBP1 dans l'activation de la voie Akt avait déjà été montrée dans des cellules dérivées de cancer du pancréas (242).

L'ensemble de nos résultats nous ont permis d'établir une hypothèse selon laquelle la sousexpression de RALBP1 induite par l'enveloppe de JSRV entrainerait l'activation de CDC42, un activateur de p70S6K dont l'activité est négativement régulée par RALBP1, et ainsi l'activation de p70S6K (Figure 24). CDC42 apparait donc comme une protéine clé dans les dérégulations induites lors de la transformation par Env de JSRV. Cette petite RhoGTPase est connue pour être un acteur majeur de l'organisation dynamique du cytosquelette et de la polarisation lors de processus physiologiques divers comme la prolifération, la mobilité et la croissance cellulaires (201, 202). La deuxième partie de ma thèse a donc été orientée sur CDC42 et notamment sur l'effet de l'expression de l'enveloppe de JSRV sur l'organisation du cytosquelette d'actine et la polarisation des cellules.



Figure 24 : Hypothèse de la régulation de la voie Akt/mTOR/p70S6K et du cytosquelette d'actine via RALBP1 et CDC42 lors de la transformation par l'enveloppe de JSRV. La voie dans les cellules normales (cases bleues) est décrite à gauche et les dérégulations observées lors de l'expression de Env JSRV sont décrites à droite. Les protéines sur-régulées sont indiquées dans des cases rouges et les sous-régulées dans les cases vertes.

Nous avons mis en évidence une désorganisation du cytosquelette d'actine dans les cellules épithéliales MDCK cultivées en monocouche exprimant stablement ou transitoirement l'enveloppe de JSRV. Dans les cellules exprimant l'enveloppe de JSRV, ni le réseau d'actine

corticale ni les fibres de stress ne sont visibles. Dans celles-ci, l'actine est non polymérisée avec une localisation cytoplasmique et péri-nucléaire suggérant que l'expression de l'enveloppe de JSRV dans les cellules MDCK cultivées en monocouche entraînerait un défaut de polymérisation de l'actine.

La désorganisation du cytosquelette d'actine est également visible dans des cellules MDCK exprimant constitutivement l'enveloppe de JSRV et cultivées en condition tridimensionnelle permettant l'étude de la formation des épithéliums et de la polarisation. Les cellules MDCK normales forment des acini constitués de cellules organisées autour d'une lumière et polarisées. L'actine des cellules MDCK organisées en acini est localisée au pôle apical des cellules, comme cela avait été précédemment décrit (236). Au contraire, l'organisation des cellules exprimant stablement l'enveloppe de JSRV était aberrante avec une formation de fibres organisées en réseau et une actine présente de façon diffuse dans le cytoplasme des cellules.

D'après nos résultats, nous pouvons supposer que l'interaction entre CDC42 et l'enveloppe de JSRV prévient l'interaction entre CDC42 et ses effecteurs tels que WASP et PAK, inhibant la polymérisation des microfilaments d'actine (Figures 20 et 24). Dans les cellules épithéliales polarisées, le pôle apical est fortement associé aux microfilaments d'actine. Le réseau des filaments d'actine dans les cellules constituant un épithélium sert de support aux complexes de jonctions cellules/cellules qui assurent la résistance de l'épithélium face aux agressions extérieures, telle que la pénétration des virus (230). Certains virus, pour faciliter leur entrée ou leur dissémination, manipulent le cytosquelette d'actine dès les étapes précoces de l'infection (4). On pourrait imaginer que JSRV désorganise le cytosquelette d'actine afin de pénétrer plus facilement dans l'épithélium pulmonaire.

De nombreux virus ont la capacité de stimuler la formation de structures cellulaires constituées d'actine afin de les utiliser, ou au contraire de les supprimer afin de faciliter l'infection . Ainsi, le virus HSV-1 (Herpes Simplex Virus 1), en plus de son entrée classique par fusion membranaire, augmente l'entrée des virions *via* une voie « endocytose-like» au cours de laquelle l'actine se réarrange pour former des filopodes depuis la surface de la cellule infectée grâce à l'activation de RhoA par le virus (243). Le virus HPV au cours de son entrée stimule la formation de filopodes et entraine la désintégration des fibres de stress via l'activation de tyrosine kinases et de PI3K (233). Le rétrovirus RSV portant l'oncogène *v-src* induit un arrondissement des cellules, une

rétractation du cytoplasme et la formation de microvillosités. L'expression de *v-src* induit le clivage protéolytique des points focaux d'adhérence ce qui contribue à la perte d'adhérence et à la motilité des cellules transformées (244). L'expression de *v-src* dans des fibroblastes murins NIH3T3 entraine la disparition des fibres de stress (4). L'infection par les rotavirus entraîne une baisse de l'intégrité des jonctions entre les cellules de l'épithélium ainsi qu'une désorganisation de l'actine entrainant une augmentation de la perméabilité paracellulaire (245, 246). Le bétarétrovirus oncogène MMTV utilise le cytosquelette d'actine lors de son bourgeonnement à l'extrémité d'une longue microvillosité formée par l'actine (247).

Outre des désorganisations dans le cytosquelette d'actine, nous avons observé une perte de la polarisation dans les cellules MDCK exprimant stablement l'enveloppe de JSRV cultivées en système tridimensionnel. En effet, dans ces cellules organisées en fibres, CDC42 est exprimé de façon diffuse, alors que dans les cellules MDCK organisées en acini, CDC42 est concentré au pôle apical permettant une polarisation des cellules et la formation de la lumière centrale, comme cela avait été précédemment observé (237). CDC42 induit la polarisation des MDCK cultivées en Matrigel *via* le recrutement et l'activation du complexe Par6/aPKC à la membrane cellulaire (237). On peut supposer que l'interaction entre CDC42 et l'enveloppe de JSRV empêche le recrutement du complexe Par6/aPKC et/ou le recrutement de CDC42 à la membrane par Ax2 (Annexine 2), inhibant la polarisation des cellules (Figure 24). Il serait intéressant d'étudier la délocalisation du complexe Par6/aPKC en réponse à l'enveloppe de JSRV.

En perspectives, afin de mieux définir le rôle de l'enveloppe de JSRV dans la modification du cytosquelette d'actine, il sera intéressant d'étudier l'effet de l'expression transitoire de l'enveloppe de JSRV sur le cytosquelette d'actine et sur la polarisation des cellules MDCK cultivées en conditions tridimensionnelles. Nos efforts se porteront parallèlement sur le rôle potentiel de RALBP1 dans la transformation par l'enveloppe d'ENTV. Des siRNA spécifiques de RALBP1 seront utilisés lors de tests de transformations en milieu semi-solide avec des cellules MDCK transformées par l'enveloppe d'ENTV. L'effet de l'expression de l'enveloppe d'ENTV sur l'expression de RALBP1 sera analysé dans des cellules MDCK ainsi que dans des tumeurs nasales de chèvres infectées par ENTV.

Bibliographie

- 1. **Oh JK, Weiderpass E.** 2014. Infection and cancer: global distribution and burden of diseases. Ann Glob Health **80:**384-392.
- 2. de Martel C, Ferlay J, Franceschi S, Vignat J, Bray F, Forman D, Plummer M. 2012. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. Lancet Oncol **13:**607-615.
- Carlson J, Lyon M, Bishop J, Vaiman A, Cribiu E, Mornex JF, Brown S, Knudson D, DeMartini J, Leroux C. 2003. Chromosomal distribution of endogenous Jaagsiekte sheep retrovirus proviral sequences in the sheep genome. J Virol 77:9662-9668.
- 4. **Taylor MP, Koyuncu OO, Enquist LW.** 2011. Subversion of the actin cytoskeleton during viral infection. Nat Rev Microbiol **9:**427-439.
- 5. **Monot M, Archer F, Gomes M, Mornex JF, Leroux C.** 2015. Advances in the study of transmissible respiratory tumours in small ruminants. Vet Microbiol doi:10.1016/j.vetmic.2015.08.008.
- 6. **Vockerodt M, Yap LF, Shannon-Lowe C, Curley H, Wei W, Vrzalikova K, Murray PG.** 2015. The Epstein-Barr virus and the pathogenesis of lymphoma. J Pathol **235**:312-322.
- 7. **Tsao SW, Tsang CM, To KF, Lo KW.** 2015. The role of Epstein-Barr virus in epithelial malignancies. J Pathol **235:**323-333.
- 8. **Chua ML, Wee JT, Hui EP, Chan AT.** 2015. Nasopharyngeal carcinoma. Lancet doi:10.1016/S0140-6736(15)00055-0.
- 9. **Gramolelli S, Schulz TF.** 2015. The role of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus in the pathogenesis of Kaposi sarcoma. J Pathol **235:**368-380.
- 10. **Gessain A, Cassar O.** 2012. Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. Front Microbiol **3**:388.
- 11. **Kannian P, Green PL.** 2010. Human T Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1): Molecular Biology and Oncogenesis. Viruses **2**:2037-2077.
- 12. Verdonck K, Gonzalez E, Van Dooren S, Vandamme AM, Vanham G, Gotuzzo E. 2007. Human T-lymphotropic virus 1: recent knowledge about an ancient infection. Lancet Infect Dis 7:266-281.
- 13. **Payne LN, Nair V.** 2012. The long view: 40 years of avian leukosis research. Avian Pathol **41:**11-19.
- 14. **Rous P.** 1911. A sarcoma of the fowl transmissible by and agents separable from the tumor cells. J Exp Med **13:**397.
- 15. **Ross SR.** 2008. MMTV infectious cycle and the contribution of virus-encoded proteins to transformation of mammary tissue. J Mammary Gland Biol Neoplasia **13**:299-307.
- 16. **Caporale M, Cousens C, Centorame P, Pinoni C, De las Heras M, Palmarini M.** 2006. Expression of the jaagsiekte sheep retrovirus envelope glycoprotein is sufficient to induce lung tumors in sheep. J Virol **80**:8030-8037.
- 17. **De las Heras M, Ortin A, Cousens C, Minguijon E, Sharp JM.** 2003. Enzootic nasal adenocarcinoma of sheep and goats. Curr Top Microbiol Immunol **275:**201-223.
- Gillet N, Florins A, Boxus M, Burteau C, Nigro A, Vandermeers F, Balon H, Bouzar AB, Defoiche J, Burny A, Reichert M, Kettmann R, Willems L. 2007. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. Retrovirology 4:18.
- 19. **Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE.** 1997. The Interactions of Retroviruses and their Hosts. *In* Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE (ed), Retroviruses, Cold Spring Harbor (NY).
- 20. Jern P, Coffin JM. 2008. Effects of retroviruses on host genome function. Annu Rev Genet 42:709-732.
- 21. **Adelson DL, Raison JM, Edgar RC.** 2009. Characterization and distribution of retrotransposons and simple sequence repeats in the bovine genome. Proc Natl Acad Sci U S A **106**:12855-12860.

- 22. **Kurth R, Bannert N.** 2010. Beneficial and detrimental effects of human endogenous retroviruses. Int J Cancer **126**:306-314.
- 23. Blond JL, Lavillette D, Cheynet V, Bouton O, Oriol G, Chapel-Fernandes S, Mandrand B, Mallet F, Cosset FL. 2000. An envelope glycoprotein of the human endogenous retrovirus HERV-W is expressed in the human placenta and fuses cells expressing the type D mammalian retrovirus receptor. J Virol 74:3321-3329.
- 24. **Vogt PK.** 2012. Retroviral oncogenes: a historical primer. Nat Rev Cancer **12**:639-648.
- 25. Hanahan D, Weinberg RA. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell **144:**646-674.
- 26. **Temin HM, Rubin H.** 1958. Characteristics of an assay for Rous sarcoma virus and Rous sarcoma cells in tissue culture. Virology **6**:669-688.
- 27. **Stehelin D, Varmus HE, Bishop JM, Vogt PK.** 1976. DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. Nature **260**:170-173.
- 28. Levinson AD, Oppermann H, Levintow L, Varmus HE, Bishop JM. 1978. Evidence that the transforming gene of avian sarcoma virus encodes a protein kinase associated with a phosphoprotein. Cell **15:**561-572.
- 29. **Pawson T.** 2004. Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-SH2 domain interactions to complex cellular systems. Cell **116**:191-203.
- 30. **Sadowski I, Stone JC, Pawson T.** 1986. A noncatalytic domain conserved among cytoplasmic protein-tyrosine kinases modifies the kinase function and transforming activity of Fujinami sarcoma virus P130gag-fps. Mol Cell Biol **6**:4396-4408.
- 31. **Sheiness D, Fanshier L, Bishop JM.** 1978. Identification of nucleotide sequences which may encode the oncogenic capacity of avian retrovirus MC29. J Virol **28:**600-610.
- 32. **Dalla-Favera R, Bregni M, Erikson J, Patterson D, Gallo RC, Croce CM.** 1982. Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. Proc Natl Acad Sci U S A **79**:7824-7827.
- 33. Schwab M, Ellison J, Busch M, Rosenau W, Varmus HE, Bishop JM. 1984. Enhanced expression of the human gene N-myc consequent to amplification of DNA may contribute to malignant progression of neuroblastoma. Proc Natl Acad Sci U S A **81**:4940-4944.
- 34. **Graf T, Beug H.** 1983. Role of the v-erbA and v-erbB oncogenes of avian erythroblastosis virus in erythroid cell transformation. Cell **34:**7-9.
- 35. **Downward J, Yarden Y, Mayes E, Scrace G, Totty N, Stockwell P, Ullrich A, Schlessinger J, Waterfield MD.** 1984. Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. Nature **307**:521-527.
- 36. **Boerner JL, Danielsen A, Maihle NJ.** 2003. Ligand-independent oncogenic signaling by the epidermal growth factor receptor: v-ErbB as a paradigm. Exp Cell Res **284:**111-121.
- 37. Paez JG, Janne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, Herman P, Kaye FJ, Lindeman N, Boggon TJ, Naoki K, Sasaki H, Fujii Y, Eck MJ, Sellers WR, Johnson BE, Meyerson M. 2004. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. Science 304:1497-1500.
- 38. **Fan H, Johnson C.** 2011. Insertional oncogenesis by non-acute retroviruses: implications for gene therapy. Viruses **3**:398-422.
- 39. Scheffzek K, Ahmadian MR, Kabsch W, Wiesmuller L, Lautwein A, Schmitz F, Wittinghofer A. 1997. The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. Science **277:**333-338.
- 40. Santos E, Martin-Zanca D, Reddy EP, Pierotti MA, Della Porta G, Barbacid M. 1984. Malignant activation of a K-ras oncogene in lung carcinoma but not in normal tissue of the same patient. Science **223:**661-664.
- 41. **Bellacosa A, Kumar CC, Di Cristofano A, Testa JR.** 2005. Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting. Adv Cancer Res **94:**29-86.
- 42. Shah A, Swain WA, Richardson D, Edwards J, Stewart DJ, Richardson CM, Swinson DE, Patel D, Jones JL, O'Byrne KJ. 2005. Phospho-akt expression is associated with a favorable outcome in non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res **11**:2930-2936.

- 43. **Bellacosa A, Testa JR, Staal SP, Tsichlis PN.** 1991. A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. Science **254:**274-277.
- 44. Chang HW, Aoki M, Fruman D, Auger KR, Bellacosa A, Tsichlis PN, Cantley LC, Roberts TM, Vogt PK. 1997. Transformation of chicken cells by the gene encoding the catalytic subunit of PI 3-kinase. Science **276**:1848-1850.
- 45. **Hayward WS, Neel BG, Astrin SM.** 1981. Activation of a cellular onc gene by promoter insertion in ALV-induced lymphoid leukosis. Nature **290:**475-480.
- 46. **Nusse R, Varmus HE.** 1982. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. Cell **31:**99-109.
- 47. Selten G, Cuypers HT, Zijlstra M, Melief C, Berns A. 1984. Involvement of c-myc in MuLVinduced T cell lymphomas in mice: frequency and mechanisms of activation. EMBO J **3**:3215-3222.
- 48. **Forrest D, Onions D, Lees G, Neil JC.** 1987. Altered structure and expression of c-myc in feline T-cell tumours. Virology **158**:194-205.
- 49. **Mulloy JC, Kislyakova T, Cereseto A, Casareto L, LoMonico A, Fullen J, Lorenzi MV, Cara A, Nicot C, Giam C, Franchini G.** 1998. Human T-cell lymphotropic/leukemia virus type 1 Tax abrogates p53-induced cell cycle arrest and apoptosis through its CREB/ATF functional domain. J Virol **72:**8852-8860.
- 50. **Sun SC, Yamaoka S.** 2005. Activation of NF-kappaB by HTLV-I and implications for cell transformation. Oncogene **24:**5952-5964.
- 51. **Karin M.** 2006. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. Nature **441:**431-436.
- 52. **Ruscetti SK.** 1999. Deregulation of erythropoiesis by the Friend spleen focus-forming virus. Int J Biochem Cell Biol **31:**1089-1109.
- 53. **Alian A, Sela-Donenfeld D, Panet A, Eldor A.** 2000. Avian hemangioma retrovirus induces cell proliferation via the envelope (env) gene. Virology **276:**161-168.
- 54. **Katz E, Lareef MH, Rassa JC, Grande SM, King LB, Russo J, Ross SR, Monroe JG.** 2005. MMTV Env encodes an ITAM responsible for transformation of mammary epithelial cells in threedimensional culture. J Exp Med **201**:431-439.
- 55. **Rosati S, Pittau M, Alberti A, Pozzi S, York DF, Sharp JM, Palmarini M.** 2000. An accessory open reading frame (orf-x) of jaagsiekte sheep retrovirus is conserved between different virus isolates. Virus Res **66**:109-116.
- 56. **Palmarini M, Murgia C, Fan H.** 2002. Spliced and prematurely polyadenylated Jaagsiekte Sheep Retrovirus-specific RNAs from infected or transfected cells. Virology **294:**180-188.
- 57. **Bai J, Bishop JV, Carlson JO, DeMartini JC.** 1999. Sequence comparison of JSRV with endogenous proviruses: envelope genotypes and a novel ORF with similarity to a G-protein-coupled receptor. Virology **258**:333-343.
- 58. **Rai SK, Duh FM, Vigdorovich V, Danilkovitch-Miagkova A, Lerman MI, Miller AD.** 2001. Candidate tumor suppressor HYAL2 is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored cellsurface receptor for jaagsiekte sheep retrovirus, the envelope protein of which mediates oncogenic transformation. Proc Natl Acad Sci U S A **98**:4443-4448.
- 59. **Dirks C, Duh FM, Rai SK, Lerman MI, Miller AD.** 2002. Mechanism of cell entry and transformation by enzootic nasal tumor virus. J Virol **76:**2141-2149.
- 60. **Miller AD.** 2003. Identification of Hyal2 as the cell-surface receptor for jaagsiekte sheep retrovirus and ovine nasal adenocarcinoma virus. Curr Top Microbiol Immunol **275:**179-199.
- 61. Bouga H, Tsouros I, Bounias D, Kyriakopoulou D, Stavropoulos MS, Papageorgakopoulou N, Theocharis DA, Vynios DH. 2010. Involvement of hyaluronidases in colorectal cancer. BMC Cancer **10:**499.
- 62. Vigdorovich V, Miller AD, Strong RK. 2007. Ability of hyaluronidase 2 to degrade extracellular hyaluronan is not required for its function as a receptor for jaagsiekte sheep retrovirus. J Virol 81:3124-3129.

- 63. **Cote M, Zheng YM, Albritton LM, Liu SL.** 2011. Single residues in the surface subunits of oncogenic sheep retrovirus envelopes distinguish receptor-mediated triggering for fusion at low pH and infection. Virology **421:**173-183.
- 64. **Cote M, Kucharski TJ, Liu SL.** 2008. Enzootic nasal tumor virus envelope requires a very acidic pH for fusion activation and infection. J Virol **82:**9023-9034.
- 65. **Palmarini M, Holland MJ, Cousens C, Dalziel RG, Sharp JM.** 1996. Jaagsiekte retrovirus establishes a disseminated infection of the lymphoid tissues of sheep affected by pulmonary adenomatosis. J Gen Virol **77**:2991-2998.
- 66. **Holland MJ, Palmarini M, Garcia-Goti M, Gonzalez L, McKendrick I, de las Heras M, Sharp JM.** 1999. Jaagsiekte retrovirus is widely distributed both in T and B lymphocytes and in mononuclear phagocytes of sheep with naturally and experimentally acquired pulmonary adenomatosis. J Virol **73:**4004-4008.
- 67. **Palmarini M, Dewar P, De las Heras M, Inglis NF, Dalziel RG, Sharp JM.** 1995. Epithelial tumour cells in the lungs of sheep with pulmonary adenomatosis are major sites of replication for Jaagsiekte retrovirus. J Gen Virol **76:**2731-2737.
- 68. **Platt JA, Kraipowich N, Villafane F, DeMartini JC.** 2002. Alveolar type II cells expressing jaagsiekte sheep retrovirus capsid protein and surfactant proteins are the predominant neoplastic cell type in ovine pulmonary adenocarcinoma. Vet Pathol **39:**341-352.
- 69. Archer F, Mornex JF, Leroux C. 2012. Interplay between JSRV, an oncogenic retrovirus, and the pulmonary epithelium. Current Immunology Reviews 7:209-215.
- 70. **Palmarini M, Sharp JM, Lee C, Fan H.** 1999. In vitro infection of ovine cell lines by Jaagsiekte sheep retrovirus. J Virol **73:**10070-10078.
- 71. Archer F, Jacquier E, Lyon M, Chastang J, Cottin V, Mornex JF, Leroux C. 2007. Alveolar type II cells isolated from pulmonary adenocarcinoma: a model for JSRV expression in vitro. Am J Respir Cell Mol Biol **36:**534-540.
- 72. Yu DL, Linnerth-Petrik NM, Halbert CL, Walsh SR, Miller AD, Wootton SK. 2011. Jaagsiekte sheep retrovirus and enzootic nasal tumor virus promoters drive gene expression in all airway epithelial cells of mice but only induce tumors in the alveolar region of the lungs. J Virol **85:**7535-7545.
- 73. **McGee-Estrada K, Palmarini M, Fan H.** 2002. HNF-3beta Is a Critical Factor for the Expression of the Jaagsiekte Sheep Retrovirus Long Terminal Repeat in Type II Pneumocytes but Not in Clara Cells. Virology **292:**87-97.
- 74. **Palmarini M, Datta S, Omid R, Murgia C, Fan H.** 2000. The long terminal repeat of jaagsiekte sheep retrovirus is preferentially active in differentiated epithelial cells of the lungs. J Virol **74:**5776-5787.
- 75. **McGee-Estrada K, Fan H.** 2006. In vivo and in vitro analysis of factor binding sites in Jaagsiekte sheep retrovirus long terminal repeat enhancer sequences: roles of HNF-3, NF-I, and C/EBP for activity in lung epithelial cells. J Virol **80:**332-341.
- 76. **McGee-Estrada K, Fan H.** 2007. Comparison of LTR enhancer elements in sheep betaretroviruses: insights into the basis for tissue-specific expression. Virus Genes **35**:303-312.
- 77. **DeMartini JC, Carlson JO, Leroux C, Spencer T, Palmarini M.** 2003. Endogenous retroviruses related to jaagsiekte sheep retrovirus. Curr Top Microbiol Immunol **275:**117-137.
- 78. Hecht SJ, Stedman KE, Carlson JO, DeMartini JC. 1996. Distribution of endogenous type B and type D sheep retrovirus sequences in ungulates and other mammals. Proc Natl Acad Sci U S A 93:3297-3302.
- 79. **Sistiaga-Poveda M, Jugo BM.** 2014. Evolutionary dynamics of endogenous Jaagsiekte sheep retroviruses proliferation in the domestic sheep, mouflon and Pyrenean chamois. Heredity (Edinb) **112:**571-578.
- 80. Armezzani A, Varela M, Spencer TE, Palmarini M, Arnaud F. 2014. "Menage a Trois": the evolutionary interplay between JSRV, enJSRVs and domestic sheep. Viruses 6:4926-4945.
- 81. **Palmarini M, Hallwirth C, York D, Murgia C, de Oliveira T, Spencer T, Fan H.** 2000. Molecular cloning and functional analysis of three type D endogenous retroviruses of sheep reveal a

different cell tropism from that of the highly related exogenous jaagsiekte sheep retrovirus. J Virol **74:**8065-8076.

- 82. **Spencer TE, Mura M, Gray CA, Griebel PJ, Palmarini M.** 2003. Receptor usage and fetal expression of ovine endogenous betaretroviruses: implications for coevolution of endogenous and exogenous retroviruses. J Virol **77**:749-753.
- 83. **Arnaud F, Murcia PR, Palmarini M.** 2007. Mechanisms of Late Restriction Induced by an Endogenous Retrovirus. J Virol.
- 84. **Murcia PR, Arnaud F, Palmarini M.** 2007. The transdominant endogenous retrovirus enJS56A1 associates with and blocks intracellular trafficking of Jaagsiekte sheep retrovirus Gag. J Virol **81:**1762-1772.
- 85. **Mura M, Murcia P, Caporale M, Spencer TE, Nagashima K, Rein A, Palmarini M.** 2004. Late viral interference induced by transdominant Gag of an endogenous retrovirus. Proc Natl Acad Sci U S A **101**:11117-11122.
- 86. **Viginier B, Dolmazon C, Lantier I, Lantier F, Archer F, Leroux C, Terzian C.** 2012. Copy Number Variation and Differential Expression of a Protective Endogenous Retrovirus in Sheep. PLos ONE **7**:e41965.
- 87. **Dunlap KA, Palmarini M, Spencer TE.** 2006. Ovine Endogenous Betaretroviruses (enJSRVs) and Placental Morphogenesis. Placenta.
- 88. **Palmarini M, Mura M, Spencer TE.** 2004. Endogenous betaretroviruses of sheep: teaching new lessons in retroviral interference and adaptation. J Gen Virol **85:**1-13.
- 89. **Dunlap KA, Palmarini M, Varela M, Burghardt RC, Hayashi K, Farmer JL, Spencer TE.** 2006. Endogenous retroviruses regulate periimplantation placental growth and differentiation. Proc Natl Acad Sci U S A **103**:14390-14395.
- 90. **Martins H, Villesen P.** 2011. Improved integration time estimation of endogenous retroviruses with phylogenetic data. PLoS One **6:**e14745.
- 91. Arnaud F, Caporale M, Varela M, Biek R, Chessa B, Alberti A, Golder M, Mura M, Zhang YP, Yu L, Pereira F, Demartini JC, Leymaster K, Spencer TE, Palmarini M. 2007. A paradigm for virus-host coevolution: sequential counter-adaptations between endogenous and exogenous retroviruses. PLoS Pathog **3:**e170.
- 92. Chessa B, Pereira F, Arnaud F, Amorim A, Goyache F, Mainland I, Kao RR, Pemberton JM, Beraldi D, Stear MJ, Alberti A, Pittau M, Iannuzzi L, Banabazi MH, Kazwala RR, Zhang YP, Arranz JJ, Ali BA, Wang Z, Uzun M, Dione MM, Olsaker I, Holm LE, Saarma U, Ahmad S, Marzanov N, Eythorsdottir E, Holland MJ, Ajmone-Marsan P, Bruford MW, Kantanen J, Spencer TE, Palmarini M. 2009. Revealing the history of sheep domestication using retrovirus integrations. Science 324:532-536.
- 93. Leroux C, Girard N, Cottin V, Greenland T, Mornex JF, Archer F. 2007. Jaagsiekte Sheep Retrovirus (JSRV): from virus to lung cancer in sheep. Vet Res **38:**211-228.
- 94. **Griffiths DJ, Martineau HM, Cousens C.** 2010. Pathology and pathogenesis of ovine pulmonary adenocarcinoma. J Comp Pathol **142:**260-283.
- 95. **Perk K, Michalides R, Spiegelman S, Schlom J.** 1974. Biochemical and morphologic evidence for the presence of an RNA tumor virus in pulmonary carcinoma of sheep (Jaagsiekte). J Natl Cancer Inst **53**:131-135.
- 96. Herring AJ, Sharp JM, Scott FM, Angus KW. 1983. Further evidence for a retrovirus as the aetiological agent of sheep pulmonary adenomatosis (jaagsiekte). Vet Microbiol 8:237-249.
- 97. Martin WB, Scott FM, Sharp JM, Angus KW, Norval M. 1976. Experimental production of sheep pulmonary adenomatosis (Jaagsiekte). Nature **264:**183-185.
- 98. Verwoerd DW, De Villiers EM, Tustin RC. 1980. Aetiology of jaagsiekte: experimental transmission to lambs by means of cultured cells and cell homogenates. Onderstepoort J Vet Res 47:13-18.
- 99. Verwoerd DW, Williamson AL, De Villiers EM. 1980. Aetiology of jaagsiekte: transmission by means of subcellular fractions and evidence for the involvement of a retrovirus. Onderstepoort J Vet Res 47:275-280.

- 100. Sharp JM, Angus KW, Gray EW, Scott FM. 1983. Rapid transmission of sheep pulmonary adenomatosis (jaagsiekte) in young lambs. Brief report. Arch Virol **78:**89-95.
- 101. **Palmarini M, Sharp JM, de las Heras M, Fan H.** 1999. Jaagsiekte sheep retrovirus is necessary and sufficient to induce a contagious lung cancer in sheep. J Virol **73:**6964-6972.
- 102. York DF, Vigne R, Verwoerd DW, Querat G. 1991. Isolation, identification, and partial cDNA cloning of genomic RNA of jaagsiekte retrovirus, the etiological agent of sheep pulmonary adenomatosis. J Virol 65:5061-5067.
- 103. York DF, Vigne R, Verwoerd DW, Querat G. 1992. Nucleotide sequence of the jaagsiekte retrovirus, an exogenous and endogenous type D and B retrovirus of sheep and goats. J Virol 66:4930-4939.
- 104. **Dungal N.** 1938. Epizootic Adenomatosis of the Lungs of Sheep: Its Relation to Verminous Pneumonia and Jaagsiekte: (Section of Comparative Medicine). Proc R Soc Med **31:**497-505.
- 105. **Giles J, Knight J.** 2003. Dolly's death leaves researchers woolly on clone ageing issue. Nature **421:**776.
- 106. Caporale M, Centorame P, Giovannini A, Sacchini F, Di Ventura M, De las Heras M, Palmarini M. 2005. Infection of lung epithelial cells and induction of pulmonary adenocarcinoma is not the most common outcome of naturally occurring JSRV infection during the commercial lifespan of sheep. Virology **338**:144-153.
- Grego E, De Meneghi D, Alvarez V, Benito AA, Minguijon E, Ortin A, Mattoni M, Moreno B, Perez de Villarreal M, Alberti A, Capucchio MT, Caporale M, Juste R, Rosati S, De las Heras M. 2008. Colostrum and milk can transmit jaagsiekte retrovirus to lambs. Vet Microbiol 130:247-257.
- 108. **Voigt K, Kramer U, Brugmann M, Dewar P, Sharp JM, Ganter M.** 2007. Eradication of ovine pulmonary adenocarcinoma by motherless rearing of lambs. Vet Rec **161:**129-132.
- 109. Salvatori D, Gonzalez L, Dewar P, Cousens C, de las Heras M, Dalziel RG, Sharp JM. 2004. Successful induction of ovine pulmonary adenocarcinoma in lambs of different ages and detection of viraemia during the preclinical period. J Gen Virol **85**:3319-3324.
- 110. **Cousens C, Thonur L, Imlach S, Crawford J, Sales J, Griffiths DJ.** 2009. Jaagsiekte sheep retrovirus is present at high concentration in lung fluid produced by ovine pulmonary adenocarcinoma-affected sheep and can survive for several weeks at ambient temperatures. Res Vet Sci **87:**154-156.
- 111. **De las Heras M, Gonzalez L, Sharp JM.** 2003. Pathology of ovine pulmonary adenocarcinoma. Curr Top Microbiol Immunol **275:**25-54.
- 112. Mason RJ. 2006. Biology of alveolar type II cells. Respirology **11 Suppl:**S12-15.
- 113. Whitsett JA, Wert SE, Weaver TE. 2010. Alveolar surfactant homeostasis and the pathogenesis of pulmonary disease. Annu Rev Med **61:**105-119.
- 114. **Rock JR, Hogan BL.** 2011. Epithelial Progenitor Cells in Lung Development, Maintenance, Repair, and Disease. Annu Rev Cell Dev Biol **27:**493-512.
- 115. **Kotton DN, Morrisey EE.** 2014. Lung regeneration: mechanisms, applications and emerging stem cell populations. Nat Med **20:**822-832.
- 116. **Reynolds SD, Malkinson AM.** 2010. Clara cell: progenitor for the bronchiolar epithelium. Int J Biochem Cell Biol **42:**1-4.
- 117. Widdicombe JG, Pack RJ. 1982. The Clara cell. Eur J Respir Dis 63:202-220.
- 118. **Maeda N, Palmarini M, Murgia C, Fan H.** 2001. Direct transformation of rodent fibroblasts by jaagsiekte sheep retrovirus DNA. Proc Natl Acad Sci U S A **98:**4449-4454.
- 119. **Hofacre A, Fan H.** 2004. Multiple domains of the Jaagsiekte sheep retrovirus envelope protein are required for transformation of rodent fibroblasts. J Virol **78**:10479-10489.
- 120. Danilkovitch-Miagkova A, Duh FM, Kuzmin I, Angeloni D, Liu SL, Miller AD, Lerman MI. 2003. Hyaluronidase 2 negatively regulates RON receptor tyrosine kinase and mediates transformation of epithelial cells by jaagsiekte sheep retrovirus. Proc Natl Acad Sci U S A 100:4580-4585.

- 121. **Maeda N, Fu W, Ortin A, de las Heras M, Fan H.** 2005. Roles of the Ras-MEK-mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase-Akt-mTOR pathways in Jaagsiekte sheep retrovirus-induced transformation of rodent fibroblast and epithelial cell lines. J Virol **79:**4440-4450.
- 122. Liu SL, Miller AD. 2005. Transformation of madin-darby canine kidney epithelial cells by sheep retrovirus envelope proteins. J Virol **79:**927-933.
- 123. **Wootton SK, Halbert CL, Miller AD.** 2005. Sheep retrovirus structural protein induces lung tumours. Nature **434:**904-907.
- 124. Linnerth-Petrik NM, Santry LA, Yu DL, Wootton SK. 2012. Adeno-associated virus vector mediated expression of an oncogenic retroviral envelope protein induces lung adenocarcinomas in immunocompetent mice. PLoS One **7**:e51400.
- 125. **Alberti A, Murgia C, Liu SL, Mura M, Cousens C, Sharp M, Miller AD, Palmarini M.** 2002. Envelope-induced cell transformation by ovine betaretroviruses. J Virol **76:**5387-5394.
- 126. Liu SL, Duh FM, Lerman MI, Miller AD. 2003. Role of virus receptor Hyal2 in oncogenic transformation of rodent fibroblasts by sheep betaretrovirus env proteins. J Virol **77:**2850-2858.
- 127. Allen TE, Sherrill KJ, Crispell SM, Perrott MR, Carlson JO, DeMartini JC. 2002. The jaagsiekte sheep retrovirus envelope gene induces transformation of the avian fibroblast cell line DF-1 but does not require a conserved SH2 binding domain. J Gen Virol **83**:2733-2742.
- 128. **Hull S, Fan H.** 2006. Mutational analysis of the cytoplasmic tail of jaagsiekte sheep retrovirus envelope protein. J Virol **80:**8069-8080.
- 129. **Palmarini M, Maeda N, Murgia C, De-Fraja C, Hofacre A, Fan H.** 2001. A phosphatidylinositol 3-kinase docking site in the cytoplasmic tail of the jaagsiekte sheep retrovirus transmembrane protein is essential for envelope-induced transformation of nih 3t3 cells. J Virol **75:**11002-11009.
- 130. Liu SL, Lerman MI, Miller AD. 2003. Putative phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) binding motifs in ovine betaretrovirus Env proteins are not essential for rodent fibroblast transformation and PI3K/Akt activation. J Virol **77**:7924-7935.
- 131. Chow YH, Alberti A, Mura M, Pretto C, Murcia P, Albritton LM, Palmarini M. 2003. Transformation of rodent fibroblasts by the jaagsiekte sheep retrovirus envelope is receptor independent and does not require the surface domain. J Virol **77:**6341-6350.
- 132. Varela M, Chow YH, Sturkie C, Murcia P, Palmarini M. 2006. Association of RON tyrosine kinase with the Jaagsiekte sheep retrovirus envelope glycoprotein. Virology **350**:347-357.
- 133. **Johnson C, Sanders K, Fan H.** 2010. Jaagsiekte sheep retrovirus transformation in Madin-Darby canine kidney epithelial cell three-dimensional culture. J Virol **84:**5379-5390.
- Suau F, Cottin V, Archer F, Croze S, Chastang J, Cordier G, Thivolet-Bejui F, Mornex JF, Leroux
 C. 2006. Telomerase activation in a model of lung adenocarcinoma. Eur Respir J 27:1175-1182.
- 135. **Zavala G, Pretto C, Chow YH, Jones L, Alberti A, Grego E, De las Heras M, Palmarini M.** 2003. Relevance of Akt phosphorylation in cell transformation induced by Jaagsiekte sheep retrovirus. Virology **312:**95-105.
- 136. **Maeda N, Inoshima Y, Fruman DA, Brachmann SM, Fan H.** 2003. Transformation of mouse fibroblasts by Jaagsiekte sheep retrovirus envelope does not require phosphatidylinositol 3-kinase. J Virol **77:**9951-9959.
- 137. **Mocellin S, Pooley KA, Nitti D.** 2013. Telomerase and the search for the end of cancer. Trends Mol Med **19:**125-133.
- 138. **Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH.** 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. Endocr Rev **22**:153-183.
- Chang F, Steelman LS, Lee JT, Shelton JG, Navolanic PM, Blalock WL, Franklin RA, McCubrey JA. 2003. Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention. Leukemia 17:1263-1293.

- 140. **Ballif BA, Blenis J.** 2001. Molecular mechanisms mediating mammalian mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)-MAPK cell survival signals. Cell Growth Differ **12**:397-408.
- 141. **De Las Heras M, Ortin A, Benito A, Summers C, Ferrer LM, Sharp JM.** 2006. In-situ Demonstration of Mitogen-activated Protein Kinase Erk 1/2 Signalling Pathway in Contagious Respiratory Tumours of Sheep and Goats. J Comp Pathol **135:**1-10.
- 142. **Mott HR, Owen D.** 2010. RLIP76 (RalBP1): The first piece of the structural puzzle. Small GTPases **1:**157-160.
- 143. Male H, Patel V, Jacob MA, Borrego-Diaz E, Wang K, Young DA, Wise AL, Huang C, Van Veldhuizen P, O'Brien-Ladner A, Williamson SK, Taylor SA, Tawfik O, Esfandyari T, Farassati F. 2012. Inhibition of RalA signaling pathway in treatment of non-small cell lung cancer. Lung Cancer 77:252-259.
- 144. **Jullien-Flores V, Mahe Y, Mirey G, Leprince C, Meunier-Bisceuil B, Sorkin A, Camonis JH.** 2000. RLIP76, an effector of the GTPase Ral, interacts with the AP2 complex: involvement of the Ral pathway in receptor endocytosis. J Cell Sci **113 (Pt 16)**:2837-2844.
- 145. **Ikeda M, Ishida O, Hinoi T, Kishida S, Kikuchi A.** 1998. Identification and characterization of a novel protein interacting with Ral-binding protein 1, a putative effector protein of Ral. J Biol Chem **273:**814-821.
- 146. **Coon BG, Burgner J, Camonis JH, Aguilar RC.** 2010. The epsin family of endocytic adaptors promotes fibrosarcoma migration and invasion. J Biol Chem **285**:33073-33081.
- 147. Kariya K, Koyama S, Nakashima S, Oshiro T, Morinaka K, Kikuchi A. 2000. Regulation of complex formation of POB1/epsin/adaptor protein complex 2 by mitotic phosphorylation. J Biol Chem **275**:18399-18406.
- 148. **Rosse C, L'Hoste S, Offner N, Picard A, Camonis J.** 2003. RLIP, an effector of the Ral GTPases, is a platform for Cdk1 to phosphorylate epsin during the switch off of endocytosis in mitosis. J Biol Chem **278**:30597-30604.
- 149. Singhal SS, Yadav S, Drake K, Singhal J, Awasthi S. 2008. Hsf-1 and POB1 induce drug sensitivity and apoptosis by inhibiting Ralbp1. J Biol Chem **283**:19714-19729.
- 150. Yang Y, Sharma A, Sharma R, Patrick B, Singhal SS, Zimniak P, Awasthi S, Awasthi YC. 2003. Cells preconditioned with mild, transient UVA irradiation acquire resistance to oxidative stress and UVA-induced apoptosis: role of 4-hydroxynonenal in UVA-mediated signaling for apoptosis. J Biol Chem **278**:41380-41388.
- 151. Awasthi S, Singhal SS, Yadav S, Singhal J, Vatsyayan R, Zajac E, Luchowski R, Borvak J, Gryczynski K, Awasthi YC. 2010. A central role of RLIP76 in regulation of glycemic control. Diabetes **59**:714-725.
- 152. Cheng JZ, Sharma R, Yang Y, Singhal SS, Sharma A, Saini MK, Singh SV, Zimniak P, Awasthi S, Awasthi YC. 2001. Accelerated metabolism and exclusion of 4-hydroxynonenal through induction of RLIP76 and hGST5.8 is an early adaptive response of cells to heat and oxidative stress. J Biol Chem **276**:41213-41223.
- 153. Awasthi S, Singhal SS, Yadav S, Singhal J, Drake K, Nadkar A, Zajac E, Wickramarachchi D, Rowe N, Yacoub A, Boor P, Dwivedi S, Dent P, Jarman WE, John B, Awasthi YC. 2005. RLIP76 is a major determinant of radiation sensitivity. Cancer Res **65**:6022-6028.
- 154. Singhal SS, Yadav S, Vatsyayan R, Chaudhary P, Borvak J, Singhal J, Awasthi S. 2009. Increased expression of cdc2 inhibits transport function of RLIP76 and promotes apoptosis. Cancer Lett 283:152-158.
- 155. Yadav S, Zajac E, Singhal SS, Singhal J, Drake K, Awasthi YC, Awasthi S. 2005. POB1 overexpression inhibits RLIP76-mediated transport of glutathione-conjugates, drugs and promotes apoptosis. Biochem Biophys Res Commun **328:**1003-1009.
- 156. **Hu Y, Mivechi NF.** 2003. HSF-1 interacts with Ral-binding protein 1 in a stress-responsive, multiprotein complex with HSP90 in vivo. J Biol Chem **278:**17299-17306.
- 157. **Singhal SS, Awasthi YC, Awasthi S.** 2006. Regression of melanoma in a murine model by RLIP76 depletion. Cancer Res **66**:2354-2360.

- 158. Lim KH, Brady DC, Kashatus DF, Ancrile BB, Der CJ, Cox AD, Counter CM. 2010. Aurora-A phosphorylates, activates, and relocalizes the small GTPase RalA. Mol Cell Biol **30**:508-523.
- 159. **Kashatus DF, Lim KH, Brady DC, Pershing NL, Cox AD, Counter CM.** 2011. RALA and RALBP1 regulate mitochondrial fission at mitosis. Nat Cell Biol **13:**1108-1115.
- 160. **Fillatre J, Delacour D, Van Hove L, Bagarre T, Houssin N, Soulika M, Veitia RA, Moreau J.** 2012. Dynamics of the subcellular localization of RalBP1/RLIP through the cell cycle: the role of targeting signals and of protein-protein interactions. FASEB J **26**:2164-2174.
- 161. **Boissel L, Houssin N, Chikh A, Rynditch A, Van Hove L, Moreau J.** 2007. Recruitment of Cdc42 through the GAP domain of RLIP participates in remodeling of the actin cytoskeleton and is involved in Xenopus gastrulation. Dev Biol **312**:331-343.
- 162. **Bodemann BO, White MA.** 2008. Ral GTPases and cancer: linchpin support of the tumorigenic platform. Nat Rev Cancer **8:**133-140.
- 163. **Singhal SS, Roth C, Leake K, Singhal J, Yadav S, Awasthi S.** 2009. Regression of prostate cancer xenografts by RLIP76 depletion. Biochem Pharmacol **77**:1074-1083.
- 164. Singhal SS, Singhal J, Yadav S, Sahu M, Awasthi YC, Awasthi S. 2009. RLIP76: a target for kidney cancer therapy. Cancer Res 69:4244-4251.
- 165. Singhal SS, Singhal J, Yadav S, Dwivedi S, Boor PJ, Awasthi YC, Awasthi S. 2007. Regression of lung and colon cancer xenografts by depleting or inhibiting RLIP76 (Ral-binding protein 1). Cancer Res 67:4382-4389.
- 166. **Drake KJ, Singhal J, Yadav S, Nadkar A, Pungaliya C, Singhal SS, Awasthi S.** 2007. RALBP1/RLIP76 mediates multidrug resistance. Int J Oncol **30**:139-144.
- 167. **Mora A, Komander D, van Aalten DM, Alessi DR.** 2004. PDK1, the master regulator of AGC kinase signal transduction. Semin Cell Dev Biol **15:**161-170.
- 168. Alessi DR, Pearce LR, Garcia-Martinez JM. 2009. New insights into mTOR signaling: mTORC2 and beyond. Sci Signal 2:pe27.
- 169. Bellacosa A, Chan TO, Ahmed NN, Datta K, Malstrom S, Stokoe D, McCormick F, Feng J, Tsichlis P. 1998. Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of the PH domain. Oncogene 17:313-325.
- 170. **Chan TO, Rittenhouse SE, Tsichlis PN.** 1999. AKT/PKB and other D3 phosphoinositideregulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. Annu Rev Biochem **68:**965-1014.
- 171. **Altomare DA, Testa JR.** 2005. Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. Oncogene **24**:7455-7464.
- 172. Liao Y, Hung MC. 2010. Physiological regulation of Akt activity and stability. Am J Transl Res 2:19-42.
- 173. **Gao T, Furnari F, Newton AC.** 2005. PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. Mol Cell **18:**13-24.
- 174. **Manning BD, Cantley LC.** 2007. AKT/PKB signaling: navigating downstream. Cell **129:**1261-1274.
- 175. **Strimpakos AS, Karapanagiotou EM, Saif MW, Syrigos KN.** 2009. The role of mTOR in the management of solid tumors: an overview. Cancer Treat Rev **35:**148-159.
- 176. **Sabatini DM.** 2006. mTOR and cancer: insights into a complex relationship. Nat Rev Cancer **6:**729-734.
- 177. Bhaskar PT, Hay N. 2007. The two TORCs and Akt. Dev Cell 12:487-502.
- 178. **Copp J, Manning G, Hunter T.** 2009. TORC-specific phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR): phospho-Ser2481 is a marker for intact mTOR signaling complex 2. Cancer Res **69:**1821-1827.
- 179. **Saucedo LJ, Gao X, Chiarelli DA, Li L, Pan D, Edgar BA.** 2003. Rheb promotes cell growth as a component of the insulin/TOR signalling network. Nat Cell Biol **5:**566-571.
- 180. **Huang J, Manning BD.** 2009. A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes. Biochem Soc Trans **37:**217-222.

- 181. **Memmott RM, Dennis PA.** 2009. Akt-dependent and -independent mechanisms of mTOR regulation in cancer. Cell Signal **21:**656-664.
- 182. Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, Latek RR, Guntur KV, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. 2003. GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. Mol Cell **11**:895-904.
- 183. Fang Y, Park IH, Wu AL, Du G, Huang P, Frohman MA, Walker SJ, Brown HA, Chen J. 2003. PLD1 regulates mTOR signaling and mediates Cdc42 activation of S6K1. Curr Biol 13:2037-2044.
- 184. **Fang Y, Vilella-Bach M, Bachmann R, Flanigan A, Chen J.** 2001. Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling. Science **294:**1942-1945.
- 185. **Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM.** 2005. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. Science **307:**1098-1101.
- 186. **Corradetti MN, Guan KL.** 2006. Upstream of the mammalian target of rapamycin: do all roads pass through mTOR? Oncogene **25:**6347-6360.
- 187. Frias MA, Thoreen CC, Jaffe JD, Schroder W, Sculley T, Carr SA, Sabatini DM. 2006. mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s. Curr Biol **16**:1865-1870.
- 188. **Ikenoue T, Inoki K, Yang Q, Zhou X, Guan KL.** 2008. Essential function of TORC2 in PKC and Akt turn motif phosphorylation, maturation and signalling. EMBO J **27:**1919-1931.
- 189. **Dunlop EA, Tee AR.** 2009. Mammalian target of rapamycin complex 1: signalling inputs, substrates and feedback mechanisms. Cell Signal **21:**827-835.
- 190. Nojima H, Tokunaga C, Eguchi S, Oshiro N, Hidayat S, Yoshino K, Hara K, Tanaka N, Avruch J, Yonezawa K. 2003. The mammalian target of rapamycin (mTOR) partner, raptor, binds the mTOR substrates p70 S6 kinase and 4E-BP1 through their TOR signaling (TOS) motif. J Biol Chem **278:**15461-15464.
- 191. **Gingras AC, Kennedy SG, O'Leary MA, Sonenberg N, Hay N.** 1998. 4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway. Genes Dev **12**:502-513.
- 192. Montagne J, Stewart MJ, Stocker H, Hafen E, Kozma SC, Thomas G. 1999. Drosophila S6 kinase: a regulator of cell size. Science **285:**2126-2129.
- Radimerski T, Montagne J, Rintelen F, Stocker H, van der Kaay J, Downes CP, Hafen E, Thomas G. 2002. dS6K-regulated cell growth is dPKB/dPI(3)K-independent, but requires dPDK1. Nat Cell Biol 4:251-255.
- 194. **Thomas G.** 2000. An encore for ribosome biogenesis in the control of cell proliferation. Nat Cell Biol **2**:E71-72.
- 195. **Rogers GW, Jr., Komar AA, Merrick WC.** 2002. eIF4A: the godfather of the DEAD box helicases. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **72**:307-331.
- 196. Raught B, Peiretti F, Gingras AC, Livingstone M, Shahbazian D, Mayeur GL, Polakiewicz RD, Sonenberg N, Hershey JW. 2004. Phosphorylation of eucaryotic translation initiation factor 4B Ser422 is modulated by S6 kinases. EMBO J 23:1761-1769.
- 197. **Chou MM, Blenis J.** 1996. The 70 kDa S6 kinase complexes with and is activated by the Rho family G proteins Cdc42 and Rac1. Cell **85:**573-583.
- Monot M, Erny A, Gineys B, Desloire S, Dolmazon C, Aublin-Gex A, Lotteau V, Archer F, Leroux
 C. 2015. Early Steps of Jaagsiekte Sheep Retrovirus-Mediated Cell Transformation Involve the Interaction between Env and the RALBP1 Cellular Protein. J Virol 89:8462-8473.
- 199. Vatsyayan R, Lelsani PC, Awasthi S, Singhal SS. 2010. RLIP76: a versatile transporter and an emerging target for cancer therapy. Biochem Pharmacol **79**:1699-1705.
- 200. Wang Q, Wang JY, Zhang XP, Lv ZW, Fu D, Lu YC, Hu GH, Luo C, Chen JX. 2013. RLIP76 is overexpressed in human glioblastomas and is required for proliferation, tumorigenesis and suppression of apoptosis. Carcinogenesis **34**:916-926.
- 201. **Heasman SJ, Ridley AJ.** 2008. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. Nat Rev Mol Cell Biol **9:**690-701.

- 202. **Ridley AJ.** 2006. Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. Trends Cell Biol **16**:522-529.
- 203. Bishop AL, Hall A. 2000. Rho GTPases and their effector proteins. Biochem J 348 Pt 2:241-255.
- 204. **Cherfils J, Chardin P.** 1999. GEFs: structural basis for their activation of small GTP-binding proteins. Trends Biochem Sci **24**:306-311.
- 205. Etienne-Manneville S. 2004. Cdc42--the centre of polarity. J Cell Sci 117:1291-1300.
- 206. Bryant DM, Datta A, Rodriguez-Fraticelli AE, Peranen J, Martin-Belmonte F, Mostov KE. 2010. A molecular network for de novo generation of the apical surface and lumen. Nat Cell Biol 12:1035-1045.
- 207. Garrard SM, Capaldo CT, Gao L, Rosen MK, Macara IG, Tomchick DR. 2003. Structure of Cdc42 in a complex with the GTPase-binding domain of the cell polarity protein, Par6. EMBO J 22:1125-1133.
- 208. **Osmani N, Peglion F, Chavrier P, Etienne-Manneville S.** 2010. Cdc42 localization and cell polarity depend on membrane traffic. J Cell Biol **191:**1261-1269.
- 209. **Olson MF, Ashworth A, Hall A.** 1995. An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. Science **269:**1270-1272.
- 210. **Perona R, Montaner S, Saniger L, Sanchez-Perez I, Bravo R, Lacal JC.** 1997. Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins. Genes Dev **11**:463-475.
- 211. Sahai E, Marshall CJ. 2002. ROCK and Dia have opposing effects on adherens junctions downstream of Rho. Nat Cell Biol 4:408-415.
- 212. **Chou MM, Masuda-Robens JM, Gupta ML.** 2003. Cdc42 promotes G1 progression through p70 S6 kinase-mediated induction of cyclin E expression. J Biol Chem **278:**35241-35247.
- 213. **Yang L, Wang L, Zheng Y.** 2006. Gene targeting of Cdc42 and Cdc42GAP affirms the critical involvement of Cdc42 in filopodia induction, directed migration, and proliferation in primary mouse embryonic fibroblasts. Mol Biol Cell **17**:4675-4685.
- 214. Pelish HE, Peterson JR, Salvarezza SB, Rodriguez-Boulan E, Chen JL, Stamnes M, Macia E, Feng Y, Shair MD, Kirchhausen T. 2006. Secramine inhibits Cdc42-dependent functions in cells and Cdc42 activation in vitro. Nat Chem Biol **2:**39-46.
- 215. Wang B, Wylie FG, Teasdale RD, Stow JL. 2005. Polarized trafficking of E-cadherin is regulated by Rac1 and Cdc42 in Madin-Darby canine kidney cells. Am J Physiol Cell Physiol **288:**C1411-1419.
- 216. **Nobes CD, Hall A.** 1995. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. Cell **81:**53-62.
- 217. Gupton SL, Gertler FB. 2007. Filopodia: the fingers that do the walking. Sci STKE 2007:re5.
- 218. Sit ST, Manser E. 2011. Rho GTPases and their role in organizing the actin cytoskeleton. J Cell Sci 124:679-683.
- 219. Wang L, Yang L, Debidda M, Witte D, Zheng Y. 2007. Cdc42 GTPase-activating protein deficiency promotes genomic instability and premature aging-like phenotypes. Proc Natl Acad Sci U S A **104**:1248-1253.
- 220. **Boettner B, Van Aelst L.** 2002. The role of Rho GTPases in disease development. Gene **286:**155-174.
- 221. **Broman MT, Mehta D, Malik AB.** 2007. Cdc42 regulates the restoration of endothelial adherens junctions and permeability. Trends Cardiovasc Med **17:**151-156.
- 222. Vega FM, Ridley AJ. 2008. Rho GTPases in cancer cell biology. FEBS Lett **582**:2093-2101.
- 223. Qiu RG, Abo A, McCormick F, Symons M. 1997. Cdc42 regulates anchorage-independent growth and is necessary for Ras transformation. Mol Cell Biol **17:**3449-3458.
- 224. **Bagrodia S, Laudano AP, Shalloway D.** 1994. Accessibility of the c-Src SH2-domain for binding is increased during mitosis. J Biol Chem **269:**10247-10251.
- 225. **Beeser A, Jaffer ZM, Hofmann C, Chernoff J.** 2005. Role of group A p21-activated kinases in activation of extracellular-regulated kinase by growth factors. J Biol Chem **280**:36609-36615.
- 226. **Stengel KR, Zheng Y.** 2012. Essential role of Cdc42 in Ras-induced transformation revealed by gene targeting. PLoS One **7:**e37317.

- 227. **Chuang TH, Hahn KM, Lee JD, Danley DE, Bokoch GM.** 1997. The small GTPase Cdc42 initiates an apoptotic signaling pathway in Jurkat T lymphocytes. Mol Biol Cell **8**:1687-1698.
- 228. **Wu WJ, Tu S, Cerione RA.** 2003. Activated Cdc42 sequesters c-Cbl and prevents EGF receptor degradation. Cell **114:**715-725.
- 229. **Rihet S, Vielh P, Camonis J, Goud B, Chevillard S, de Gunzburg J.** 2001. Mutation status of genes encoding RhoA, Rac1, and Cdc42 GTPases in a panel of invasive human colorectal and breast tumors. J Cancer Res Clin Oncol **127**:733-738.
- 230. **Delorme-Axford E, Coyne CB.** 2011. The actin cytoskeleton as a barrier to virus infection of polarized epithelial cells. Viruses **3**:2462-2477.
- 231. McClain DA, Maness PF, Edelman GM. 1978. Assay for early cytoplasmic effects of the src gene product of Rous sarcoma virus. Proc Natl Acad Sci U S A **75**:2750-2754.
- 232. Felice GR, Eason P, Nermut MV, Kellie S. 1990. pp60v-src association with the cytoskeleton induces actin reorganization without affecting polymerization status. Eur J Cell Biol **52**:47-59.
- 233. **Smith JL, Lidke DS, Ozbun MA.** 2008. Virus activated filopodia promote human papillomavirus type 31 uptake from the extracellular matrix. Virology **381:**16-21.
- 234. Ceccaldi PE, Valtorta F, Braud S, Hellio R, Tsiang H. 1997. Alteration of the actin-based cytoskeleton by rabies virus. J Gen Virol **78 (Pt 11):**2831-2835.
- 235. Martin-Belmonte F, Yu W, Rodriguez-Fraticelli AE, Ewald AJ, Werb Z, Alonso MA, Mostov K. 2008. Cell-polarity dynamics controls the mechanism of lumen formation in epithelial morphogenesis. Curr Biol **18**:507-513.
- 236. Elia N, Lippincott-Schwartz J. 2009. Culturing MDCK cells in three dimensions for analyzing intracellular dynamics. Curr Protoc Cell Biol Chapter 4:Unit 4 22.
- 237. Martin-Belmonte F, Gassama A, Datta A, Yu W, Rescher U, Gerke V, Mostov K. 2007. PTENmediated apical segregation of phosphoinositides controls epithelial morphogenesis through Cdc42. Cell **128**:383-397.
- 238. **Zhang XA, Kazarov AR, Yang X, Bontrager AL, Stipp CS, Hemler ME.** 2002. Function of the tetraspanin CD151-alpha6beta1 integrin complex during cellular morphogenesis. Mol Biol Cell **13:**1-11.
- 239. Kennedy A, Frank RN, Sotolongo LB, Das A, Zhang NL. 1990. Proliferative response and macromolecular synthesis by ocular cells cultured on extracellular matrix materials. Curr Eye Res 9:307-322.
- 240. Vernon RB, Lane TF, Angello JC, Sage H. 1991. Adhesion, shape, proliferation, and gene expression of mouse Leydig cells are influenced by extracellular matrix in vitro. Biol Reprod 44:157-170.
- 241. **Taub M, Wang Y, Szczesny TM, Kleinman HK.** 1990. Epidermal growth factor or transforming growth factor alpha is required for kidney tubulogenesis in matrigel cultures in serum-free medium. Proc Natl Acad Sci U S A **87:**4002-4006.
- 242. Leake K, Singhal J, Nagaprashantha LD, Awasthi S, Singhal SS. 2012. RLIP76 regulates PI3K/Akt signaling and chemo-radiotherapy resistance in pancreatic cancer. PLoS One **7:**e34582.
- 243. Clement C, Tiwari V, Scanlan PM, Valyi-Nagy T, Yue BY, Shukla D. 2006. A novel role for phagocytosis-like uptake in herpes simplex virus entry. J Cell Biol **174:**1009-1021.
- 244. **Carragher NO, Westhoff MA, Riley D, Potter DA, Dutt P, Elce JS, Greer PA, Frame MC.** 2002. v-Src-induced modulation of the calpain-calpastatin proteolytic system regulates transformation. Mol Cell Biol **22**:257-269.
- 245. **Obert G, Peiffer I, Servin AL.** 2000. Rotavirus-induced structural and functional alterations in tight junctions of polarized intestinal Caco-2 cell monolayers. J Virol **74:**4645-4651.
- 246. **Svensson L, Finlay BB, Bass D, von Bonsdorff CH, Greenberg HB.** 1991. Symmetric infection of rotavirus on polarized human intestinal epithelial (Caco-2) cells. J Virol **65:**4190-4197.
- 247. Akiyama T, Kadowaki T, Nishida E, Kadooka T, Ogawara H, Fukami Y, Sakai H, Takaku F, Kasuga M. 1986. Substrate specificities of tyrosine-specific protein kinases toward cytoskeletal proteins in vitro. J Biol Chem **261**:14797-14803.

ARTICLE IN PRESS

Veterinary Microbiology xxx (2015) xxx-xxx

Contents lists available at ScienceDirect



Veterinary Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetmic

Advances in the study of transmissible respiratory tumours in small ruminants

M. Monot^a, F. Archer^a, M. Gomes^a, J.-F. Mornex^{a,b}, C. Leroux^{a,*}

^a INRA UMR754-Université Lyon 1, Retrovirus and Comparative Pathology, France; Université de Lyon, France ^b Hospices Civils de Lyon, France

ARTICLE INFO

Keywords: Cancer ENTV Goat JSRV Lepidic Respiratory infection Retrovirus Sheep

ABSTRACT

Sheep and goats are widely infected by oncogenic retroviruses, namely Jaagsiekte Sheep RetroVirus (JSRV) and Enzootic Nasal Tumour Virus (ENTV). Under field conditions, these viruses induce transformation of differentiated epithelial cells in the lungs for Jaagsiekte Sheep RetroVirus or the nasal cavities for Enzootic Nasal Tumour Virus. As in other vertebrates, a family of endogenous retroviruses named endogenous Jaagsiekte Sheep RetroVirus (enJSRV) and closely related to exogenous Jaagsiekte Sheep RetroVirus is present in domestic and wild small ruminants. Interestingly, Jaagsiekte Sheep RetroVirus and Enzootic Nasal Tumour Virus are able to promote cell transformation, leading to cancer through their envelope glycoproteins. In vitro, it has been demonstrated that the envelope is able to deregulate some of the important signaling pathways that control cell proliferation. The role of the retroviral envelope in cell transformation has attracted considerable attention in the past years, but it appears to be highly dependent of the nature and origin of the cells used. Aside from its health impact in animals, it has been reported for many years that the Jaagsiekte Sheep RetroVirus-induced lung cancer is analogous to a rare, peculiar form of lung adenocarcinoma in humans, namely lepidic pulmonary adenocarcinoma. The implication of a retrovirus related to Jaagsiekte Sheep RetroVirus is still controversial and under investigation, but the identification of an infectious agent associated with the development of lepidic pulmonary adenocarcinomas might help us to understand cancer development. This review explores the mechanisms of induction of respiratory cancers in small ruminants and the possible link between retrovirus and lepidic pulmonary adenocarcinomas in humans.

© 2015 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Cancers are complex and multi-causal diseases and constitute a major threat for humans. Environmental factors, as well as genetic events, have been associated to tumour induction. Worldwide, up to 20% of human cancers might be attributed to infectious agents (Gatza et al., 2005). Among them, several viruses have been associated with cancer induction, *e.g.*,*Hepatitis B Virus*, *Hepatitis C Virus*, *Human Papilloma Virus*, *Epstein Barr Virus*, *Kaposi's Sarcoma Herpesvirus* or *Human T-Lymphotropic Virus type 1*.

The association between viruses and cancers has been reported as early as 1894, although the term 'virus' did not exist at the time, with the description of a contagious pulmonary disease affecting sheep in South Africa. The disease was at the time named Jaagsiekte, a term associating two Afrikaans words ('Jaag' for chase and 'siekte' for disease), describing the respiratory condition of the sick animals that appeared as if they had been chased, as a result of the induced dyspnoea (York and Querat, 2003). Since the seminal description, the disease has been reported worldwide from Europe to China. The link between *Jaagsiekte Sheep RetroVirus* infection and cancer has become evident in the late 1970s, by imaging of retrovirus particles in the lung of affected sheep (Perk et al., 1974) and experimental induction of tumours by inoculation of viral particles (Martin et al., 1976), cytoplasmic fractions of tumoural cells (Verwoerd et al., 1980a,b) or pulmonary secretions (Sharp et al., 1983). Reproduction of the cancer upon inoculation of particles produced from a *Jaagsiekte Sheep RetroVirus* molecular clone definitively linked virus to cancer (Palmarini et al., 1999).

In 1909, Peyton Rous evidenced the association between viruses and cancer when he successfully transmitted a tumour from hen to chicken by the injection of cell-free extracts (Rous, 1910, 1911). The retrovirology field initiated by Rous and other pioneers at the beginning of the 20th century set up the foundations for important discoveries in the following decades and marked a major step in

Please cite this article in press as: Monot, M., et al., Advances in the study of transmissible respiratory tumours in small ruminants. Vet. Microbiol. (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.08.008

Corresponding author. *E-mail address:* caroline.leroux@univ-lyon1.fr (C. Leroux).

http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.08.008 0378-1135/© 2015 Published by Elsevier B.V.

ARTICLE IN PRESS

M. Monot et al./Veterinary Microbiology xxx (2015) xxx-xxx

virology. The studies on retroviruses have been essential to decipher the molecular events during carcinogenesis and they remain relevant to the understanding of tumour development.

This review explores the mechanisms of induction of respiratory cancers in small ruminants and the possible link between retrovirus and lepidic pulmonary adenocarcinomas in humans.

2. Retroviruses and cancer in small ruminants

The Retroviridae family is classified into two subfamilies, Spumaretrovirinae and Orthoretrovirinae; the latter is divided into six genera: alpha-retrovirus, beta-retrovirus, gamma-retrovirus, delta-retrovirus, epsilon-retrovirus and lentivirus. They are enveloped RNA viruses, dependent for their replication of the reverse transcriptase, a RNA dependent DNA-polymerase. Importantly, the viral DNA or provirus definitively integrates into the cellular genome during the early steps of the virus cycle and will remain for the rest of the life into the host DNA. Among the large Retroviridae family, oncogenic retroviruses are present in various species from humans to fish and responsible for the induction of various types of tumours, such as lymphomas or leukaemia in humans, cattle, cats or captive koalas as recently demonstrated (Xu et al., 2013), or solid tumours in the lung in sheep or in the mammary gland in mouse (Table 1).

Sheep and goats are widely infected by the non-oncogenic Small Ruminant LentiViruses (SRLV), related to Human Immunodeficiency Virus-1 and responsible for slowly evolving inflammatory and/or degenerative diseases, and by oncogenic retroviruses, namely Jaagsiekte Sheep RetroVirus (JSRV) and Enzootic Nasal Tumour Virus (ENTV), respectively inducing lung or nasal adenocarcinomas (Table 1) (Leroux et al., 1995; Leroux and Mornex, 2008; Leroux et al., 2010). Under field conditions, it has been widely observed that the transmission of cancer occurs among flocks by trade of clinically unaffected animals (Sharp and DeMartini, 2003). The respiratory route of transmission has been reported as early as 1934 during the Icelandic epidemic (Dungal, 1938); the evidence that adult sheep can be infected when naive and infected animals were kept together stresses out the importance of this route (Caporale et al., 2005). Besides inhalation of aerosolised particles in adults, Jaagsiekte Sheep RetroVirus can infect animals very early in life, with virus detectable even at birth, suggesting in utero transmission to the foetus (Caporale et al., 2005). Jaagsiekte Sheep RetroVirus has been detected in colostrum, which supports the evidence that the virus can spread to newborns by colostrum and milk (Grego et al., 2008). Interestingly, eradication of ovine pulmonary adenocarcinoma has been accomplished by motherless-rearing of lambs from flocks incurring a high prevalence of animals with gross and histological lesions (Voigt et al., 2007), as had been done in the past for Small Ruminant Lentiviruses. For the anecdote, Jaagsiekte Sheep RetroVirusinduced pulmonary adenocarcinoma has been responsible for the demise of the ewe Dolly, the first mammal cloned by nuclear

Table 1

Retroviruses inducing tumours in animals or humans.

transfer from an adult cell; post mortem examination confirmed the presence of lung tumours.

The incubation period in naturally infected animals ranges from few months to two to four years. This may vary according to the type of infection, with shorter incubation period after experimental inoculation than spontaneous infection, and in young animals (Sharp and DeMartini, 2003). In our experience, clinical signs confirmed by macroscopic lesions and presence of the virus may be diagnosed as early as at the age of three to six months; moreover, we have recently diagnosed the disease in lambs younger than six months. Injection of tumoural tissues to newborn lambs rapidly induces the disease in three to six weeks (Palmarini et al., 1999). Under clinical conditions, the rapid development of tumoural lesions in young animals suggests an increased susceptibility of the developing lung to the virus (Caporale et al., 2005).

Sheep can be co-infected by Jaagsiekte Sheep RetroVirus and Enzootic Nasal Tumour Virus and coexistence of enzootic nasal tumour and Jaagsiekte Sheep RetroVirus infection has been reported in naturally infected sheep (Ortin et al., 2004). While Enzootic Nasal Tumour Virus induces transformation of epithelial cells of the ethmoid turbinates in sheep and goats, Jaagsiekte Sheep RetroVirus transforms epithelial cells of the distal lung, namely alveolar epithelial type II cells in the alveoli and Club cells (formerly named Clara cells [Winkelmann and Noack, 2010]) in the bronchioles. Interestingly, the comparison of the complete sequences of Enzootic Nasal Tumour Virus-1 isolated from sheep and of Enzootic Nasal Tumour Virus-2 isolated from goats (both able to induce transformation of nasal epithelium), revealed that they were closely-related but distinct viruses (Cousens et al., 1999; Ortin et al., 2003; Walsh et al., 2010). While Enzootic Nasal Tumour Virus-2 establishes a disseminated lymphoid infection, Enzootic Nasal Tumour Virus -1 is mainly restricted to the tumour (Ortin et al., 2003). The causative relationship between *Enzootic Nasal Tumour* Virus-1 and nasal tumour has only been recently demonstrated after reproduction of lesions in the nasal cavity associated with retrovirus particles (Walsh et al., 2013).

3. Cell tropism and tissue specificity

In naturally infected animals, viral DNA can be detected in lymphoid tissues, blood mononuclear cells, *e.g.*, monocytes or B or T lymphocytes and alveolar macrophages (Palmarini et al., 1996; Holland et al., 1999; Garcia-Goti et al., 2000; Gonzalez et al., 2001; Salvatori et al., 2004). The virus burden is higher in adherent mononuclear cells than in non-adherent lymphocytes (Holland et al., 1999). The role of the infection of blood cells remains to be established, but the infection of lymphoid cells precedes the tumour development (Holland et al., 1999; Archer et al., 2012). In infected animals, tumours exclusively occur in the deep lung and affect epithelial cells, *i.e.* alveolar epithelial type II cells in the alveoli and Club cells in the bronchiole (Palmarini et al., 1995;

Host	Virus name	Genus	Induced tumours
Sheep, goats	Jaagsiekte Sheep Retrovirus	beta	Pulmonary adenocarcinoma
	Enzootic Nasal Tumour Virus	beta	Nasal adenocarcinoma
Cattle	Bovine Leukaemia Virus	delta	Lymphomas
Cats	Feline Leukaemia Virus	gamma	Leukaemia
Chicken	Avian Leukosis Virus	alpha	B cell, erythroid or myeloid leucosis
	Rous Sarcoma Virus	alpha	Sarcoma, fibrosarcoma
Fish	Walleye Dermal Sarcoma Virus	epsilon	Cutaneous mesenchymal neoplasm
Mice	Mouse Mammary Tumour Virus	beta	Mammary adenocarcinomas
	Murine Leukaemia Virus	gamma	B/T cell lymphoma
Captive koalas	Koala Retrovirus B	gamma	Leukaemia, lymphoma
Humans	Human T-lymphotropic virus	delta	Adult T-cell Leukaemia

Please cite this article in press as: Monot, M., et al., Advances in the study of transmissible respiratory tumours in small ruminants. Vet. Microbiol. (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.08.008

2

ARTICLE IN PRESS

M. Monot et al. / Veterinary Microbiology xxx (2015) xxx-xxx

Platt et al., 2002; Salvatori et al., 2004). Under *ex vivo* conditions, tumour-derived alveolar epithelial type II cells contain the viral genome and, when polarised in 3D matrix, produced virus particles (Archer et al., 2007).

Viral envelope and long terminal repeat regions are essential determinants for the tropism and the expression of retroviruses. The very first step of the virus replication cycle is the specific interaction between its surface glycoproteins and the cellular receptor present at the cell membrane which is a determining factor for the host range and potentially the nature of induced lesions. Both Jaagsiekte Sheep RetroVirus and Enzootic Nasal Tumour Virus interact with the mammalian cells through HYAL-2 (hyaluronoglucosaminidase 2) (Rai et al., 2001; Dirks et al., 2002; Miller, 2003), a ubiquitous membrane surface protein that belongs to the hyaluronidases. Hyaluronidases degrade hyaluronan, a major polysaccharide component of the extracellular matrix (Lepperdinger et al., 1998) and are involved in various biological processes, among them development and tumourigenesis. As an example, HYAL-2 is over expressed in colorectal cancers, mainly in advanced stages (Bouga et al., 2010). The hyaluronidase activity of HYAL-2 is not required for its retrovirus receptor function, as demonstrated by inactivating mutations of the catalytic residues, which do not affect virus-receptor interaction (Vigdorovich et al., 2007). The Jaagsiekte Sheep RetroVirus-envelope mediated fusion requires a low pH and the cytoplasmic tail of the envelope negatively regulates the fusion activity (Cote et al., 2011). While sharing the same cellular receptor for virus attachment and entry, Jaagsiekte Sheep RetroVirus and Enzootic Nasal Tumour Virus differ in their entry process. The fusogenicity of Enzootic Nasal Tumour Virus is much lower than that of Jaagsiekte Sheep RetroVirus and its envelope requires a very acidic pH for fusion activation and cell entry (Cote et al., 2008).

Due to the ubiquitous nature of the HYAL-2 receptor, Jaagsiekte Sheep RetroVirus and Enzootic Nasal Tumour Virus may thus be able to enter different cell types. However, their active replication is restricted to epithelial cells of nasal cavity and lung parenchyma. Their tropism restriction is then not only controlled by their interaction with the receptor. The expression of Jaagsiekte Sheep RetroVirus or Enzootic Nasal Tumour Virus envelopes in mouse airway epithelial cells using an adeno-associated virus vector induces tumours in the distal airway, similar to those observed in Jaagsiekte Sheep RetroVirus-infected sheep (Wootton et al., 2005, 2006). This strongly suggests that the tissue-specificity of the induced tumours is not mediated by the envelope. The retroviral Long Terminal Repeats (LTRs) contain the viral promoter and enhancer elements interacting with cellular transcription factors; they are specifically activated in cells expressing transcription factors that bind to their enhancer regions. The Jaagsiekte Sheep RetroVirus LTRs are active in all airway epithelial cells, while the Enzootic Nasal Tumour Virus LTRs are active in the nasal epithelium and alveolar epithelial type II cells, but poorly in tracheal and bronchial epithelial cells (Yu et al., 2011). Several cis-regulatory elements have been identified in the long terminal repeats of Jaagsiekte Sheep RetroVirus and are important for transcription activity in pulmonary epithelial cells. They include docking sites for Hepatocyte Nuclear Factor 3B (HNF3 β), a factor involved in specific regulation of gene expression in lung epithelial cells, C/EBP (CCAAT/Enhancer Binding Protein) and NF-I (Palmarini et al., 2000a; McGee-Estrada et al., 2002; McGee-Estrada et al., 2005; McGee-Estrada and Fan, 2007). In sharp contrast, the critical Hepatocyte Nuclear Factor 3β binding sites are absent in the Enzootic Nasal Tumour Virus-1 and Enzootic Nasal Tumour Virus-2 LTRs; consistently, Enzootic Nasal Tumour Virus-1 LTR has a low activity in lung epithelial cells (McGee-Estrada and Fan, 2007). All the above elements may play a role in localisation of the induced tumours, nasal *versus* pulmonary epithelia.

4. Exogenous versus endogenous Jaagsiekte Sheep RetroVirus in cancer

As a consequence of the mandatory integration of the retroviral genome (provirus) into the host genome during their replicative cycle, retroviruses exist as exogenous transmissible and related endogenous retroviruses (ERV). These are part of the host heritage and are germinally transmitted to the next generation as Mendelian genes. Endogenous retroviruses derive from rare events of ancestral integration of exogenous viruses into germ line cells, followed by genetic stabilisation through point mutations and/or insertion-deletion. As a consequence of multiple events of retrovirus integration into the germline, endogenous retroviruses represent 18% of the cattle genome and \sim 8% of the human genome with >500,000 elements (Adelson et al., 2009; Kurth and Bannert, 2010). As in other vertebrates, a family of endogenous retroviruses named endogenous Jaagsiekte Sheep RetroVirus (or enJSRVs), closely related to the exogenous forms, is present in domestic and wild small ruminants (Hecht et al., 1996; Carlson et al., 2003; DeMartini et al., 2003; Sistiaga-Poveda and Jugo, 2014), but absent from cattle. This suggests that they integrated into the small ruminant genomes before the split between sheep and goats, \sim 5–7 million years ago, and continued after domestication (Arnaud et al., 2007a; Chessa et al., 2009). Interestingly, the exogenous and endogenous forms of Jaagsiekte Sheep RetroVirus are highly related with 90-98% identity at the amino acid level (Palmarini et al., 2000b) and the endogenous Jaagsiekte Sheep RetroVirus retained their full genomes integrated into the host genome. While most endogenous retroviruses lost their ability to produce viral proteins or infectious particles, some of them retained functional retroviral proteins. It has been hypothesised that maintenance of the encoding ability of endogenous retroviruses may have important roles, e.g., maintenance of physiological functions during reproduction, pathophysiological negative effects in cancer (Prudhomme et al., 2005; Jern and Coffin, 2008) or protection against exogenous retroviruses at the entry level by inducing cellular resistance to exogenous viruses through receptor interference (Ikeda and Sugimura, 1989; Ponferrada et al., 2003) or during retroviral replication (Pryciak and Varmus, 1992). The endogenous Jaagsiekte Sheep RetroViruses are essential for placental development in sheep as shown for independently acquired endogenous retroviruses in humans or rodents (Taruscio and Mantovani, 2004; Prudhomme et al., 2005; Dunlap et al., 2006; Dupressoir et al., 2012; Lavialle et al., 2013). A role, if any, of them in cancer development is not clearly identified. But, they can interfere with infection by the exogenous Jaagsiekte Sheep RetroViruses responsible for the disease, both at early and late stages of infection. During the initial step of virus-cell interaction, the envelope of endogenous Jaagsiekte Sheep RetroVirus can block the entry of the exogenous retroviruses into cells by receptor interference (Spencer et al., 2003), characterised by competition between the two envelopes for the HYAL-2 receptor (Miller, 2003). Among the endogenous Jaagsiekte Sheep RetroVirus, two transdominant loci, namely enJSRV56A1 and enJSRV20, have a protective effect at the late stage of infection by a mechanism referred to 'Jaagsiekte Sheep RetroVirus late restriction' (Mura et al., 2004). These trans-dominant endogenous Jaagsiekte Sheep Retro-Virus carry a defective substitution at amino-acid position 21 in the Gag precursor protein, in which the arginine (R21) of the replication competent Jaagsiekte Sheep RetroVirus is replaced by a tryptophan (W21) and prevent the Gag proteins of the exogenous JSRV to interact with the trafficking cellular machinery, resulting in blockage of the virus release at the plasma membrane (Arnaud et al., 2007b; Murcia et al., 2007). By preventing the release of

Please cite this article in press as: Monot, M., et al., Advances in the study of transmissible respiratory tumours in small ruminants. Vet. Microbiol. (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.08.008
M. Monot et al./Veterinary Microbiology xxx (2015) xxx-xxx

exogenous Jaagsiekte Sheep RetroVirus, the interfering W21 endogenous viruses may play a role in cancer induction. We have used a fast mutation detection assay, based on the oligo ligation assay, and reported that the expression of mRNA of the W21 gag was null or lower in tumoural alveolar epithelial type II cells or lung tissues as compared to non-tumoural samples (Viginier et al., 2012). From our study, it is not possible to conclude that absence of interfering W21 Gag allowed development of cancer in absence of protection against exogenous Jaagsiekte Sheep RetroVirus; but the fact that the expression of mRNA of W21 was low or absent in the tumours questioned its role *in vivo*.

5. Molecular mechanisms leading to transformation of the epithelia

Acute and non-acute transforming retroviruses can be identified based on the way they induce tumours (Maeda et al., 2008). Acute transforming retroviruses are replication defective and rapidly induce tumours; they carry viral oncogenes corresponding to captured forms of normal cellular genes or proto-oncogenes acting as positive regulator of cell proliferation. Non-acute retroviruses are replication competent and they promote tumours by their integration in the vicinity of proto-oncogenes, inducing their abnormal activation. A third group of retroviruses induces cell transformation through the properties of their viral proteins, e.g., Human T-Lymphotropic Virus type 1 with its regulatory tax protein, or through their envelopes, as for Jaagsiekte Sheep RetroVirus, Enzootic Nasal Tumour Virus, Friend Spleen Focus-Forming Virus, Avian Haemangioma Virus or Mouse Mammary Tumour Virus. While the acute and non-acute retroviruses have been described for decades, the transforming properties of the retroviral envelopes have been reported more recently.

Initially expressed as a 615 amino acid polyprotein anchored to the membrane, the Jaagsiekte Sheep RetroVirus envelope is cleaved by cellular furin proteases into surface (SU) and transmembrane (TM) domains linked by disulfide bonds (Hull and Fan, 2006). The surface glycoprotein is expressed at the virus surface and interacts with the cellular receptor, whilst the TM ensures the SU anchoring in the lipid bilayer and the fusion of virus and cell membranes during Jaagsiekte Sheep RetroVirus infection. The transmembrane comprises a 44 amino acid intracellular domain or cytoplasmic tail (CT) that is required for Jaagsiekte Sheep RetroVirus-induced transformation, as shown by abrogation of its transformation capacity when deleted (Palmarini et al., 2001; Allen et al., 2002; Liu et al., 2003b; Hofacre and Fan, 2004; Hull and Fan, 2006). Oncogenic property of Jaagsiekte Sheep RetroVirus envelope has been demonstrated in various cell lines in vitro, e.g., human bronchial epithelial cells BEAS-2B (Danilkovitch-Miagkova et al., 2003), rat fibroblasts 208F (Hofacre and Fan, 2004), canine kidney epithelial cells MDCK (Liu and Miller, 2005), rat kidney epithelial cells RK3E (Maeda et al., 2005) or mouse fibroblasts NIH3T3 (Maeda et al., 2001; Palmarini et al., 2001). In vivo, oncogenic properties of the envelope have been reported in sheep and mice, using viral vectors bearing Jaagsiekte Sheep RetroVirus-envelope (Wootton et al., 2005; Caporale et al., 2006). Similarly, Enzootic Nasal Tumour Virus-1 is able to transform fibroblastic and epithelial cell lines (Alberti et al., 2002; Dirks et al., 2002; Liu et al., 2003a) and to induce pulmonary tumours in mice (Wootton et al., 2006). The surface subunit may also play a role in cell transformation, presumably through its interaction with HYAL-2 (Danilkovitch-Miagkova et al., 2003; Hofacre and Fan, 2004). The importance of HYAL-2 remains unclear and might be cell dependent; it plays no role in the transformation of murine cells, but the human HYAL-2 suppresses envelope-mediated transformation by increasing its degradation (Liu et al., 2003a).

Interestingly, the transmembrane glycoprotein of Jaagsiekte Sheep RetroVirus contains an YXXM sequence motif that may potentially bind phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) (Palmarini et al., 2001), suggesting that the envelope of Jaagsiekte Sheep RetroVirus could transform cells by docking PI3K to the plasma membrane with production of 3'-phosphorylated phosphatidylinositols followed by recruitment and phosphorylation of downstream signaling molecules. The PI3K/Akt/mTOR (phosphatidylinositol 3 Kinase/v-akt murine thymoma viral oncogene homolog/mammalian Target of Rapamycin) pathway is involved in Jaagsiekte Sheep RetroVirus - or Enzootic Nasal Tumour Virus -induced transformation of various cell lines. This signaling pathway is crucial for cell growth and survival in physiological and pathological situations and is activated by multiple factors, e.g., hormones, growth factors or mutations of components of the tyrosine kinase pathways (Datta et al., 1999; Porta et al., 2014). Activation of the PI3K/Akt pathway disturbs the control of cell growth and survival leading to a growth advantage of deregulated cells. Consistently, activation by phosphorylation of Akt/protein kinase B, a downstream kinase of PI3K, has been reported in Jaagsiekte Sheep RetroVirus-transformed cell lines (Palmarini et al., 2001; Liu et al., 2003b; Zavala et al., 2003; Monot et al., 2015). In vitro, cell transformation by Jaagsiekte Sheep RetroVirus envelope is dependent on Akt phosphorylation through PI3K, as shown by Pi3K inhibitors (Alberti et al., 2002; Zavala et al., 2003; Liu and Miller, 2005). Murine NIH3T3 cells deficient for the PI3K subunit activator of Akt can be transformed by Jaagsiekte Sheep RetroVirus; Akt is still activated in these cells, questioning the role of Pi3K in Akt activation (Liu et al., 2003b; Maeda et al., 2003). Overall, the role of PI3K/Akt pathway seems to be cell line dependent, with murine cells depending on Akt activation, while chicken cell lines can be transformed by mutants in the YXXM motifs that fail to activate Akt (Zavala et al., 2003). Interestingly, phosphorylated Akt is not detectable (Zavala et al., 2003) or only in one third of the tested ovine lung adenocarcinomas (Suau et al., 2006). Akt activation is low in alveolar epithelial type II cells derived from tumours, meanwhile these primary cells are insensitive to stimulation by Epidermal Growth Factor, an activator of the PI3K/Akt/mTOR pathway, suggesting the deregulation of this pathway in primary cells infected with Jaagsiekte Sheep RetroVirus (Suau et al., 2006; Monot et al., 2015).

Cellular senescence is mainly regulated by telomerase reverse transcriptase, stabilising telomere length. Activation of telomerase reverse transcriptase has been well established in human cancer cell lines and tumours, including lung cancer. The complex regulation of telomerase activity involves several pathways, including the phosphorylation and activation of telomerase reverse transcriptase by Akt. As in most cancers, high level of telomerase activity has been demonstrated in ovine lung tumours, as well as in alveolar epithelial type II cells derived from tumours, suggesting that inhibition of cell senescence participates to cancer progression in small ruminants (Suau et al., 2006). All together, these studies strongly suggest that Akt phosphorylation may participate to cell transformation of some, but not all, cell lines in vitro and is not the sole deregulation leading to development and maintenance of tumour cells. Various Hsp90 (Heat shock protein) inhibitors efficiently blocked transformation of Jaagsiekte Sheep RetroVirus, partly due to Akt degradation and Hsp90 inhibitors specifically inhibited proliferation of immortalised and primary cells derived from ovine lung tumours (Varela et al., 2007). Many viruses, among them Epstein-Barr Virus, papilloma viruses, polyoma viruses, Human Herpesvirus 8, Hepatitis B Virus, Hepatitis C Virus, Human Immunodeficiency Viruses, cytomegaloviruses, Respiratory Syncytial Virus or Rubella Virus, require up-regulation of the Pi3K/Akt pathway to sustain long-standing infections and to create a favorable environment for cell transformation or virus replication (Cooray, 2004).

Please cite this article in press as: Monot, M., et al., Advances in the study of transmissible respiratory tumours in small ruminants. Vet. Microbiol. (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.08.008

4

M. Monot et al./Veterinary Microbiology xxx (2015) xxx-xxx

The Ras/MEK/MAPK pathway (Ras/Mitogen Extracellular regulated kinase/Mitogen activated protein kinase) is involved in transformation of cell lines by *Jaagsiekte Sheep RetroVirus* (Maeda et al., 2005). Ras activation results in phosphorylation of MAPKKK (as Raf), which in turn phosphorylates MAPKK (as MEK 1/2), which, ultimately, phosphorylates MAPK (as ERK 1/2). The activated MAPKs are translocated into the nucleus, where they phosphorylate and activate transcription factors leading to the activation of genes involved in proliferation, cell differentiation and apoptosis. This pathway has been shown to be important for transformation by *Jaagsiekte Sheep RetroVirus* envelope in some cell lines (Maeda et al., 2005; Hull and Fan, 2006). Proteins of the Erk1/2 pathway (Raf-1, Mek1/2, p44/42MAPK) are activated in natural cases of lung or nasal adenocarcinomas in small ruminants and may be important for *in vivo* transformation (De Las Heras et al., 2006).

The role of Jaagsiekte Sheep RetroVirus envelope in cell transformation has attracted considerable attention in the past years, but still more needs to be done to decipher the early steps of envelope-mediated cell transformation and to identify cellular proteins able to interact with the envelope during the very early steps in the natural cell targets. In cell culture assays, Jaagsiekte Sheep RetroVirus envelope clearly activates a number of proteins involved in signaling cascades controlling cell growth and fate. Of importance, the proteins involved appear to be dependent of the type and origin of the cell system used in vitro, emphasing the need to control the candidates in the natural targets of the virus, such as alveolar epithelial type II cells (Suau et al., 2006). Even if they are not easy to manipulate, these cells, as well as bronchioloalveolar progenitors, can be generated from ovine lungs tissues (Archer et al., 2007, 2013) and are valuable tools to understand the pathological situation in the animal. The identification of cellular partners of the JSRV envelope remains crucial for deciphering mechanisms leading to cell transformation. We recently reported RALBP1 (RalA binding protein 1; also known as RLIP76 or RIP), a cellular protein implicated in the ras pathway, as a partner of JSRV Env and confirmed formation of RALBP1/Env complexes in mammalian cells (Monot et al., 2015). Expression of the RALBP1 protein was repressed in tumoral lungs and in tumor-derived alveolar type II cells. Through its inhibition using specific small interfering RNA (siRNA), we demonstrated that RALBP1 was involved in envelope-induced cell transformation and in modulation of the mTOR (mammalian target of rapamycin)/ p70S6K pathway (Monot et al., 2015). Finally, other mechanisms leading to cell transformation, such as targeted integration of the exogenous Jaagsiekte Sheep RetroVirus cannot be totally ruled out (Cousens et al., 2004).

6. Ovine pulmonary adenocarcinoma and related human lung cancer

Worldwide, lung cancer is the leading cause of cancer death in humans, with around 1.5 million deaths annually, i.e. ~20% of the total number of cancer deaths. Only few animal models are available for its study, mainly developed in rodents. Despite development of new target-specific drugs, less than 15% of patients with lung cancer achieve a 5-year survival. Of the cases of lung cancers, 80% are 'nonsmall cell lung cancer'; among them adenocarcinomas are the most frequent type, accounting for 40% of all cases of lung cancers. The human lepidic pulmonary adenocarcinoma (formerly referred to as bronchioloalveolar cancer) is a rare form of lung adenocarcinoma redefined on the latest World Health Organisation classification of lung adenocarcinoma (Travis et al., 2011; Van Schil et al., 2013). By its peculiar presentation and its epidemiology, it has always intrigued chest physicians and pathologists. The lepidic spread used to define these tumours refers to the bronchioloalveolar growth pattern with tumour cells lining the alveolar septa without evidence of stromal, vascular or pleural invasion. Lepidic adenocarcinomas are clinically associated with highly productive cough and progressive restrictive respiratory failure (Mornex et al., 2003; Wislez et al., 2005). The tumour is slow-growing with rare metastatic spread. Lepidic adenocarcinomas share striking clinical, radiological and histopathological similarities with ovine pulmonary adenocarcinomas induced by Jaagsiekte Sheep RetroVirus (Mornex et al., 2003). The role of a virus in the induction of this human cancer has been hypothesised for many years; as early as in 1954, chest physicians questioned the potential implication of a virus (Dufourt et al., 1954). There is growing evidence about the implication of infectious agents in induction of cancer in humans (Gatza et al., 2005). Could a virus, possibly related to Jaagsiekte Sheep RetroVirus, be at the origin of human lepidic pulmonary adenocarcinomas? As for other hypotheses regarding the implication of retroviruses in human cancers, e.g. Mouse Mammary Tumour Virus in breast cancers in women, the question is still open and quite controversial, nevertheless we should carefully considered the following reports.

Despite some evolution in the treatment, such as administration of tyrosine kinase inhibitor of the of Epidermal Growth Factor Receptor, the lepidic pulmonary adenocarcinoma still has a poor prognosis, with a 5 year survival less than 10%. Cancer is generally considered to be a contra-indication for transplantation, but the local extension of lepidic pulmonary adenocarcinoma makes the affected patients eligible for lung transplantation. In 1991, the first double-lung transplantation has been reported and the patient survived for 5.5 years with no cancer relapse (Etienne et al., 1997). In 2014, among the fifteen reported cases by the 'International Society for Heart and Lung Transplantation', recurrence limited to the transplanted lung occurred in over 50% of cases with a median occurrence of 30.1 months (Garver et al., 1999; Paloyan et al., 2000; de Perrot et al., 2004; Avrillon et al., 2012). Microsatellite analyses of lung specimens of donors and recipients have shown that recurring tumours originated from the transplant recipient (Garver et al., 1999; Paloyan et al., 2000). Several hypotheses have been proposed to explain these relapses: peri-surgical contamination with aerogenous diffusion of tumoural cells, latent tumoural cells in extra pulmonary sites, deregulated bronchiolalveolar stem cells able to relocate and differentiate into the transplanted lungs or infection-reinfection with an infectious agent with an extrapulmonary preclinical reservoir.

We have conducted a case-control study on 44 cancer patients and 132 healthy individuals from 11 French university hospitals to determine whether chronic exposure to domestic small ruminants may increase the risk factor of lepidic pulmonary adenocarcinomas compared to other lung cancers (Lutringer-Magnin et al., 2012). Data were collected using a detailed 356-item questionnaire, addressing frequency, type (professional or leisure) and age-period (0-12, 13-20, 21-40, >40 year-old) of contacts, as well as type of domestic animals the patient was exposed to. By using multivariate analysis, lepidic adenocarcinoma was associated significantly more frequently with female gender, 'never-smoker' status, personal history of extra-thoracic cancer and professional exposure to goats with a 5.09 odds ratio, as compared to other subtypes of lung cancer (Lutringer-Magnin et al., 2012). Our epidemiological study did not address viral infection, but the observed risk with professional exposure to goats might, possibly, be linked to presence of oncogenic retroviruses in goats.

Several reports have pointed to a possible interaction between the *Jaagsiekte Sheep RetroVirus* or *Enzootic Nasal Tumour Virus* and the human cells. As shown by immunostaining on lung slices using specific antibodies against *Jaagsiekte Sheep RetroVirus*, viral antigens might be expressed in one third of human lepidic adenocarcinomas, as well as in other types of lung adenocarcinomas (De las Heras et al., 2000; Linnerth-Petrik et al., 2014). JSRV genome has been detected in tissues from lepidic

Please cite this article in press as: Monot, M., et al., Advances in the study of transmissible respiratory tumours in small ruminants. Vet. Microbiol. (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.08.008

M. Monot et al./Veterinary Microbiology xxx (2015) xxx-xxx

adenocarcinomas from Sardinian patients (Rocca et al., 2008), as well as in the blood of African individuals and cancer patients (Morozov et al., 2004; Linnerth-Petrik et al., 2014). Nevertheless, other studies using specific PCR-based analyses failed to detect any exogenous or endogenous *Jaagsiekte Sheep RetroVirus* or beta retrovirus related sequences in human adenocarcinoma (Yousem et al., 2001). The HYAL-2 ubiquitous receptor for envelopes of both *Jaagsiekte Sheep RetroVirus* and *Enzootic Nasal Tumour Virus* is expressed at the surface of human cells and is able to mediate infection by retroviral vectors pseudotyped with the *Jaagsiekte Sheep RetroVirus* or *Enzootic Nasal Tumour Virus*-envelope (Rai et al., 2000).

From these studies, it is not possible to conclude to a zoonotic agent related to *Jaagsiekte Sheep RetroVirus*, responsible for the induction of this rare human cancer. If *Jaagsiekte Sheep RetroVirus* is not implicated, a related known or unknown retrovirus might be involved. In a study conducted in Japan, *Human T-Lymphotropic Virus type 1* has been proposed as a risk factor for lepidic adenocarcinoma in humans; prevalence of lepidic adenocarcinoma in individuals infected with the *Human T-Lymphotropic Virus type 1* was significantly higher than in negative patients (Nomori et al., 2011). To note that this virus is almost exclusively present in Japan and the Caribbean and that the observed link may be associated to its frequency among the Japanese population (Watanabe, 2011)

Up to date, there is no conclusive answer to the possible link between Jaagsiekte Sheep RetroVirus or Enzootic Nasal Tumour Virus or a related retrovirus and the development of lepidic adenocarcinomas in humans. The reported results should be considered as hypothesis-generating and prompt us for further epidemiological studies in a more selected population, living in the countryside, possibly in Jaagsiekte Sheep RetroVirus or Enzootic Nasal Tumour Virus endemic regions and working with domestic small ruminants with a precise quantification of animal exposure.

7. Concluding remarks

In conclusion, Jaagsiekte Sheep RetroVirus and Enzootic Nasal Tumour Virus induce cancers in animals and are of importance in animal health. Even if the role of the oncogenic envelope has been largely studied in cell lines, much needs to be done to elucidate the initial steps leading to the tumour induction *in vivo*. Development of *ex vivo* models as close as possible to the lung of infected animals are of great importance and tools for future discoveries.

Besides the economic impact of these infections in the field, their potential link with human cancers should be fully explored. The identification of an infectious agent associated with the development of lepidic pulmonary adenocarcinomas may open new therapeutic approaches and have an impact for patient care. As in the past in the history of retrovirology, *Jaagsiekte Sheep RetroVirus* and *Enzootic Nasal Tumour Virus* could help us to decipher new and original routes in cancer biology.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgement

MM and MG are recipients of PhD fellowships respectively from the Ministry of Research, France and from the Plan Cancer, France.

References

- Alberti, A., Murgia, C., Liu, S.L., Mura, M., Cousens, C., Sharp, M., Miller, A.D., Palmarini, M., 2002. Envelope-induced cell transformation by ovine betaretroviruses. J. Virol. 76, 5387–5394.
- Allen, T.E., Sherrill, K.J., Crispell, S.M., Perrott, M.R., Carlson, J.O., DeMartini, J.C., 2002. The jaagsiekte sheep retrovirus envelope gene induces transformation of the avian fibroblast cell line DF-1 but does not require a conserved SH2 binding domain. J. Gen. Virol. 83, 2733–2742.
- Archer, F., Abi-Rizk, A., Desloire, S., Dolmazon, C., Gineys, B., Guiguen, F., Cottin, V., Mornex, J.F., Leroux, C., 2013. Lung progenitors from lambs can differentiate into specialized alveolar or bronchiolar epithelial cells. BMC Vet. Res. 9, 224.
- Archer, F., Jacquier, E., Lyon, M., Chastang, J., Cottin, V., Mornex, J.F., Leroux, C., 2007. Alveolar type II cells isolated from pulmonary adenocarcinoma: a model for JSRV expression in vitro. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 36, 534–540.
- Archer, F., Mornex, J.F., Leroux, C., 2012. Interplay between JSRV, an oncogenic retrovirus, and the pulmonary epithelium. Curr. Immunol. Rev. 7, 209–215.
- Arnaud, F., Caporale, M., Varela, M., Biek, R., Chessa, B., Alberti, A., Golder, M., Mura, M., Zhang, Y.P., Yu, L., Pereira, F., Demartini, J.C., Leymaster, K., Spencer, T.E., Palmarini, M., 2007a. A paradigm for virus-host coevolution: sequential counter-adaptations between endogenous and exogenous retroviruses. PLoS Pathog. 3, e170.
- Arnaud, F., Murcia, P.R., Palmarini, M., 2007b. Mechanisms of late restriction induced by an endogenous retrovirus. J. Virol. 81, 11441–11451. Avrillon, V., Philit, F., Chalabreysse, L., Chumbi-Flores, R.W., Tronc, F., Thivolet-Bejui,
- Avrillon, V., Philit, F., Chalabreysse, L., Chumbi-Flores, R.W., Tronc, F., Thivolet-Bejui, F., Mornex, J.F., 2012. Bronchiolo-alveolar carcinoma and lung transplantation. Rev. Mal. Respir. 29, 84–88.
- Bouga, H., Tsouros, I., Bounias, D., Kyriakopoulou, D., Stavropoulos, M.S., Papageorgakopoulou, N., Theocharis, D.A., Vynios, D.H., 2010. Involvement of hyaluronidases in colorectal cancer. BMC Cancer 10, 499.
- Caporale, M., Centorame, P., Giovannini, A., Sacchini, F., Di Ventura, M., De las Heras, M., Palmarini, M., 2005. Infection of lung epithelial cells and induction of pulmonary adenocarcinoma is not the most common outcome of naturally occurring JSRV infection during the commercial lifespan of sheep. Virology 338, 144-153.
- Caporale, M., Cousens, C., Centorame, P., Pinoni, C., De las Heras, M., Palmarini, M., 2006. Expression of the jaagsiekte sheep retrovirus envelope glycoprotein is sufficient to induce lung tumors in sheep. J. Virol. 80, 8030–8037.
- Carlson, J., Lyon, M., Bishop, J., Vaiman, A., Cribiu, E., Mornex, J.F., Brown, S., Knudson, D., DeMartini, J., Leroux, C., 2003. Chromosomal distribution of endogenous Jaagsiekte sheep retrovirus proviral sequences in the sheep genome. J. Virol. 77, 9662–9668.
- Chessa, B., Pereira, F., Arnaud, F., Amorim, A., Goyache, F., Mainland, I., Kao, R.R., Pemberton, J.M., Beraldi, D., Stear, M.J., Alberti, A., Pittau, M., Iannuzzi, L., Banabazi, M.H., Kazwala, R.R., Zhang, Y.P., Arranz, J.J., Ali, B.A., Wang, Z., Uzun, M., Dione, M.M., Olsaker, I., Holm, L.E., Saarma, U., Ahmad, S., Marzanov, N., Eythorsdottir, E., Holland, M.J., Ajmone-Marsan, P., Bruford, M.W., Kantanen, J., Spencer, T.E., Palmarini, M., 2009. Revealing the history of sheep domestication using retrovirus integrations. Science 324, 532–536.
- Cooray, S., 2004. The pivotal role of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt signal transduction in virus survival. J. Gen. Virol. 85, 1065–1076.
- Cote, M., Kucharski, T.J., Liu, S.L., 2008. Enzootic nasal tumor virus envelope requires a very acidic pH for fusion activation and infection. J. Virol. 82, 9023–9034.
- Cote, M., Zheng, Y.M., Albritton, L.M., Liu, S.L., 2011. Single residues in the surface subunits of oncogenic sheep retrovirus envelopes distinguish receptormediated triggering for fusion at low pH and infection. Virology 421, 173–183.
- Cousens, C., Bishop, J.V., Philbey, A.W., Gill, C.A., Palmarini, M., Carlson, J.O., DeMartini, J.C., Sharp, J.M., 2004. Analysis of integration sites of Jaagsiekte sheep retrovirus in ovine pulmonary adenocarcinoma. J. Virol. 78, 8506–8512.
- Cousens, C., Minguijon, E., Dalziel, R.G., Ortin, A., Garcia, M., Park, J., Gonzalez, L., Sharp, J.M., de las Heras, M., 1999. Complete sequence of enzootic nasal tumor virus, a retrovirus associated with transmissible intranasal tumors of sheep. J. Virol. 73, 3986–3993.
- Danilkovitch-Miagkova, A., Duh, F.M., Kuzmin, I., Angeloni, D., Liu, S.L., Miller, A.D., Lerman, M.I., 2003. Hyaluronidase 2 negatively regulates RON receptor tyrosine kinase and mediates transformation of epithelial cells by jaagsiekte sheep retrovirus. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100, 4580–4585.
- Datta, S.R., Brunet, A., Greenberg, M.E., 1999. Cellular survival: a play in three Akts. Genes Dev. 13, 2905–2927.
- De las Heras, M., Barsky, S.H., Hasleton, P., Wagner, M., Larson, E., Egan, J., Ortin, A., Gimenez-Mas, J.A., Palmarini, M., Sharp, J.M., 2000. Evidence for a protein related immunologically to the jaagsiekte sheep retrovirus in some human lung tumours. Eur. Respir. J. 16, 330–332.
- De Las Heras, M., Ortin, A., Benito, A., Summers, C., Ferrer, L.M., Sharp, J.M., 2006. Insitu demonstration of mitogen-activated protein kinase Erk 1/2 signalling pathway in contagious respiratory tumours of sheep and goats. J. Comp. Pathol. 135, 1–10.
- de Perrot, M., Chernenko, S., Waddell, T.K., Shargall, Y., Pierre, A.F., Hutcheon, M., Keshavjee, S., 2004. Role of lung transplantation in the treatment of bronchogenic carcinomas for patients with end-stage pulmonary disease. J. Clin. Oncol. 22, 4351–4356.
- DeMartini, J.C., Carlson, J.O., Leroux, C., Spencer, T., Palmarini, M., 2003. Endogenous retroviruses related to jaagsiekte sheep retrovirus. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 275, 117–137.
- Dirks, C., Duh, F.M., Rai, S.K., Lerman, M.I., Miller, A.D., 2002. Mechanism of cell entry and transformation by enzootic nasal tumor virus. J. Virol. 76, 2141–2149.

Please cite this article in press as: Monot, M., et al., Advances in the study of transmissible respiratory tumours in small ruminants. Vet. Microbiol. (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.08.008

6

Adelson, D.L., Raison, J.M., Edgar, R.C., 2009. Characterization and distribution of retrotransposons and simple sequence repeats in the bovine genome. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106, 12855–12860.

M. Monot et al./Veterinary Microbiology xxx (2015) xxx-xxx

- Dufourt, A., Santy, P., Galy, P., Touraine, R.G.R., 1954. Adenomatosis et soi-disant cancer alvéolaire. Les proliférations épithéliales intra-alvéolaires de type bronchique. Sem. Hôp. (Paris) 30, 1209.
- Dungal, N., 1938. Epizootic adenomatosis of the lungs of sheep: its relation to verminous pneumonia and Jaagsiekte. Proc. R. Soc. Med. 31, 497–505.
- Dunlap, K.A., Palmarini, M., Spencer, T.E., 2006. Ovine endogenous betaretroviruses (enJSRVs) and placental morphogenesis. Placenta 27 (Suppl. A), S135–S140. Dupressoir, A., Lavialle, C., Heidmann, T., 2012. From ancestral infectious
- retroviruses to bona fide cellular genes: role of the captured syncytins in placentation. Placenta 33, 663–671. Etienne, B., Bertocchi, M., Gamondes, J.P., Wiesendanger, T., Brune, J., Mornex, J.F.,
- Etienne, B., Bertocchi, M., Gamondes, J.P., Wiesendanger, T., Brune, J., Mornex, J.F., 1997. Successful double-lung transplantation for bronchioalveolar carcinoma. Chest 112, 1423–1424.
- Garcia-Goti, M., Gonzalez, L., Cousens, C., Cortabarria, N., Extramiana, A.B., Minguijon, E., Ortin, A., De las Heras, M., Sharp, J.M., 2000. Sheep pulmonary adenomatosis: characterization of two pathological forms associated with jaagsiekte retrovirus. J. Comp. Pathol. 122, 55–65.
- Garver Jr., R.I., Zorn, G.L., Wu, X., McGiffin, D.C., Young Jr., K.R., Pinkard, N.B., 1999. Recurrence of bronchioloalveolar carcinoma in transplanted lungs. N. Engl. J. Med. 340, 1071–1074.
- Gatza, M.L., Chandhasin, C., Ducu, R.I., Marriott, S.J., 2005. Impact of transforming viruses on cellular mutagenesis, genome stability, and cellular transformation. Environ. Mol. Mutagen. 45, 304–325.
 Gonzalez, L., Garcia-Goti, M., Cousens, C., Dewar, P., Cortabarria, N., Extramiana, A.B.,
- Gonzalez, L., Garcia-Goti, M., Cousens, C., Dewar, P., Cortabarria, N., Extramiana, A.B., Ortin, A., De Las Heras, M., Sharp, J.M., 2001. Jagssiekte sheep retrovirus can be detected in the peripheral blood during the pre-clinical period of sheep pulmonary adenomatosis. J. Gen. Virol. 82, 1355–1358.
- Grego, E., De Meneghi, D., Alvarez, V., Benito, A.A., Minguijon, E., Ortin, A., Mattoni, M., Moreno, B., Perez de Villarreal, M., Alberti, A., Capucchio, M.T., Caporale, M., Juste, R., Rosati, S., De las Heras, M., 2008. Colostrum and milk can transmit jaagsiekte retrovirus to lambs. Vet. Microbiol. 130, 247–257.
- Hecht, S.J., Stedman, K.E., Carlson, J.O., DeMartini, J.C., 1996. Distribution of endogenous type B and type D sheep retrovirus sequences in ungulates and other mammals. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93, 3297–3302.
- Hofacre, A., Fan, H., 2004. Multiple domains of the Jaagsiekte sheep retrovirus envelope protein are required for transformation of rodent fibroblasts. J. Virol. 78, 10479–10489.
- Holland, M.J., Palmarini, M., Garcia-Goti, M., Gonzalez, L., McKendrick, I., de las Heras, M., Sharp, J.M., 1999. Jaagsiekte retrovirus is widely distributed both in T and B lymphocytes and in mononuclear phagocytes of sheep with naturally and experimentally acquired pulmonary adenomatosis. J. Virol. 73, 4004–4008.
- Hull, S., Fan, H., 2006. Mutational analysis of the cytoplasmic tail of jaagsiekte sheep retrovirus envelope protein. J. Virol. 80, 8069–8080.
- Ikeda, H., Sugimura, H., 1989. Fv-4 resistance gene: a truncated endogenous murine leukemia virus with ecotropic interference properties. J. Virol. 63, 5405–5412.
- Jern, P., Coffin, J.M., 2008. Effects of retroviruses on host genome function. Annu. Rev. Genet. 42, 709–732.
 Kurth, R., Bannert, N., 2010. Beneficial and detrimental effects of human
- endogenous retroviruses. Int. J. Cancer 126, 306–314.
- Lavialle, C., Cornelis, G., Dupressoir, A., Esnault, C., Heidmann, O., Vernochet, C., Heidmann, T., 2013. Paleovirology of 'syncytins', retroviral env genes exapted for a role in placentation. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 368 20120507.
- Lepperdinger, G., Strobl, B., Kreil, G., 1998. HYAL2, a human gene expressed in many cells, encodes a lysosomal hyaluronidase with a novel type of specificity. J. Biol. Chem. 273, 22466–22470.
- Leroux, C., Cruz, J.C., Mornex, J.F., 2010. SRLVs: a genetic continuum of lentiviral species in sheep and goats with cumulative evidence of cross species transmission. Curr. HIV Res. 8, 94–100.
- Leroux, C., Mornex, J.F., 2008. Retroviral infections in sheep and the associated diseases. Small Rumin. Res. 76, 68–76.
- Leroux, C., Vuillermoz, S., Mornex, J.F., Greenland, T., 1995. Genomic heterogeneity in the pol region of ovine lentiviruses obtained from bronchoalveolar cells of infected sheep from France. J. Gen. Virol. 76, 1533–1537.
 Linnerth-Petrik, N.M., Walsh, S.R., Bogner, P.N., Morrison, C., Wootton, S.K., 2014.
- Linnerth-Petrik, N.M., Walsh, S.R., Bogner, P.N., Morrison, C., Wootton, S.K., 2014. Jaagsiekte sheep retrovirus detected in human lung cancer tissue arrays. BMC Res. Notes 7, 160.
 Liu, S.L., Duh, F.M., Lerman, M.I., Miller, A.D., 2003a. Role of virus receptor Hyal2 in
- Liu, S.L., Duh, F.M., Lerman, M.I., Miller, A.D., 2003a. Role of virus receptor Hyal2 ir oncogenic transformation of rodent fibroblasts by sheep betaretrovirus env proteins. J. Virol. 77, 2850–2858.
- Liu, S.L., Lerman, M.I., Miller, A.D., 2003b. Putative phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) binding motifs in ovine betaretrovirus Env proteins are not essential for rodent fibroblast transformation and PI3K/Akt activation. J. Virol. 77, 7924– 7935.
- Liu, S.L., Miller, A.D., 2005. Transformation of madin-darby canine kidney epithelial cells by sheep retrovirus envelope proteins. J. Virol. 79, 927–933.
- Lutringer-Magnin, D., Girard, N., Cadranel, J., Leroux, C., Quoix, E., Cottin, V., Signore, C.D., Lebitasy, M.P., Cordier, G., Vanhems, P., Mornex, J.F., 2012. Professional exposure to goats increases the risk of pneumonic-type lung adenocarcinoma: results of the IFCT-0504-epidemio study. PLoS One 7, e37889.
- Maeda, N., Fan, H., Yoshikai, Y., 2008. Oncogenesis by retroviruses: old and new paradigms. Rev. Med. Virol. 18, 387–405.
- Maeda, N., Fu, W., Ortin, A., de las Heras, M., Fan, H., 2005. Roles of the Ras-MEKmitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase-Akt-mTOR pathways in Jaagsiekte sheep retrovirus-induced transformation of rodent fibroblast and epithelial cell lines. J. Virol. 79, 4440–4450.

- Maeda, N., Inoshima, Y., Fruman, D.A., Brachmann, S.M., Fan, H., 2003. Transformation of mouse fibroblasts by Jaagsiekte sheep retrovirus envelope does not require phosphatidylinositol 3-kinase. J. Virol. 77, 9951–9959.
- Maeda, N., Palmarini, M., Murgia, C., Fan, H., 2001. Direct transformation of rodent fibroblasts by jaagsiekte sheep retrovirus DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98, 4449–4454.
- Martin, W.B., Scott, F.M., Sharp, J.M., Angus, K.W., Norval, M., 1976. Experimental production of sheep pulmonary adenomatosis (Jaagsiekte). Nature 264, 183–185.
- McGee-Estrada, K., Fan, H., 2007. Comparison of LTR enhancer elements in sheep betaretroviruses: insights into the basis for tissue-specific expression. Virus Genes 35, 303–312.
- McGee-Estrada, K., Palmarini, M., Fan, H., 2002. HNF-3beta is a critical factor for the expression of the jaagsiekte sheep retrovirus long terminal repeat in type II pneumocytes but not in clara cells. Virology 292, 87–97.
- McGee-Estrada, K., Palmarini, M., Hallwirth, C., Fan, H., 2005. A Moloney murine leukemia virus driven by the Jaagsiekte sheep retrovirus enhancers shows enhanced specificity for infectivity in lung epithelial cells. Virus Genes 31, 257–263.
- Miller, A.D., 2003. Identification of Hyal2 as the cell-surface receptor for jaagsiekte sheep retrovirus and ovine nasal adenocarcinoma virus. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 275, 179–199.
- Monot, M., Erny, A., Gineys, B., Desloire, S., Dolmazon, C., Aublin-Gex, A., Lotteau, V., Archer, F., Leroux, C., 2015. Early steps of Jaagsiekte sheep retrovirus-mediated cell transformation involve the interaction between env and the RALBP1cellular protein. J. Virol. 89, 8462–8473.
- Mornex, J.F., Thivolet, F., De las Heras, M., Leroux, C., 2003. Pathology of human bronchioloalveolar carcinoma and its relationship to the ovine disease. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 275, 225–248.
- Morozov, V.A., Lagaye, S., Lower, J., Lower, R., 2004. Detection and characterization of betaretroviral sequences, related to sheep Jaagsiekte virus, in Africans from Nigeria and Cameroon. Virology 327, 162–168.
- Mura, M., Murcia, P., Caporale, M., Spencer, T.E., Nagashima, K., Rein, A., Palmarini, M., 2004. Late viral interference induced by transdominant Gag of an and company protein structure and solid U.S. A. 101, 11117, 11122.
- endogenous retrovirus. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101, 11117–11122. Murcia, P.R., Arnaud, F., Palmarini, M., 2007. The transdominant endogenous retrovirus enJS56A1 associates with and blocks intracellular trafficking of Jaagsiekte sheep retrovirus Gag. J. Virol. 81, 1762–1772.

Nomori, H., Mori, T., Iyama, K., Okamoto, T., Kamakura, M., 2011. Risk of

- bronchioloalveolar carcinoma in patients with human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-I): case-control study results. Ann. Thorac. Cardiovasc. Surg. 17, 19–23.
- Ortin, A., Cousens, C., Minguijon, E., Pascual, Z., Villarreal, M.P., Sharp, J.M., de las Heras, M., 2003. Characterization of enzootic nasal tumour virus of goats: complete sequence and tissue distribution. J. Gen. Virol. 84, 2245–2252.
- Ortin, A., Perez de Villarreal, M., Minguijon, E., Cousens, C., Sharp, J.M., De las Heras, M., 2004. Coexistence of enzootic nasal adenocarcinoma and jaagsiekte retrovirus infection in sheep. J. Comp. Pathol. 131, 253–258.
 Palmarini, M., Datta, S., Omid, R., Murgia, C., Fan, H., 2000a. The long terminal repeat
- Palmarini, M., Datta, S., Omid, R., Murgia, C., Fan, H., 2000a. The long terminal repeat of jaagsiekte sheep retrovirus is preferentially active in differentiated epithelial cells of the lungs. J. Virol. 74, 5776–5787.
- Palmarini, M., Dewar, P., De las Heras, M., Inglis, N.F., Dalziel, R.G., Sharp, J.M., 1995. Epithelial tumour cells in the lungs of sheep with pulmonary adenomatosis are major sites of replication for laagsiekte retrovirus. J. Gen. Virol. 76, 2731–2737.
- major sites of replication for Jaagsiekte retrovirus. J. Gen. Virol. 76, 2731–2737. Palmarini, M., Hallwirth, C., York, D., Murgia, C., de Oliveira, T., Spencer, T., Fan, H., 2000b. Molecular cloning and functional analysis of three type D endogenous retroviruses of sheep reveal a different cell tropism from that of the highly related exogenous jaagsiekte sheep retrovirus. J. Virol. 74, 8065–8076.
- related exogenous jaagsiekte sheep retrovirus. J. Virol. 74, 8065–8076. Palmarini, M., Holland, M.J., Cousens, C., Dalziel, R.G., Sharp, J.M., 1996. Jaagsiekte retrovirus establishes a disseminated infection of the lymphoid tissues of sheep affected by pulmonary adenomatosis. J. Gen. Virol. 77, 2991–2998. Palmarini, M., Maeda, N., Murgia, C., De-Fraja, C., Hofacre, A., Fan, H., 2001. A
- Palmarini, M., Maeda, N., Murgia, C., De-Fraja, C., Hofacre, A., Fan, H., 2001. A phosphatidylinositol 3-kinase docking site in the cytoplasmic tail of the jaagsiekte sheep retrovirus transmembrane protein is essential for envelopeinduced transformation of nih 3t3 cells. J. Virol. 75, 11002–11009.
- Palmarini, M., Sharp, J.M., de las Heras, M., Fan, H., 1999. Jaagsiekte sheep retrovirus is necessary and sufficient to induce a contagious lung cancer in sheep. J. Virol. 73, 6964–6972.
- Paloyan, E.B., Swinnen, L.J., Montoya, A., Lonchyna, V., Sullivan, H.J., Garrity, E., 2000. Lung transplantation for advanced bronchioloalveolar carcinoma confined to the lungs. Transplantation 69, 2446–2448.
- Perk, K., Michalides, R., Spiegelman, S., Schlom, J., 1974. Biochemical and morphologic evidence for the presence of an RNA tumor virus in pulmonary carcinoma of sheep (Jaagsiekte). J. Natl. Cancer Inst. 53, 131–135.
- Platt, J.A., Kraipowich, N., Villafane, F., DeMartini, J.C., 2002. Alveolar type II cells expressing jaagsiekte sheep retrovirus capsid protein and surfactant proteins are the predominant neoplastic cell type in ovine pulmonary adenocarcinoma. Vet. Pathol. 39, 341–352.
- Vet. Pathol. 39, 341–352.
 Ponferrada, V.G., Mauck, B.S., Wooley, D.P., 2003. The envelope glycoprotein of human endogenous retrovirus HERV-W induces cellular resistance to spleen necrosis virus. Arch. Virol. 148, 659–675.
- Porta, C., Paglino, C., Mosca, A., 2014. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling in cancer. Front. Oncol. 4, 64.
- Prudhomme, S., Bonnaud, B., Mallet, F., 2005. Endogenous retroviruses and animal reproduction. Cytogenet. Genome Res. 110, 353–364.

Please cite this article in press as: Monot, M., et al., Advances in the study of transmissible respiratory tumours in small ruminants. Vet. Microbiol. (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.08.008

M. Monot et al. / Veterinary Microbiology xxx (2015) xxx-xxx

- Pryciak, P.M., Varmus, H.E., 1992. Fv-1 restriction and its effects on murine leukemia virus integration *in vivo* and *in vitro*. J. Virol. 66, 5959–5966.
- Rai, S.K., DeMartini, J.C., Miller, A.D., 2000. Retrovirus vectors bearing jaagsiekte sheep retrovirus Env transduce human cells by using a new receptor localized to chromosome 3p21.3. J. Virol. 74, 4698–4704.
- Rai, S.K., Duh, F.M., Vigdorovich, V., Danilkovitch-Miagkova, A., Lerman, M.I., Miller, A.D., 2001. Candidate tumor suppressor HYAL2 is a

glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored cell-surface receptor for jaagsiekte sheep retrovirus, the envelope protein of which mediates oncogenic transformation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98, 4443–4448.

- Rocca, S., Sanna, M.P., Leoni, A., Cossu, A., Lissia, A., Tanda, F., Satta, M.P., Palmieri, G., 2008. Presence of Jaagsiekte sheep retrovirus in tissue sections from human bronchioloalveolar carcinoma depends on patients' geographical origin. Hum. Pathol. 39, 303–304.
- Rous, P., 1910. A transmissible avian neoplasm. (Sarcoma of the common fowl.). J. Exp. Med. 12, 696–705.
 Rous, P., 1911. A sarcoma of the fowl transmissible by and agents separable from the

Rous, P., 1911. A sarcoma of the fowl transmissible by and agents separable from the tumor cells. J. Exp. Med. 13, 397.

- Salvatori, D., Gonzalez, L., Dewar, P., Cousens, C., de las Heras, M., Dalziel, R.G., Sharp, J.M., 2004. Successful induction of ovine pulmonary adenocarcinoma in lambs of different ages and detection of viraemia during the preclinical period. J. Gen. Virol. 85, 3319–3324.
- Sharp, J.M., Angus, K.W., Gray, E.W., Scott, F.M., 1983. Rapid transmission of sheep pulmonary adenomatosis (jaagsiekte) in young lambs. Brief report. Arch. Virol. 78, 89–95.
- Sharp, J.M., DeMartini, J.C., 2003. Natural history of JSRV in sheep. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 275, 55–79.
- Sistiaga-Poveda, M., Jugo, B.M., 2014. Evolutionary dynamics of endogenous Jaagsiekte sheep retroviruses proliferation in the domestic sheep, mouflon and *Pyrenean chamois*. Heredity 112, 571–578.
- Spencer, T.E., Mura, M., Gray, C.A., Griebel, P.J., Palmarini, M., 2003. Receptor usage and fetal expression of ovine endogenous betaretroviruses: implications for coevolution of endogenous and exogenous retroviruses. J. Virol. 77, 749–753.

 Suau, F., Cottin, V., Archer, F., Croze, S., Chastang, J., Cordier, G., Thivolet-Bejui, F., Mornex, J.F., Leroux, C., 2006. Telomerase activation in a model of lung adenocarcinoma. Eur. Respir. J. 27, 1175–1182.

Taruscio, D., Mantovani, A., 2004. Factors regulating endogenous retroviral sequences in human and mouse. Cytogenet. Genome Res. 105, 351–362.

- Travis, W.D., Brambilla, E., Noguchi, M., Nicholson, A.G., Geisinger, K.R., Yatabe, Y., Beer, D.G., Powell, C.A., Riely, G.J., Van Schil, P.E., Garg, K., Austin, J.H., Asamura, H., Rusch, V.W., Hirsch, F.R., Scagliotti, G., Mitsudomi, T., Huber, R.M., Ishikawa, Y., Jett, J., Sanchez-Cespedes, M., Sculier, J.P., Takahashi, T., Tsuboi, M., Vansteenkiste, J., Wistuba, I., Yang, P.C., Aberle, D., Brambilla, C., Flieder, D., Franklin, W., Gazdar, A., Gould, M., Hasleton, P., Henderson, D., Johnson, B., Johnson, D., Kerr, K., Kuriyama, K., Lee, J.S., Miller, V.A., Petersen, I., Roggli, V., Rosell, R., Saijo, N., Thunnissen, E., Tsao, M., Yankelewitz, D., 2011. International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. J. Thorac. Oncol. 6, 244–285.
- Van Schil, P.E., Sihoe, A.D., Travis, W.D., 2013. Pathologic classification of adenocarcinoma of lung. J. Surg. Oncol. 108, 320–326.

- Varela, M., Golder, M., Archer, F., de Las Heras, M., Leroux, C., Palmarini, M., 2007. A large animal model to evaluate the effects of Hsp90 inhibitors for the treatment of lung adenocarcinoma. Virology 371, 206–215.
- Verwoerd, D.W., De Villiers, E.M., Tustin, R.C., 1980a. Aetiology of jaagsiekte: experimental transmission to lambs by means of cultured cells and cell homogenates. Onderstepoort J. Vet. Res. 47, 13–18.
- Verwoerd, D.W., Williamson, A.L., De Villiers, E.M., 1980b. Aetiology of jaagsiekte: transmission by means of subcellular fractions and evidence for the involvement of a retrovirus. Onderstepoort J. Vet. Res. 47, 275–280.
- Vigdorovich, V., Miller, A.D., Strong, R.K., 2007. Ability of hyaluronidase 2 to degrade extracellular hyaluronan is not required for its function as a receptor for jaagsiekte sheep retrovirus. J. Virol. 81, 3124–3129.
- Viginier, B., Dolmazon, C., Lantier, I., Lantier, F., Archer, F., Leroux, C., Terzian, C., 2012. Copy number variation and differential expression of a protective endogenous retrovirus in sheep. PLoS One 7, e41965.
- Voigt, K., Kramer, U., Brugmann, M., Dewar, P., Sharp, J.M., Ganter, M., 2007. Eradication of ovine pulmonary adenocarcinoma by motherless rearing of lambs. Vet. Rec. 161, 129–132.
- Walsh, S.R., Linnerth-Petrik, N.M., Laporte, A.N., Menzies, P.I., Foster, R.A., Wootton, S.K., 2010. Full-length genome sequence analysis of enzootic nasal tumor virus reveals an unusually high degree of genetic stability. Virus Res. 151, 74–87.
- Walsh, S.R., Linnerth-Petrik, N.M., Yu, D.L., Foster, R.A., Menzies, P.I., Diaz-Mendez, A., Chalmers, H.J., Wootton, S.K., 2013. Experimental transmission of enzootic nasal adenocarcinoma in sheep. Vet. Res. 44, 66.
- Watanabe, T., 2011. Current status of HTLV-1 infection. Int. J. Hematol. 94, 430–434. Winkelmann, A., Noack, T., 2010. The clara cell: a third reich eponym? Eur. Respir. J. 36, 722–727.
- Wislez, M., Gounant, V., Cadranel, J., 2005. Le carcinome bronchioloalvéolaire. Rev. Mal. Respir. 22, 8S70–78S75.
- Wootton, S.K., Halbert, C.L., Miller, A.D., 2005. Sheep retrovirus structural protein induces lung tumours. Nature 434, 904–907.
- Wootton, S.K., Halbert, C.L., Miller, A.D., 2006. Envelope proteins of jaagsiekte sheep retrovirus and enzootic nasal tumor virus induce similar bronchioalveolar tumors in lungs of mice. J. Virol. 80, 9322–9325.
- Xu, W., Stadler, C.K., Gorman, K., Jensen, N., Kim, D., Zheng, H., Tang, S., Switzer, W. M., Pye, G.W., Eiden, M.V., 2013. An exogenous retrovirus isolated from koalas with malignant neoplasias in a US zoo. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 110, 11547–11552.
- York, D.F., Querat, G., 2003. A history of ovine pulmonary adenocarcinoma (jaagsiekte) and experiments leading to the deduction of the JSRV nucleotide sequence. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 275, 1–23.
- Yousem, S.A., Finkelstein, S.D., Swalsky, P.A., Bakker, A., Ohori, N.P., 2001. Absence of jaagsiekte sheep retrovirus DNA and RNA in bronchioloalveolar and conventional human pulmonary adenocarcinoma by PCR and RT-PCR analysis. Hum. Pathol. 32, 1039–1042.
- Yu, D.L., Linnerth-Petrik, N.M., Halbert, C.L., Walsh, S.R., Miller, A.D., Wootton, S.K., 2011. Jaagsiekte sheep retrovirus and enzootic nasal tumor virus promoters drive gene expression in all airway epithelial cells of mice but only induce tumors in the alveolar region of the lungs. J. Virol. 85, 7535–7545.
- Zavala, G., Pretto, C., Chow, Y.H., Jones, L., Alberti, A., Grego, E., De las Heras, M., Palmarini, M., 2003. Relevance of Akt phosphorylation in cell transformation induced by Jaagsiekte sheep retrovirus. Virology 312, 95–105.

Please cite this article in press as: Monot, M., et al., Advances in the study of transmissible respiratory tumours in small ruminants. Vet. Microbiol. (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.08.008

8