

50376  
1986  
163

50376  
1986  
163

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

N° D'ordre: 57

## THÈSE

présentée pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES  
ET TECHNIQUES DE LILLE

option: BIOLOGIE CELLULAIRE et MOLÉCULAIRE

par

François FERRE



POUVOIR TRANSFORMANT ET REGULATION  
DE L'ONCOGENE HUMAIN c-myc

*Exemplaire corrigé après avis du jury*

soutenue le 24 octobre 1986 devant la commission d'examen

Président : A.YERBERT  
Rapporteurs : F.GALIBERT  
: J.GUILLAUME  
: A.TARTAR  
Examineur : D.STEHELIN

DOYENS HONORAIRES DE L'ANCIENNE FACULTE DES SCIENCES

MM. H. LEFEBVRE, M. PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES DES ANCIENNES FACULTES DE DROIT  
ET SCIENCES ECONOMIQUES, DES SCIENCES ET DES LETTRES

MM. ARNOULT, Mme BEAUJEU, BONTE, BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, COR-  
DONNIER, DECUYPER, DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN,  
GLACET, CONTIER, KOURGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG,  
LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU,  
ROUELLE, SCHILTZ, SAVARD, ZAMANSKI.

PROFESSEUR EMERITE

M. A. LEBRUN.

ANCIENS PRESIDENTS DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET  
TECHNIQUES DE LILLE

MM. M. PARREAU, J. LOMBARD, M. MIGEON.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES  
DE LILLE

M. J. CORTOIS.

PROFESSEURS - CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. FOURET René	Physique du Solide
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
M. TRIDOT Gabriel	Chimie appliquée
M. VIVIER Emile	Biologie cellulaire
M. WERTHEIMER Raymond	Physique atomique et moléculaire

PROFESSEURS - 1ère CLASSE

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean Pierre	Chimie physique
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BILLARD Jean	Physique du solide
M. BOILLY Bénoni	Biologie

M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. BREZINSKI Claude	Analyse numérique
M. CELET Paul	Géologie générale
M. CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M. COEURE Gérard	Analyse
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. DEBOURSE Jean Pierre	Gestion des entreprises
M. DYMENT Arthur	Mécanique
M. ESCAIG Bertrand	Physique du solide
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOCT Jacques	Métallurgie
M. GRANELLE Jean Jacques	Sciences Economiques
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie organique
M. LACOSTE Louis	Biologie végétale
M. LAVEINE Jean-Pierre	Paléontologie
M. LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique atomique et moléculaire
M. LHOMME Jean	Chimie organique biologique
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LOUCHEUX Claude	Chimie physique
M. LUCQUIN Michel	Chimie physique
M. MAILLET Pierre	Sciences économiques
M. MIGNOT Fulbert	Analyse numérique
M. PAQUET Jacques	Géologie générale
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie animale
M. SALMER Georges	Electronique
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique
M. SIMON Michel	Sociologie
M. STANKIEWICZ François	Sciences économiques
M. TILLIEU Jacques	Physique théorique
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS - 2ème Classe

M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie animale
Mme BATTIAU Yvonne	Géographie
M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BELLET Jean	Physique atomique et moléculaire
M. BERZIN Robert	Analyse
M. BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BODARD Marcel	Biologie végétale
M. BOSCOQ Denis	Probabilités
M. BRASSELET Jean-Paul	Géométrie et topologie

M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CAPURON Alfred	Biologie animale
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CAYATTE Jean-Louis	Sciences économiques
M. CHAPOTON Alain	Electronique
M. COQUERY Jean-Marie	Psychophysiologie
Mme CORSIN Paule	Paléontologie
M. CORTOIS Jean	Physique nucléaire et corpusculaire
M. COUTURIER Daniel	Chimie organique
M. CROSNIER Yves	Electronique
M. CURGY Jean-Jacques	Biologie
Mlle DACHARRY Monique	Géographie
M. DAUCHET Max	Informatique
M. DEBRABANT Pierre	Géologie appliquée
M. DEGAUQUE Pierre	Electronique
M. DELORME Pierre	Physiologie animale
M. DELORME Robert	Sciences économiques
M. DE MASSON D'AUTUME Antoine	Sciences économiques
M. DEMUNTER Paul	Sociologie
M. DENEL Jacques	Informatique
M. DE PARIS Jean-Claude	Analyse
Mlle DESSAUX Odile	Spectroscopie de la réactivité chimique
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie minérale
M. DHAINAUT André	Biologie animale
Mme DHAINAUT Nicole	Biologie animale
M. DORMARD Serge	Sciences économiques
M. DOUKHAN Jean-Claude	Physique du solide
M. DUBOIS Henri	Spectroscopie hertzienne
M. DUBRULLE Alain	Spectroscopie hertzienne
M. DUBUS Jean-Paul	Spectrométrie des solides
M. DUPONT Christophe	Vie de la firme (I.P.A.)
M. FAKIR Sabah	Algèbre
M. FONTAINE Hubert	Dynamique des cristaux
M. FOUQUART Yves	Optique atmosphérique
M. FRONTIER Serge	Ecologie numérique
M. GAMBLIN André	Géographie urbaine, industrielle et démographi-
M. GLORIEUX Pierre	Physique moléculaire et rayonnements atmosphé- rique
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie physique
M. GREGORY Pierre	I.P.A.
M. GREMY Jean-Paul	Sociologie
M. GREVET Patrick	Sciences économiques
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie animale
M. HENRY Jean-Pierre	Génie mécanique
M. HERMAN Maurice	Physique spatiale
M. JACOB Gérard	Informatique
M. JACOB Pierre	Probabilités et statistiques
M. JACQUILLAT Bertrand	Gestion
M. JEAN Raymond	Biologie des populations végétales
M. JOFFRE Patrick	Vie de la firme (I.P.A.)
M. JOURNAL Gérard	Spectroscopie hertzienne

M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LANGRAND Claude	Probabilités et statistiques
M. LATTEUX Michel	Informatique
Mme LECLERCQ Ginette	Catalyse
M. LEFEVRE Christian	Pétrologie
Mlle LEGRAND Denise	Algèbre
Mlle LEGRAND Solange	Algèbre
Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LEMAIRE Jean	Spectroscopie hertzienne
M. LE MAROIS Henri	Vie de la firme (I.P.A.)
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique théorique
M. LOSFELD Joseph	Informatique
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MACKE Bruno	Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques
M. MAIZIERES Christian	Automatique
M. MESSELYN Jean	Physique atomique et moléculaire
M. MESSERLIN Patrick	Sciences économiques
M. MONTEL Marc	Physique du solide
Mme MOUNIER Yvonne	Physiologie des structures contractiles
Mme N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. PARSY Fernand	Mécanique
M. PASZKOWSKI Stéphan	Analyse numérique
Mlle PAUPARDIN Colette	Biologie physiologie végétales
M. PERROT Pierre	Chimie appliquée
M. PERTUZON Emile	Physiologie animale
M. PONSOLLE Louis	Chimie physique
M. PORCHET Maurice	Biologie animale
M. POVY Lucien	Automatique
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. RAOULT Jean-François	Géologie structurale
M. RICHARD Alain	Biologie animale
M. RIETSCH François	Physique des polymères
M. ROBINET Jean-Claude	E.U.D.I.L.
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROY Jean-Claude	Psychophysiologie
M. SCHAMPS Joël	Spectroscopie moléculaire
Mme SCHWARZBACH Yvette	Géométrie
M. SLIWA Henri	Chimie organique
M. SOMME Jean	Géographie
Mlle SPIK Geneviève	Biochimie
M. STAROSWIECKI Marcel	Informatique
M. STERBOUL François	Informatique
M. TAILLIEZ Roger	Génie alimentaire
Mme TJOTTA Jacqueline	Mathématiques
M. TOULOTTE Jean-Marc	Automatique
M. TURREL Georges	Spectrochimie infrarouge et Raman
M. VANDORPE Bernard	Chimie minérale
M. VAST Pierre	Chimie inorganique
M. VERBERT André	Biochimie
M. VERNET Philippe	Génétique
M. WALLART Francis	Spectrochimie infrarouge et Raman
M. WARTEL Michel	Chimie inorganique
M. WATERLOT Michel	Géologie générale
Mme ZINN Justin Nicole	Algèbre

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé dans le laboratoire d'Oncologie Moléculaire dirigé par Dominique STEHELIN. Je le remercie vivement de m'avoir accueilli dans son laboratoire et confié ce travail de recherche.

Je remercie Monsieur le Président et Messieurs les Membres du Jury qui ont accepté de juger ce mémoire.

Merci pour tout et de tout coeur à mes deux amis du club "Mickey", Simon SAULE et Patrick MARTIN.

Je remercie Jacques GHYSDAEL pour sa disponibilité et ses précieux conseils, Agnès BEGUE avec qui j'ai fait mes premiers pas en biologie moléculaire, Christian LAGROU pour les milliards de cellules qu'il m'a si souvent bichonnées, Fabienne DENHEZ pour son aide dans la réalisation de la partie Matériel et Méthodes.

Je remercie Nicole DEVASSINE qui a réalisé avec beaucoup de bienveillance la dactylographie de ce travail.

Je remercie toute l'équipe de l'U186. Merci à tous pour votre aide constante et votre gentillesse.

Je remercie, enfin, l'Institut Pasteur et son Directeur, Jean SAMAILLE auxquels je dois l'aide financière qui m'a été apportée pendant la préparation de cette thèse.

## TABLE DES MATIERES

<u>PRESENTATION DU MEMOIRE</u> .....	P.1
<u>INTRODUCTION</u> .....	P.4
I - LES ONCOGENES .....	P.5
A - Généralités	
B - Les oncogènes dont les produits sont localisés dans le noyau	
II - L'ONCOGENE <u>v-myc</u> DES VIRUS DE LA MYELOCYTOMATOSE AVIAIRE ....	P.7
A - Généralités : les virus de la myélocytomatose aviaire sont des rétrovirus	
B - Pathologie et structure des virus de la myélocytomatose aviaire	
III - LE LOCUS <u>c-myc</u> .....	P.9
A - Généralités	
B - Localisation chromosomique du gène <u>c-myc</u>	
C - Structure du gène <u>c-myc</u>	
IV - LES PROTEINES <u>myc</u> .....	P.10
A - Généralités	
B - Les protéines <u>myc</u> sont localisées dans le noyau	
C - Les protéines <u>myc</u> se lient à l'ADN <i>in vitro</i>	
D - Modification post-traductionnelle des protéines <u>myc</u>	
V - FONCTIONS DU GENE <u>myc</u> .....	P.12
A - Le gène <u>myc</u> et la différenciation cellulaire	
B - Le gène <u>myc</u> et l'induction de l'état de compétence	
C - Le gène <u>myc</u> et le contrôle de la transcription	
VI - LE GENE <u>myc</u> ET LA TRANSFORMATION CELLULAIRE .....	P.15
A - Transformation des cellules aviaires par le gène <u>myc</u>	
B - Transformation des cellules murines par le gène <u>myc</u>	
VII - IMPLICATION DE L'ONCOGENE <u>c-myc</u> DANS DIFFERENTS CANCERS .....	P.16
A - La LTR activation du gène <u>c-myc</u>	
B - Activation du gène <u>c-myc</u> par amplification génique	
C - Activation du gène <u>c-myc</u> par translocation chromosomique	
1 - Le gène <u>c-myc</u> est placé dans le voisinage des gènes d'immunoglobulines dans les lymphomes de Burkitt	
2 - Activation du gène <u>c-myc</u> dans les lymphomes de Burkitt	
VIII - LA REGULATION DU GENE <u>c-myc</u> .....	P.19
A - Régulation du gène <u>c-myc</u> au niveau transcriptionnel	
1 - Zones putatives de régulation de la transcription en 5' du locus <u>c-myc</u>	
2 - Régulation transcriptionnelle au niveau du choix des promoteurs	
3 - Régulation de l'élongation de la transcription	
B - Régulation du gène <u>c-myc</u> au niveau post-transcriptionnel	
1 - Stabilisation des ARN <u>myc</u>	
2 - Déstabilisation des ARN <u>myc</u>	
C - Régulation du gène <u>c-myc</u> au niveau traductionnel	
D - Régulation du gène <u>c-myc</u> au niveau post-traductionnel	
E - Auto-régulation du gène <u>c-myc</u>	



<b><u>RESULTATS</u></b> .....	P.24
I - ETUDE DU POUVOIR TRANSFORMANT DU GENE <u>c-myc</u> HUMAIN NORMAL .....	P.25
A - Introduction	
B - Résultats	
1 - Analyse des ARN <u>myc</u> synthétisés par les différents recombinants	
2 - Analyse des protéines <u>myc</u> humaines dans les QEC	
3 - Analyse comparative de l'expression d'un recombinant du gène <u>c-myc</u> humain dans les QEC et les 208F	
C - Discussion	
II - ETUDE DE L'EXPRESSION DU PRODUIT DE L'EXON 1 DU GENE <u>c-myc</u> HUMAIN .....	P.30
A - Introduction	
B - Résultats	
1 - Le cadre de lecture ouvert de l'exon 1 code <i>in vitro</i> pour une protéine de 20 kd	
2 - Le produit de l'exon 1 n'a pas été mis en évidence dans les cellules humaines	
3 - Synthèse de la protéine p20 dans des QEC transfectées par différents recombinants du gène <u>c-myc</u> humain	
C - Discussion	
III - PREPARATION DES DIFFERENTS SERA DIRIGES CONTRE LES PRODUITS DU GENE <u>c-myc</u> HUMAIN .....	P.36
A - Principe d'utilisation du vecteur d'expression bactérien PLc24	
B - Obtention des vecteurs recombinants	
1 - Vecteur recombinant PLc24-gag-ex2	
2 - Vecteur recombinant PLc24-ex3	
3 - Vecteur recombinant PLc24-ex1	
C - Obtention des antigènes et antisera spécifiques	
1 - Transfection dans la souche NF1	
2 - Expression des protéines de fusion : étude analytique	
3 - Caractérisation du produit de l'exon 1 synthétisé dans <i>E.coli</i> : la protéine P25 se lie à l'ADN <i>in vitro</i>	
D - Tests de spécificités des différents sera obtenus	
1 - Immunoprécipitation des protéines <u>myc</u> d'origine virale, aviaire et humaine	
2 - Test de spécificité des sera dirigés contre le produit de l'exon 1	
<b><u>DISCUSSION GENERALE - CONCLUSIONS</u></b> .....	P.42
<b><u>BIBLIOGRAPHIE</u></b> .....	P.46
<b><u>ANNEXE I</u></b> : MATERIEL ET METHODES se rapportant au III .....	P.60
<b><u>ANNEXE II</u></b> : ARTICLES .....	P.69
<u>ARTICLE N° 1</u> .....	P.70
<u>ARTICLE N° 2</u> (soumis au C.R.A.S.) .....	P.76
<u>ARTICLE N° 3</u> (soumis à l'EMBO J.) .....	P.85
<u>ARTICLE N° 4</u> .....	P.108

**PRESENTATION DU MEMOIRE**

Il est de plus en plus clair actuellement que de nombreux cancers spontanés sont dus à l'activation de gènes cellulaires ou oncogènes cellulaires (c-onc). L'objet de ce mémoire consiste précisément en l'étude d'un oncogène cellulaire, le gène c-myc humain.

Les recherches visant à mieux caractériser l'oncogène c-myc ont pris une ampleur considérable ces dernières années du fait de la très vraisemblable implication des dérégulations de l'expression de cet oncogène dans l'émergence de nombreux cancers humains. Par ailleurs, le gène c-myc étant exprimé dans diverses cellules normales proliférantes, de nombreux travaux ont été menés sur la régulation normale de ce gène dans le but, entre autres, de comprendre la nature des activations anormales auxquelles il est soumis dans les cellules malignes. Nous nous sommes aussi intéressés aux modes d'activation et à la régulation de cet oncogène.

Dans l'introduction de ce mémoire, nous avons essayé de faire une synthèse des différents travaux qui ont permis de mieux cerner la biologie complexe du gène myc. Nous nous sommes en particulier attachés à rapporter les très nombreuses expériences qui convergent pour suggérer que l'oncogène myc joue un rôle effectif dans la transformation cellulaire maligne. Nous avons également abordé le problème de la fonction physiologique du gène c-myc. Enfin, nous avons tenté de récapituler les connaissances actuelles concernant les différents modes de régulation du gène c-myc.

Avant de présenter notre travail, il convient de préciser que l'oncogène c-myc humain est constitué de 3 exons et possède dans ces séquences exoniques la capacité de coder pour 2 types de produits :

- Les protéines myc sensus stricto qui sont codées par les exons 2 et 3. Ces protéines seraient les vecteurs du pouvoir oncogène du gène c-myc humain.
- Une protéine putative qui serait codée par l'exon 1.

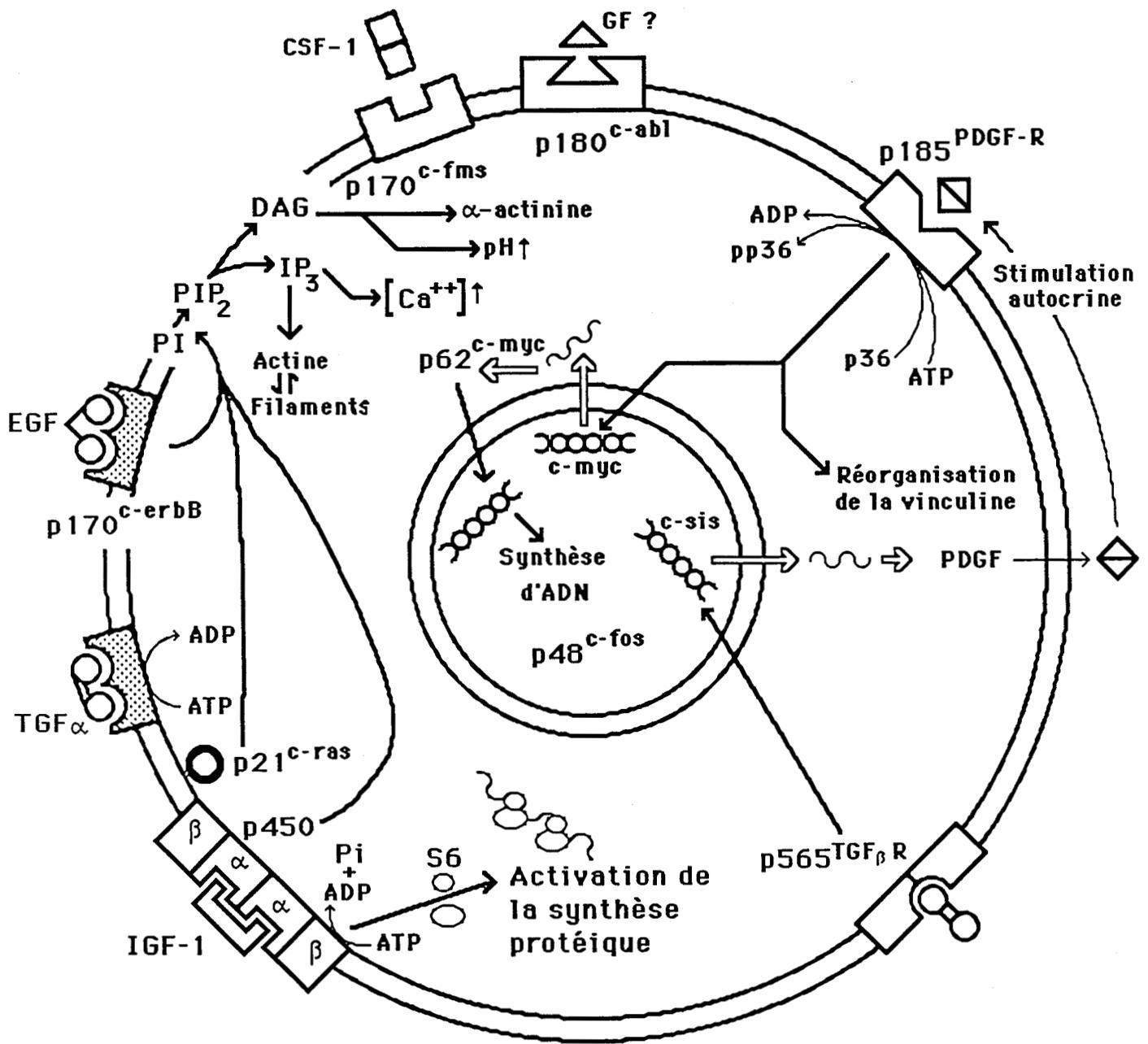
Les travaux que nous rapportons dans la première partie des résultats ont trait à une analyse du pouvoir oncogène du gène c-myc humain *in vitro*. Ces travaux avaient pour but de savoir si la surexpression des protéines c-myc normales était suffisante pour que ces dernières acquièrent un pouvoir transformant. En effet, si les protéines c-myc semblent être impliquées dans la transformation cellulaire maligne, il reste à montrer quel(s) type(s) d'activation est (sont) nécessaire(s) ou suffisant(s) pour leurs conférer un pouvoir oncogène.

Dans la deuxième partie des résultats, nous avons décrit des expériences visant à tester l'existence, dans les cellules humaines, d'une protéine codée par l'exon 1 du gène myc humain. Cet exon possède, en effet, un cadre de lecture ouvert de 600 nucléotides qui pourrait permettre la synthèse d'une protéine de 20 kd. Pourquoi rechercher une telle protéine ? Principalement, parce que le cadre de lecture ouvert de l'exon 1 est souvent altéré dans des cellules issues de certains cancers humains, les lymphomes de Burkitt. Or, la dérégulation du gène myc semble impliquée dans la transformation maligne de ces cellules. Ces observations nous ont amené à émettre l'hypothèse que l'exon 1 pourrait coder pour une protéine susceptible d'intervenir dans la

régulation du gène myc.

Enfin, dans la troisième partie des résultats, nous avons décrit la préparation des différents sera qui nous ont permis, d'une part de caractériser les protéines myc humaines, d'autre part de tester la présence, dans les cellules humaines, d'une protéine codée par l'exon 1 du gène myc.

**INTRODUCTION**



Shéma 1 : Hypothèses sur le mode d'action des oncogènes (d'après Goustin et al., 1986).

## I - LES ONCOGENES

### A - Généralités

Le terme d'oncogène recouvre l'ensemble des gènes qui sont suspectés intervenir dans un processus de transformation cellulaire. Tout d'abord soupçonné d'exister au sein d'un virus à ADN (Fried, 1965), l'oncogène est né véritablement avec la découverte d'un gène viral responsable des propriétés transformantes du virus à ARN du sarcome de Rous, le gène v-src (Martin, 1970 ; Duesberg et Vogt, 1970 ; Lai *et al.*, 1973 ; Stéhelin *et al.*, 1976a). La notion d'oncogène fut élargie au gène cellulaire lorsque fut identifié dans le génome de poulet un gène homologue au gène v-src (Stéhelin *et al.*, 1976b). Ainsi naquit le concept de proto-oncogène ou gène cellulaire susceptible d'être activé pour devenir oncogène proprement dit. En plus des oncogènes des virus à ADN, des virus à ARN et des proto-oncogènes cellulaires présentant des homologies avec des gènes viraux, il existe aussi des proto-oncogènes cellulaires pour lesquels il n'est pas connu d'équivalent viral. De ce fait, ces derniers n'ont pu être détectés que par leur capacité à être révélés dans un test de transformation.

Comment les produits des oncogènes interviennent-ils dans la transformation cellulaire ? L'une des caractéristiques des cellules transformées est de posséder un pouvoir mitogène accru par rapport aux cellules normales. Aussi il est depuis longtemps suspecté que les produits des oncogènes perturberaient certaines étapes de la division cellulaire. De fait, récemment, il a été trouvé certaines homologies structurales et fonctionnelles entre des protéines oncogènes et des facteurs cellulaires normaux qui participent au contrôle de la division cellulaire. La cascade d'événements pouvant conduire à la mitose et dans laquelle interviendraient les protéines oncogènes peut être schématisée comme suit (schéma 1) :

- La fixation d'un facteur de croissance sur son récepteur membranaire est à l'origine du signal mitotique. Il a été découvert des protéines oncogènes présentant des homologies structurales avec ces éléments de régulation. Le produit de l'oncogène sis correspond à la sous-unité protéique B du facteur de croissance des plaquettes sanguines ou PDGF (Johnson *et al.*, 1984) tandis que les protéines v-erbB et v-fms sont respectivement des versions tronquées des récepteurs du facteur de croissance épidermique (EGF) (Downward *et al.*, 1984) et d'un facteur de croissance spécifique des macrophages (M-CSF) (Sherr *et al.*, 1985). Ces protéines oncogènes mimeraient ainsi des fonctions cellulaires normales ce qui conduirait à la dérégulation de ces dernières.

- Le message mitotique est transmis à des effecteurs cytoplasmiques soit directement par le récepteur de facteur de croissance (Fava *et al.*, 1984) soit par l'intermédiaire d'enzymes membranaires (kinases, lipases, GTPases). Des oncogènes dont les produits sont des enzymes localisés dans la membrane tels que les oncogènes de la famille du gène src qui appartiennent à la famille des protéines kinases ou ceux de la famille de l'oncogène ras (enzymes qui hydrolysent le GTP ou GTPases) pourraient déréguler les relais membranaires du signal mitotique (pour revue:

propriétés		Induction de l'immortalisation	Transformation de cellules en culture	Liaison à l'ADN double-brin	Localisation: matrice nucléaire	Régulation de la transcription
oncogènes des virus à ADN	E1A (243)	+	+	-	?	+
	E1A (289)	+	+	-	+	+
	E1B (21 kd) (?)	-	-	-	-	-
	E1B (55 kd) (?)	-	-	-	-	-
	SV-T	+	+	+	+	+
	Py-T	+	-	+	+	+
oncogènes rétroviraux ou cellulaires	v- ou c-myc	+	+	+	+	+
	v-myb	+	+	+	+	?
	v-fos	?	+	?	?	+
	v-ski	?	+	?	?	?
	p53	+	+	?	+	+

?: non testée



Tableau I : Protéines oncogènes à localisation nucléaire

Goustin *et al.*, 1986).

- Les effecteurs cytosoliques (non encore identifiés) achemineraient le signal mitotique jusqu'au noyau où la transcription de certains gènes serait activée. Il a été montré que la transcription des oncogènes cellulaires c-myc et c-fos peut ainsi être activée par des facteurs de croissance (Muller *et al.*, 1984 ; Greenberg et Ziff, 1984 ; Goustin *et al.*, 1985).

- Enfin, certaines protéines dont la synthèse est induite par les effecteurs cytosoliques ont une localisation nucléaire et pourraient de ce fait être impliquées dans l'activation des gènes contrôlant la mitose. Des protéines oncogènes pourraient également interférer avec cette étape (ce point va être analysé dans le prochain paragraphe).

Les produits des oncogènes pourraient aussi interagir avec les mécanismes moléculaires qui conduisent à la différenciation cellulaire (pour revue: Muller *et al.*, 1986).

Enfin, des études récentes sur le pouvoir transformant des oncogènes suggèrent que ces derniers pourraient coopérer pour transformer les cellules. Ces résultats sont en plein accord avec la notion de cancérogénèse multi-étape.

L'objet de ce mémoire étant l'étude du gène myc, oncogène dont le produit est localisé dans le noyau, seule une analyse bibliographique succincte des protéines oncogènes à localisation nucléaire sera présentée.

#### B - Les oncogènes dont les produits sont localisés dans le noyau

Comme l'indique le tableau 1 de nombreuses protéines oncogènes d'origine virale ou cellulaire sont localisées dans le noyau. On y distingue des protéines codées par des virus à ADN telles que E1A et E1B (Sarnow *et al.*, 1982 ; Yee *et al.*, 1983) codées par l'adénovirus et grand-T codée par les papovavirus (Flint, 1981). Les protéines oncogènes rétrovirales v-myb (Klempnauer *et al.*, 1984), v-fos (Curran *et al.*, 1984), v-ski (Stavnezer cité par Bishop, 1985) et v-myc (Donner *et al.*, 1982 ; Alitalo *et al.*, 1983a ; Hann *et al.*, 1983) ont également une localisation nucléaire. Certains produits des équivalents cellulaires de ces gènes rétroviraux tels que la protéine c-myc ont été localisés dans le noyau (Persson *et al.*, 1984a ; Ramsay *et al.*, 1984). Enfin, la protéine p53, produit d'un oncogène cellulaire n'ayant pas d'équivalent viral connu est également localisée dans le noyau (pour revue: Weinberg, 1985).

Leurs localisations nucléaires suggèrent que les produits de ces oncogènes pourraient agir soit en stimulant de manière illégitime la transcription de certains gènes cellulaires soit en interagissant avec la synthèse d'ADN entraînant ainsi la transformation des cellules. Ces hypothèses sont renforcées par le fait que certains des produits des oncogènes (voir tableau 1) ont été trouvés associés à la matrice nucléaire, lieu de réplication et de transcription de l'ADN, et possèdent la capacité de se lier à l'ADN *in vitro* (Feldman et Nerins, 1983 ; Covey *et al.*, 1984 ; Eisenman *et al.*, 1985). Seulement, aucune donnée mécaniste n'est venue confirmer cette hypothèse. Toutefois il a été proposé que les antigènes grand-T impliqués dans l'initiation de la synthèse de l'ADN papovaviral

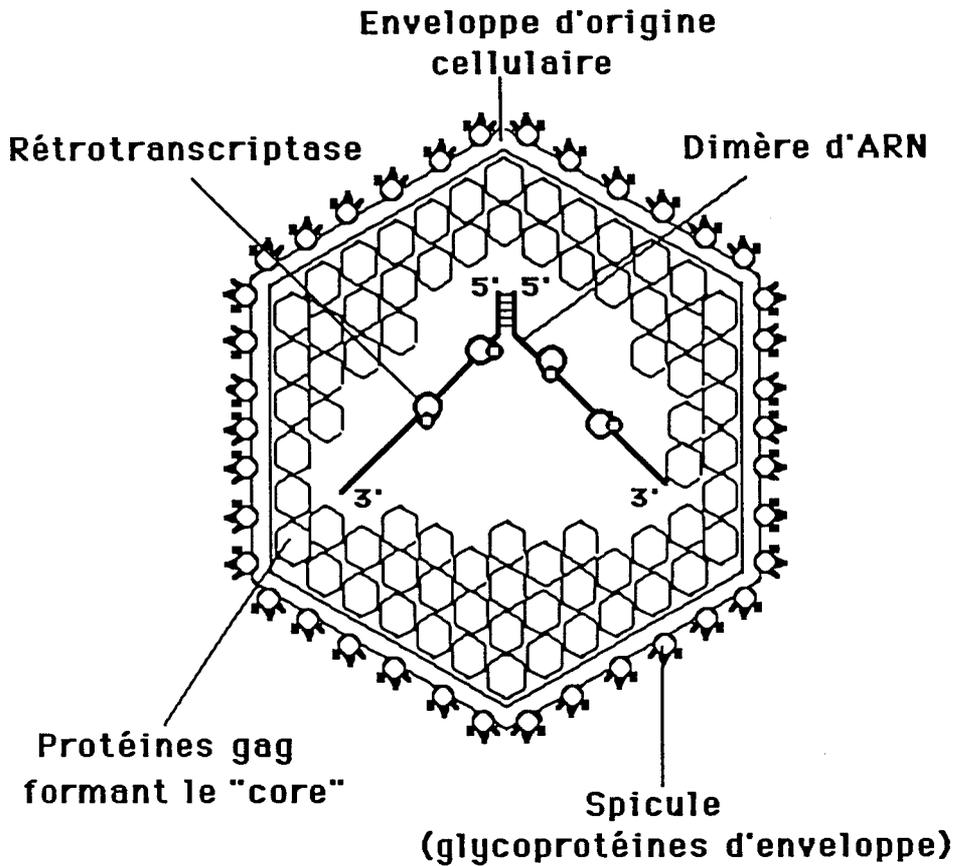


Schéma 2 : Morphologie d'une particule virale

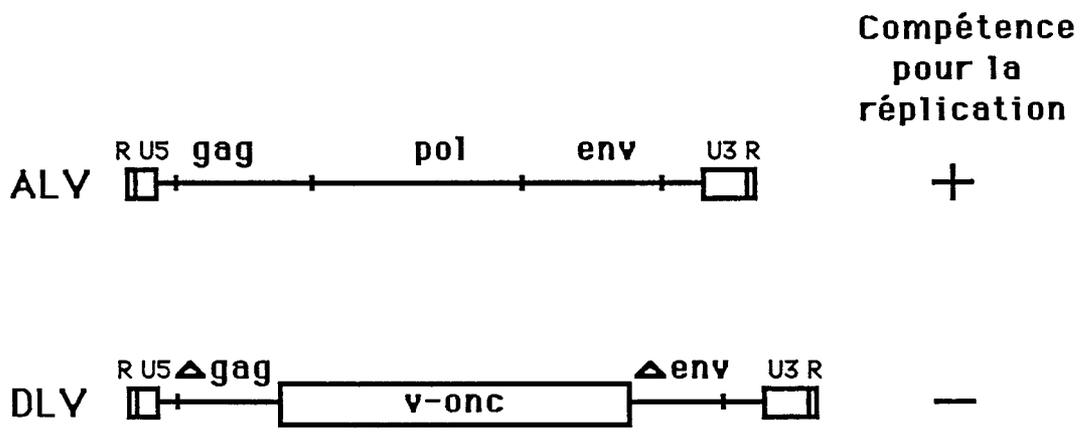


Schéma 3 : Génome de provirus.

(Rigby et Lane, 1983 ; Smith et Ely, 1983) pourraient aussi intervenir au niveau de la synthèse d'ADN cellulaire (Martin, 1981). Il a aussi été montré que le plus grand des deux produits du gène E1A (la protéine de 288 acides aminés) est capable d'activer la transcription d'un grand nombre de gènes viraux ou cellulaires tels que les gènes E1B de l'adénovirus ou les gènes précoces du virus SV40, les gènes des globines humaines ou les gènes de la préproinsuline de rat (Berk *et al.*, 1979 ; Treisman *et al.*, 1983 ; Green *et al.*, 1983 ; Gaynor *et al.*, 1984 ; Allan *et al.*, 1984). Mais ces résultats ont surtout été obtenus pour des gènes nouvellement introduits dans les cellules plutôt qu'avec les gènes propres aux cellules considérées. De plus, seule la protéine E1A de 288 acides aminés stimule la transcription alors que les deux protéines E1A sont requises pour la transformation cellulaire (Montell *et al.*, 1984). Cependant, les deux types de protéines virales précédemment citées partagent avec les protéines p53, *myc* et *myb* la capacité d'immortaliser certaines cellules (Land *et al.*, 1983 ; Ruley *et al.*, 1984 ; Lee *et al.*, 1985). En outre, l'homologie de structure décrite entre les protéines E1A, *myc* et *myb* (Ralston et Bishop, 1983) ainsi que la durée de vie très courte de ces protéines suggèrent que les deux produits des gènes *myc* et *myb* pourraient avoir un rôle régulateur dans la transcription des gènes. Toutefois, le fait que contrairement aux protéines *myc* et *myb*, la protéine E1A ne se lie pas à l'ADN *in vitro* indiquerait que leurs modes d'action sont différents. Quoi qu'il en soit, il reste à identifier les véritables cibles nucléaires de ces protéines oncogènes.

## II - L'ONCOGENE v-myc DES VIRUS DE LA MYELOCYTOMATOSE AVIAIRE

### A - Généralités : les virus de la myélocytomatose aviaire sont des rétrovirus

Les rétrovirus sont des virus dont le génome diploïde est constitué d'ARN (schéma 2) et qui détiennent la propriété de se répliquer par l'intermédiaire d'un ADN viral. Ce dernier est synthétisé à partir de l'ARN viral par un enzyme codé par le virus et spécifique des rétrovirus, la rétropolymérase (Baltimore, 1970 ; Temin et Mizutani, 1970). Puis cet ADN s'intègre dans le génome de la cellule infectée. Les gènes viraux intégrés sont alors répliqués, transcrits et traduits comme les gènes de la cellule hôte. Parmi les rétrovirus, deux classes de virus aviaires seront considérées :

- Les rétrovirus peu ou non transformants qui ne possèdent pas d'oncogènes dans leurs génomes. Ces virus ne transforment pas les cellules en culture. En revanche, ils peuvent induire chez l'animal des lymphomes dont le temps d'apparition est généralement de plusieurs mois. Ces virus sont regroupés sous le terme générique d'ALV pour "Associated Leucosis Virus". Leur génome est composé de trois gènes de structure (schéma 3) (Baltimore, 1975 ; Coffin, 1979) dont l'ordre de lecture de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3' est :

5'-gag-pol-env-3'

Ces trois gènes représentent l'unité répliquative du virus : le gène gag codant pour les protéines de structure du noyau interne, le gène pol pour la rétropolymérase et le gène env pour les

Rétrovirus

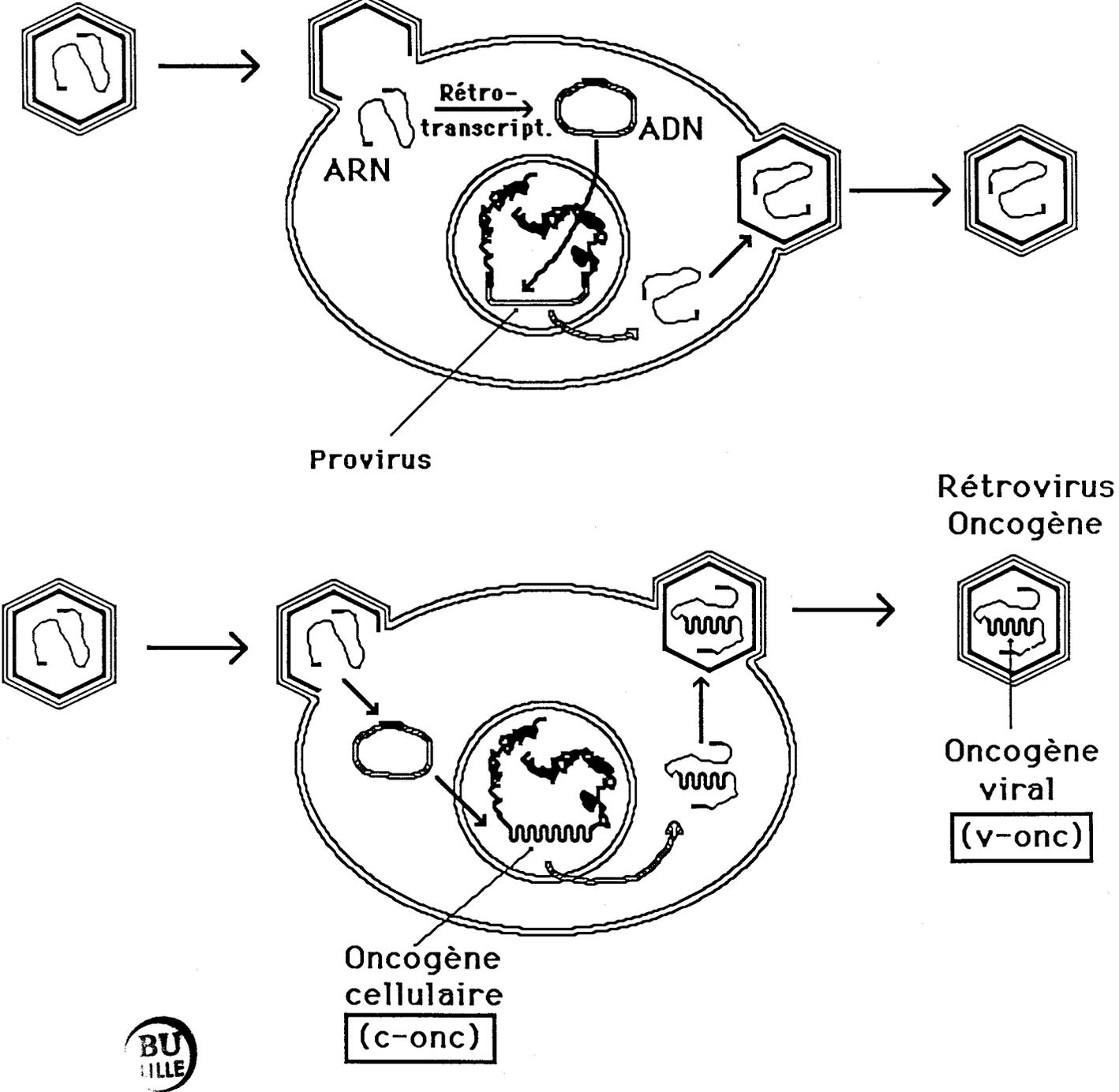


Schéma 4 : Origine des v-onc :  
transduction de c-onc.

glycoprotéines d'enveloppe responsables de l'infectivité du virus.

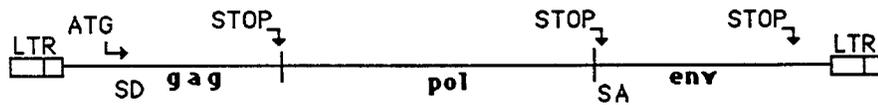
Le génome proviral d'un virus ALV présente à ses extrémités une duplication de certaines séquences virales (U3,R,U5) générées lors du processus de rétrotranscription (Shank *et al.*, 1978). Ces séquences qui ont reçu le nom de LTR pour "Long terminal repeat" contiennent des signaux de promotion, d'activation, d'initiation et de terminaison de la transcription du génome viral (schéma 3).

- Les rétrovirus transformants qui possèdent des oncogènes dans leurs génomes. Ces virus transforment les cellules en culture. *In vivo*, ces rétrovirus induisent des leucémies aiguës, des sarcomes et des carcinomes (Graf et Beug, 1978 ; Graf et Stehelin, 1982). Tous ces virus sauf un -le virus du sarcome de Rous- ont intégré l'oncogène qui les caractérise dans leurs gènes de structure et sont devenus de ce fait incapables de se propager seuls (schéma 3). Ces virus défectifs requièrent pour leur propagation l'aide d'un virus autonome ou virus " helper" (ALV).

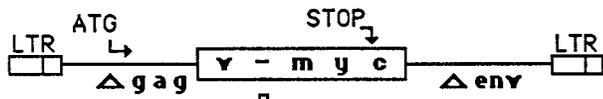
Ces oncogènes viraux proviennent de gènes cellulaires transduits par ces virus. Ces gènes cellulaires ou proto-oncogènes sont phylogénétiquement conservés (schéma 4).

#### B - Pathologie et structure des virus de la myélocytomatose aviaire

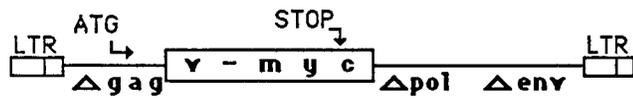
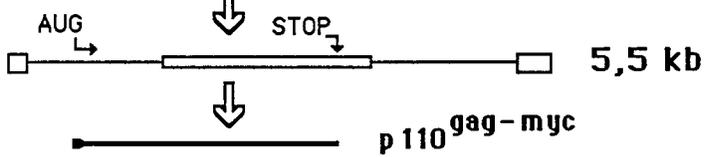
Les virus des leucémies aiguës peuvent être classés en trois groupes aussi bien par leurs spectres oncogéniques que par le type d'oncogène contenu dans leurs génomes (revue : Graf et beug, 1978 ; Hayman, 1981 ; Graf et Stehelin, 1982). L'un de ces groupes, celui des virus défectifs de la myélocytomatose aviaire a pour "chef de file" historique le virus MC29 (Ivanof *et al.*, 1964) qui contient l'oncogène v-myc (Sheiness *et al.*, 1978 ; Roussel *et al.*, 1979). Cet oncogène a aussi été retrouvé dans trois autres virus aviaires. Ce sont les virus CMII (chicken myelocytomatosis virus) (Löfliger, 1964 ; Saule *et al.*, 1983), OK10 (pour isolat d'Oker-Blom) (Oker-Blom *et al.*, 1978 ; Saule *et al.*, 1982) et MH2 (Mill Hill N2) (Begg, 1927 ; Saule *et al.*, 1983) (schéma 5). Certains de ces virus (MC29 et CMII) induisent des myélocytomatoses *in vivo*, tous à l'exception de CMII induisent des carcinomes du foie et du rein (Graf et Beug, 1978) et transforment les fibroblastes et les macrophages *in vitro*. Ces virus doivent leurs propriétés transformantes au gène v-myc dont le produit peut être exprimé soit sous forme d'un produit de fusion avec une portion du gène gag (virus MC29 et CMII) soit sous forme non fusionnée aux protéines gag (virus MH2 et OK10) (schéma 5) (pour revue: Hayman, 1981). Le virus OK10 code en plus pour une protéine de fusion gag-pol-myc. Enfin, le virus MH2 possède outre le gène myc un second oncogène - l'oncogène v-mil - (Coll *et al.*, 1983) qui code pour une protéine de fusion gag-mil. Cette protéine pourrait être responsable de certaines différences dans les propriétés biologiques des virus MH2 et MC29 (Linial, 1982 ; Bechade *et al.*, 1985). Il est généralement admis que l'oncogène v-myc a été transduit par ces virus à partir d'un proto-oncogène homologue, le gène myc cellulaire ou c-myc. Le gène c-myc, phylogénétiquement stable, possède une structure similaire chez le poulet, la souris et l'homme.



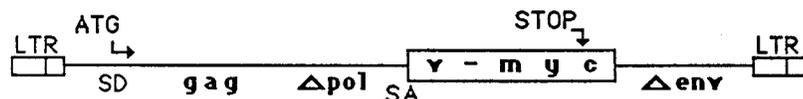
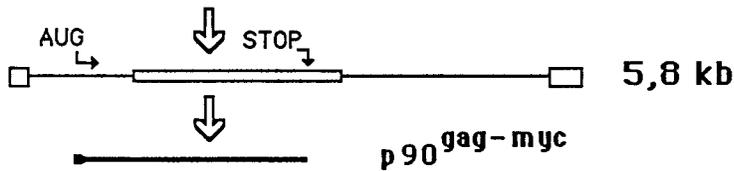
ALV  
"Helper"



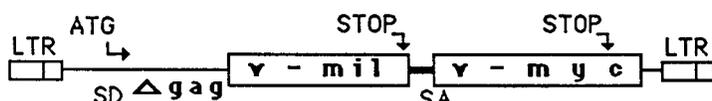
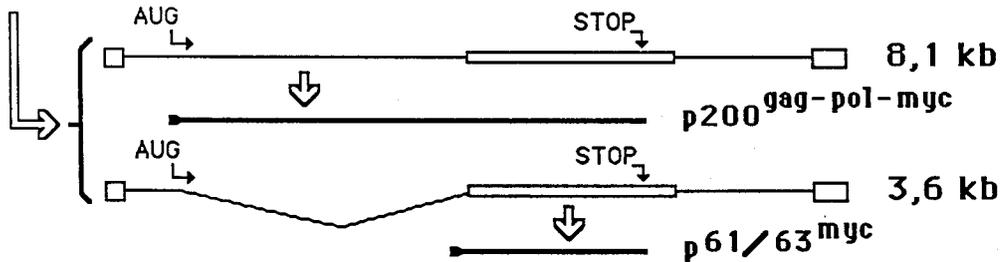
MC 29



CM II



OK 10



MH2

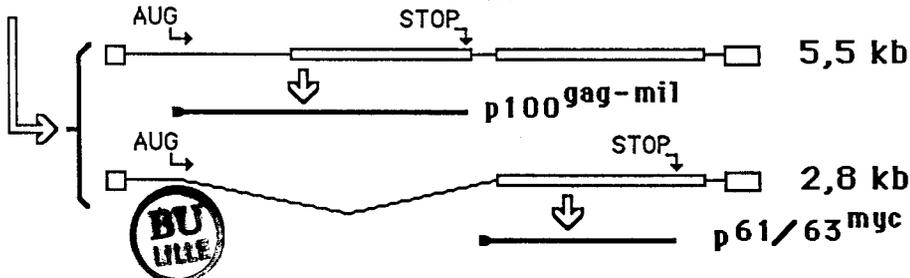


Schéma 5 : Structure et mode d'expression des virus de la myélocytomatose aviaire.

### III - LE LOCUS c-myc

#### A - Généralités

Le gène c-myc est un proto-oncogène qui s'exprime dans de nombreuses cellules normales en phase de croissance. La dérégulation de l'expression de ce gène a été impliquée dans le développement d'un grand nombre de tumeurs (pour revue: Varmus, 1984). Ce gène appartient à une famille d'oncogènes cellulaires qui contient au moins trois membres caractérisés. Les gènes c-myc et N-myc présentent des homologies dans les régions codantes (Colby *et al.*, 1983 ; Kohl *et al.*, 1986) ainsi que des similarités dans leur potentiel oncogénique *in vitro* (Yancopoulos *et al.*, 1985 ; Schwab *et al.*, 1984). Le gène L-myc qui est moins bien caractérisé possède cependant des homologies avec les deux gènes précédents (Nau *et al.*, 1985). Les gènes N-myc et L-myc doivent leur nom au fait qu'ils ont été découverts respectivement dans des cellules de neuroblastomes (Kohl *et al.*, 1983) et des cellules de carcinome pulmonaire ou "lung carcinoma" (Nau *et al.*, 1985) où ces gènes sont amplifiés. Dans la suite de ce mémoire, le terme générique myc s'adressera uniquement au gène c-myc ou à son homologue viral, v-myc.

#### B - Localisation chromosomique du gène c-myc

La détermination de la localisation du gène c-myc a permis de suspecter que ce gène pouvait être activé par translocation génique dans certaines tumeurs. Le gène c-myc a été localisé sur le chromosome 8 dans la bande q24 chez l'homme (Neel *et al.*, 1982 ; Taub *et al.*, 1982) et sur le chromosome 15 chez la souris (Harris *et al.*, 1982 ; Adams *et al.*, 1983).

#### C - Structure du gène c-myc

Chez les trois espèces aviaire, murine et humaine le locus c-myc occupe environ huit milliers de paires de bases (kbp). Pour ces trois espèces le gène c-myc a été séquencé et il est composé de trois exons séparés par deux introns (schéma 6) (Battey *et al.*, 1983 ; Colby *et al.*, 1983 ; Watson *et al.*, 1983 ; Bernard *et al.*, 1983 ; Shih *et al.*, 1984 ; Gazin *et al.*, 1984). Seuls les deux derniers exons phylogénétiquement très conservés codent pour la protéine c-myc homologue de la protéine transformante v-myc. Le premier exon est le moins phylogénétiquement conservé et il est considéré comme une grande séquence leader. Chez la souris et l'homme les ARN messagers codant pour la protéine transformante sont initiés à partir de deux sites promoteurs (P1 et P2) distants de 160 bases et situés à l'extrémité 5' du 1er exon (Stanton *et al.*, 1983 ; Saito *et al.*, 1983). Ces promoteurs permettent la synthèse de deux ARN de 2.4 kb et 2.5 kb. Un promoteur cryptique (P3) situé en amont de l'exon 2 a été décrit chez l'homme (Colby *et al.*, 1983) et la souris (Adams *et al.*, 1983). Dans les cellules normales aviaires, un seul ARN de 2.4 kb est transcrit (Linial et Groudine, 1985).

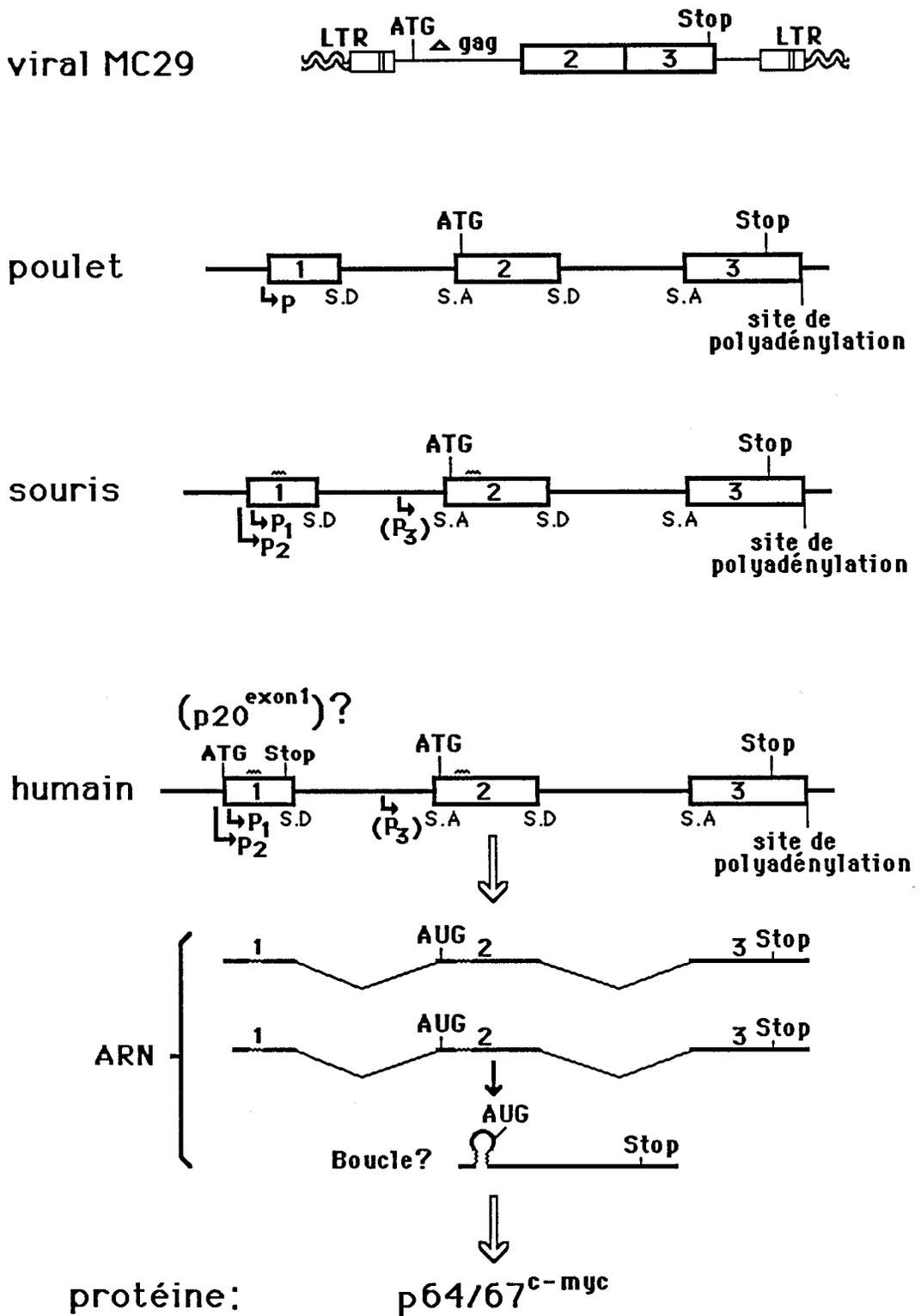


Schéma 6 : Structure des gènes c-myc et des ARN du gène humain.

Outre les sites de promotion l'exon 1 renferme, chez la souris et l'homme, une séquence capable de s'apparier avec une séquence de l'exon 2 pour former dans l'ARN une boucle en épingle à cheveux particulièrement stable (Saito *et al.*, 1983 ; Darveau *et al.*, 1985). Enfin, dans l'espèce humaine, cet exon contient une phase de lecture ouverte avec en amont toutes les séquences requises pour l'expression d'une protéine de 20 kilodaltons (kd) (Gazin *et al.*, 1984). Dans ce mémoire ont été rapportés nos travaux ayant trait à la capacité codante de l'exon 1. Bien que les résultats présentés montrent que l'exon 1 du gène myc humain code dans certaines conditions pour une protéine de 20 kd, l'existence d'une telle protéine dans les cellules humaines n'a pas été montrée jusqu'à présent. Par contre, de nombreux travaux dont les nôtres ont permis d'identifier et de caractériser les protéines c-myc codées par les exons 2 et 3 dans différentes espèces.

#### IV - LES PROTEINES myc

##### A - Généralités

Qu'elles soient d'origine virale ou cellulaire les protéines myc possèdent quelques caractéristiques communes (voir tableau 2) :

- ces protéines sont localisées dans le noyau
- elles sont capables *in vitro* de se lier à l'ADN
- ces protéines sont phosphorylées
- elles possèdent une durée de vie courte.

En outre, ces protéines ont un poids moléculaire apparent en analyse électrophorétique sur gel d'acrylamide (SDS-PAGE) très supérieur à celui calculé à partir des différentes séquences d'acides aminés (poids moléculaire apparent 58 à 68 kd poids moléculaire théorique 46 à 48 kd suivant les espèces). Cette caractéristique ne semble pas liée aux modifications post-traductionnelles (Miyamoto *et al.*, 1985) mais pourrait être liée à la richesse en proline et en acides aminés basiques de la protéine myc (Hann and Eisenman, 1984). De plus, une migration anormale a aussi été décrite pour d'autres protéines dont celles d'oncogènes nucléaires riches en prolines telles que E1A, grand-T et v-fos (Gingeras *et al.*, 1982 ; Soeda *et al.*, 1980 ; Verma *et al.*, 1984).

##### B - Les protéines myc sont localisées dans le noyau.

Il a été reporté que les protéines myc sont associées dans des proportions de 60 à 90 % avec la matrice nucléaire dans des cellules qui ne sont pas en division (Eisenman *et al.*, 1985). Cependant, de récents travaux indiquent que cette localisation matricielle des protéines myc pourrait être due à une précipitation artificielle de ces protéines lors de la préparation des noyaux (Evan *et al.*, 1985). Durant la mitose, les protéines myc se dispersent dans le cytoplasme (Winqvist *et al.*, 1984 ; Eisenman *et al.*,

propriétés protéines	Poids Moléculaire en kilo daltons	Phospho- rylation	Liaison à l'ADN double-brin	Localisation:	durée de demie - vie (en heures)	
gag-myc (MC29)	110 <sup>(1)</sup>	+	+	Nuc.	?	
gag-myc (CM II)	90 <sup>(1)</sup>	+	?	Nuc.	?	
gag-pol-myc (OK 10)	200 <sup>(1)</sup>	+	—	Cyt., Nuc.	?	
v-myc (OK 10)	62 ou 55 <sup>(2)</sup>	+	+( <sup>2</sup> )	Nuc.	?	
v-myc (MH2)	61/63 <sup>(1)</sup>	+	+( <sup>2</sup> )	Nuc.	?	
	ou 55 <sup>(2)</sup>	+	+( <sup>2</sup> )	Nuc.	?	
c-myc	homme	(64/67) <sup>(3)</sup>	+	? +( <sup>4</sup> )	Nuc.	2.6/2 >8/3.3
		(65/68)	—		Nuc.	
		62/66 <sup>(5)</sup>	+	?	?	0.5
		64/67 <sup>(6)</sup>	+	?	Nuc.	0.5
	souris	64/67 <sup>(7)</sup>	?	?	?	?
		60/62 <sup>(8)</sup>	?	?	?	2/>6
	poulet	64/66 <sup>(5)</sup>	+	?	Nuc.	?
		60/62 <sup>(1)</sup>	+/-	?	?/Nuc.	?
		58 <sup>(9)</sup>	?	?	Nuc.	?
	caille	59/62 <sup>(6)</sup>	?	?	Nuc.	?
58 <sup>(6)(7)</sup>		— <sup>(6)</sup>	?	?	?	

? : non testée

Cyt.: Cytoplasmique

Nuc.: Nucléaire



(1) Hann et al., 1983

(2) Bunte et al., 1984

(3) Persson et al., 1986

(4) Persson et al., 1984b

(5) Ramsay et al., 1984

(6) Hann and Eisenman, 1984

(7) Martin et al., 1986

(8) Persson et al., 1985

(9) Alitalo et al., 1983a

Tableau II : Les protéines myc.

1985). Enfin, il a aussi été suggéré que ces protéines seraient associées à la chromatine (Bunte *et al.*, 1982 ; Evan *et al.*, 1985).

### C - Les protéines myc se lient à l'ADN *in vitro*

Les protéines myc ont la capacité de se lier avec une grande affinité et de manière aspécifique à l'ADN double-brin *in vitro* (Donner *et al.*, 1982 ; Bunte *et al.*, 1983 ; Persson *et al.*, 1984a ; Watt *et al.*, 1985). Les résultats suivants convergent pour suggérer que le domaine COOH terminal (codé par l'exon 3) de la protéine myc est au moins en partie responsable de son interaction avec l'ADN. En effet, à l'aide de mutants du virus MC29 qui possédaient une capacité amoindrie à se fixer à l'ADN (Donner *et al.*, 1982) , Enrietto et Hayman (1982) ont montré que des acides aminés impliqués dans la liaison à l'ADN sont codés par les séquences nucléotidiques situées autour du site enzymatique de restriction Cla1 présent au début de l'exon 3. Ce fait a été précisé en inhibant la liaison d'une protéine v-myc à l'ADN à l'aide d'antisera antipeptidiques dirigés contre les acides aminés codés par les séquences situées autour du site Cla1 (Bunte *et al.*, 1984). En outre, ce domaine COOH terminal est celui pour lequel les protéines v-myc et c-myc présentent le plus d'homologie (Persson *et al.*, 1984a). Enfin, ce domaine ressemble à un domaine d'histone par l'agencement de ses groupes d'acides aminés basiques (Reddy *et al.*, 1983).

### D - Modification post-traductionnelle des protéines myc

Les protéines myc virales ou cellulaires ne semblent pas être glycosylées par contre elles sont phosphorylées (Ramsay *et al.*; 1982 ; Hann *et al.*, 1983 ; Ramsay *et al.*, 1984). Les protéines c-myc des fibroblastes embryonnaires de caille pourraient faire exception car elles ne semblent pas phosphorylées (Hann *et al.*, 1983). Les protéines myc sont phosphorylées sur des résidus sérines et thréonines (Ramsay *et al.*, 1982). Les sites de phosphorylation se situent principalement dans les parties NH2 terminales de ces protéines (Hann *et al.*, 1984). Or, il a été proposé que le taux de phosphorylation des protéines myc pourrait moduler leur faculté de se lier à l'ADN (Braun *et al.*, 1985). Ceci suggère que le domaine NH2 terminal (comme le domaine COOH terminal) serait impliqué dans le lien ADN -Protéine myc . L'importance de la phosphorylation dans le pouvoir transformant des protéines myc a été étudiée par Ramsay *et al.* (1982). Ces auteurs ont montré qu'il existe, pour la protéine gag-myc du virus MC29, une corrélation entre une augmentation de son taux de phosphorylation et sa capacité transformante.

## V - FONCTIONS DU GENE *myc*

### A - Le gène *myc* et la différenciation cellulaire

Le taux d'ARN du gène *c-myc* est plus élevé dans certaines cellules hématopoïétiques immatures que dans leurs homologues matures (Coll *et al.*, 1983). De plus, dans le placenta humain, l'expression du gène *c-myc* coïncide avec l'activité particulièrement proliférante de certaines cellules immatures *i.e.* les cytotrophoblastes (Pfeifer-Ohlsson *et al.*, 1984). Enfin, une baisse du taux de mARN *c-myc* accompagne souvent l'induction de la différenciation, par différents agents, de certaines cellules établies en lignées (Reitsma *et al.*, 1983 ; pour revue, Müller, 1986). Ces observations suggèrent que le gène *c-myc* pourrait être impliqué dans la prolifération cellulaire. Cependant, ce gène pourrait aussi jouer un rôle dans l'établissement de l'état différencié pour certaines cellules. En effet, dans des cellules érythroleucémiques de souris induites à se différencier par le diméthylsulfoxyde un rapide changement biphasique du taux d'ARN *myc* est détecté (Lachman *et al.*, 1985). Dans la première phase, il est observé une baisse du taux d'ARN *myc* avec extinction totale de l'expression de ce gène 4 heures après l'induction. Cette étape pourrait être nécessaire au blocage de la différenciation cellulaire. Une nouvelle vague d'expression du gène *myc* qui requiert une néosynthèse protéique est détectée entre 12 et 30 heures. Or une période de latence de 12 à 24 heures est nécessaire pour que l'effet de l'inducteur soit observé. Ainsi la nouvelle vague d'expression du gène *myc* pourrait être requise pour conduire les cellules érythroleucémiques vers leur état de différenciation érythroïde terminale.

### B - Le gène *myc* et l'induction de l'état de compétence

La prolifération des cellules normales en culture est contrôlée par des facteurs de croissance. Sans ces derniers, les cellules quittent le cycle cellulaire et passent à l'état quiescent de manière réversible en s'installant en phase  $G_0/G_1$ . L'induction de la prolifération cellulaire pour des fibroblastes BALB/c-3T3 quiescents demande l'action séquentielle de certains facteurs de croissance. La première étape peut être contrôlée par le facteur de croissance dérivé des plaquettes sanguines ou PDGF (Pledger *et al.*, 1978). Ce facteur permet l'entrée de la cellule dans l'état dit de compétence. Cet état est caractérisé par de nouvelles synthèses d'ARN et de protéines. Seulement cette activation du métabolisme cellulaire ne permet pas d'emmener les fibroblastes en phase S. D'autres événements moléculaires qui requièrent l'action de facteurs de croissance tels que l'insuline ou l'EGF sont nécessaires pour que la synthèse de l'ADN suivie de la mitose s'effectuent. Le PDGF en induisant l'état de compétence stimule l'expression du gène *c-myc* (Kelly *et al.*, 1983). L'expression transiente de ce gène est aussi observée dans des lymphocytes stimulés par des lectines (concanavalline A ou lipopolysaccharide), facteurs qui induisent également l'état de compétence. Le taux maximal de mARN *myc* est obtenu après deux heures de stimulation et il retourne au niveau

basal avant la synthèse d'ADN (Kelly *et al.*, 1983). Cette rapide induction de l'expression du gène c-myc suggère que ce gène est directement régulé par les événements moléculaires qui suivent immédiatement la fixation du PDGF ou des lectines sur leurs récepteurs cellulaires. En effet, l'inhibition de la synthèse protéique qui bloque le passage des cellules des phases G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> à la phase S (Brooks, 1977) n'inhibe pas l'expression du gène c-myc. De ce fait, l'augmentation du taux d'ARN myc dans ces cellules n'est pas un effet secondaire de la croissance. En outre, Kelly *et al.* (1983) ont montré qu'il existe une corrélation entre l'augmentation du taux de mARN myc et l'induction de l'état de compétence pour des concentrations croissantes de PDGF. Comme corollaire à cette observation, les travaux suivants peuvent être cités. Il a été rapporté que la transformation d'une lignée fibroblastique de souris par les carcinogènes chimiques est associée à une dérégulation du gène c-myc rendant l'activation de ce dernier indépendante des facteurs de croissance (Campisi *et al.*, 1984).

La question qui se pose alors est de savoir si la stimulation de l'expression du gène c-myc est nécessaire ou suffisante à l'induction de l'état de compétence. Il a été montré récemment que l'injection de protéines myc dans des fibroblastes quiescents permet l'induction de l'état de compétence (Kaczmarek *et al.*, 1985). Ainsi, l'expression du gène myc pourrait être un événement suffisant susceptible de déclencher les mécanismes moléculaires qui permettraient à la cellule d'entrer en phase G<sub>1</sub>. Par contre une fois installée dans le cycle cellulaire, la cellule semble ne plus avoir besoin d'une surexpression ponctuelle du gène c-myc pour effectuer plusieurs cycles de division (Thompson *et al.*, 1985 ; Hann *et al.*, 1985 ; Rabbits *et al.*, 1985a) bien qu'une légère augmentation du taux d'ARN myc au cours de la mitose soit observée (Rabbits *et al.*, 1985a).

Cependant certains travaux montrent que non seulement l'expression du gène myc n'est pas nécessaire à l'établissement de la compétence mais que de surcroît elle n'est pas suffisante. En effet, Coughlin *et al.* (1985) ont montré que le PDGF peut dans certaines conditions induire l'état de compétence dans les fibroblastes sans que le pic d'accumulation des ARN myc soit observé. De plus, l'activation du gène myc per se ne confère pas l'état de compétence à des lymphocytes B (Smeland *et al.*, 1985) ou à des fibroblastes BALB/c-3T3 (Armelin *et al.*, 1984). Le fait que d'autres fonctions inductibles doivent être présentes pour potentialiser celle du gène myc ne doit pas étonner outre mesure. En effet, le PDGF en induisant l'état de compétence des cellules fibroblastiques stimule l'expression de 10 à 30 gènes (Zullo *et al.*, 1985). Emettre l'hypothèse que ces gènes doivent interagir semble raisonnable mais faut-il encore le démontrer. Parmi les différents gènes stimulés par le PDGF fut découvert un autre oncogène, l'oncogène c-fos homologue cellulaire du gène transformant du virus de l'ostéosarcome FBJ (Cochran *et al.*, 1984 ; Kruijer *et al.*, 1984). L'expression de cet oncogène dont le produit est à localisation nucléaire, est transiente et plus rapide encore que celle du gène c-myc (Kruijer *et al.*, 1984). Cependant jusqu'à présent force est de constater qu'aucune relation étroite entre l'induction des gènes c-fos et c-myc n'a pu être établie. En résumé, toutes ces expériences suggèrent que le gène myc pourrait être impliqué dans l'établissement de l'état de compétence mais elles ne renseignent en rien sur le rôle du gène c-myc dans la

prolifération cellulaire. De plus, diverses autres observations rapportées à propos de l'induction de ce gène par différents facteurs ne simplifient pas la détermination de la (des) fonction(s) du gène myc. En effet, contrairement à certaines données antérieures (Kelly *et al.*, 1983), Coughlin *et al.* (1985) ont montré que l'expression du gène myc est stimulée par l'EGF dans des fibroblastes. Or ce facteur de croissance a été impliqué dans l'induction de l'état de progression cellulaire et non dans l'induction de l'état de compétence. En outre, l'expression du gène c-myc est aussi induite par l'EGF dans des cellules dont la croissance est inhibée par ce facteur. Enfin, le taux d'ARN myc augmente dans des cellules traitées par le CNBr-EGF (EGF clivé par le bromure de cyanogène) qui n'est plus mitogène mais qui reste capable d'induire certains événements précoces similaires à ceux induits par l'EGF (Bravo *et al.*, 1985). Ainsi ces résultats compliquent les données du problème du rôle du gène myc en suggérant que l'augmentation du taux d'ARN myc ne serait pas strictement corrélée avec l'induction de la prolifération mais serait plutôt une conséquence directe de la fixation du facteur de croissance sur son récepteur.

### C - Le gène myc et le contrôle de la transcription

Toute protéine stimulant la transcription d'un gène par activation de ses séquences promotrices est appelée activateur *en trans*. Nous avons déjà signalé que les protéines myc présentent des homologies de séquences avec les protéines E1A de l'adénovirus impliquées dans la stimulation transcriptionnelle de nombreux gènes viraux et cellulaires. En outre, le fait que les protéines myc se lient à l'ADN *in vitro* suggère qu'elles pourraient jouer un rôle dans la régulation de l'expression génique. Récemment, l'activation *en trans* par les produits du gène myc d'un promoteur d'un gène codant pour une protéine de choc thermique (Hsp70) de drosophile a été décrite (Kingston *et al.*, 1984). Ce même promoteur est aussi stimulé *en trans* par le produit du gène E1A. La fonction du gène Hsp70 est inconnue, mais elle est probablement importante pour la cellule puisque le produit de ce gène est très conservé de la bactérie aux organismes animaux. A ce propos, il est à noter que dans les cellules de tératocarcinomes murins (F9) qui expriment de manière constitutive un gène codant pour une protéine de choc thermique Hsp70, une activité similaire à celle de la protéine E1A a été détectée (Impériale *et al.*, 1984). Or le gène c-myc s'exprime dans ces cellules. De plus, lorsque les cellules F9 sont induites à se différencier la perte de l'activité similaire à celle de la protéine E1A est corrélée avec l'extinction du gène myc (Dony *et al.*, 1985) et du gène Hsp70. Bien que ces corrélations soient troublantes il reste à prouver que dans ces cellules les produits du gène myc sont effectivement impliqués dans la régulation du gène Hsp70. En conclusion, ces données suggèrent que le gène myc pourrait appartenir à une famille de gènes dont la fonction aurait trait à la régulation génique.

## VI - LE GENE *myc* ET LA TRANSFORMATION CELLULAIRE

L'analyse du pouvoir transformant du gène *myc* peut être effectuée sur des cellules en culture. Le gène *myc* est introduit dans les cellules soit par l'intermédiaire d'un virus (type MC29) soit par transfection de clones moléculaires du gène *myc*. La transformation des cellules par le gène *myc* est alors définie par différents critères:

- Les cellules peuvent avoir une morphologie différente de celle de leurs homologues normales.
- Les cellules peuvent avoir acquis la capacité de croître en agar semi-solide (critère de transformation défini par Macpherson et Montagnier (1964)).
- Les cellules peuvent être rendues immortelles.
- Enfin, les cellules peuvent être tumorigènes chez l'animal.

Des différences dans le pouvoir transformant du gène *myc* suivant les cellules et l'espèce animale auxquelles l'expérimentateur s'adresse, ont été rapportées. Ainsi, l'induction de la transformation de certaines cellules est rendue possible par la seule expression du gène *myc* alors que dans d'autres systèmes cellulaires l'action coopérative d'un second oncogène semble nécessaire à la transformation.

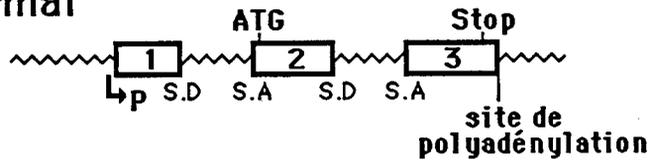
### A - Transformation des cellules aviaires par le gène *myc*.

Il a été montré que les virus de la myélocytomatose aviaire (MC29, OK10, CMII et MH2) transforment les fibroblastes et les macrophages *in vitro* (Graf et Beug, 1978 ; Graf et Stéhelin, 1982). Cette transformation est caractérisée par un changement morphologique des cellules et par leur capacité à pousser en agar semi-solide. Le gène *myc* humain normal, surexprimé à l'aide d'un promoteur viral, est également capable de transformer des fibroblastes embryonnaires de caille (Martin *et al.*, 1986). Par contre le gène *v-myc* seul est incapable de transformer des cultures de neurorétine alors que l'expression concomitante des gènes *v-myc* et *v-mil* (portés par le virus MH2) permet la transformation de ces cultures. La seule expression du gène *v-mil* n'induit pas non plus la transformation des cultures de neurorétine mais par contre peut les mitogéniser (Béchade *et al.*, 1985). Une autre différence dans le pouvoir oncogène du gène *myc* a été mise en évidence par l'étude de mutants du virus MC29 (MC29td10A, td10C et td10H) qui possèdent un gène *myc* dont le produit a perdu la capacité de se lier à l'ADN. La perte de cette propriété du produit du gène *myc* empêche la transformation, par ces virus, des macrophages mais pas des fibroblastes (Ramsay *et al.*, 1980 ; Enrietto and Hayman, 1982).

### B - Transformation des cellules murines par le gène *myc*.

Contrairement à ce qui vient d'être vu pour le système aviaire, l'expression du gène *v-myc*

Gène c-myc normal  
du poulet



Gène c-myc "LTR activé"

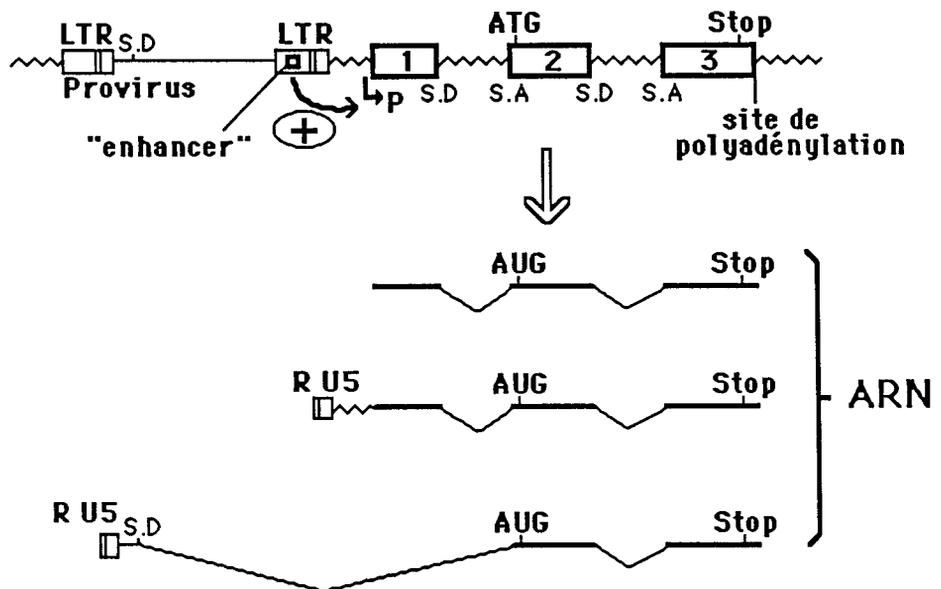


Schéma 7 : Expression du gène c-myc  
par "LTR activation".

ou du gène c-myc activé ne semble pas suffisante pour transformer des fibroblastes embryonnaires de rat (REF) (Land *et al.*, 1983). Cependant, il a été montré que le gène c-myc peut coopérer avec l'oncogène ras, activé dans de nombreuses tumeurs, pour transformer les cellules. Les termes de la coopération ne sont pas clairement établis. Toutefois, les expériences de Land *et al.* (1983) semblent indiquer que le gène ras activé transforme morphologiquement les REF sans les rendre tumorigènes et sans les immortaliser tandis que le gène myc activé immortaliserait ces cellules sans les transformer et sans les rendre tumorigènes. Des résultats similaires ont été obtenus avec des cellules épithéliales de rein de jeunes rats (BRK) (Ruley *et al.*, 1984). Toutefois, des résultats contradictoires ont été obtenus par Vennstrom *et al.* (1984). Ces auteurs ont montré qu'un gène v-myc (celui du virus OK10) serait capable d'induire la transformation de fibroblastes embryonnaires murins. Cette contradiction pourrait être due au fait que dans ces études, les différentes équipes ont utilisé des gènes myc différents et des critères de transformation également différents.

## VII - IMPLICATION DE L'ONCOGENE c-myc DANS DIFFERENTS CANCERS

Il a été montré que l'activation des oncogènes cellulaires peut être obtenue par les différents mécanismes suivants (qui ne sont pas mutuellement exclusifs):

- la "LTR activation" d'un proto-oncogène qui peut être le résultat de l'intégration dans l'ADN cellulaire d'un virus sans oncogène au voisinage du proto-oncogène considéré.

- les phénomènes d'amplification génique qui aboutissent à la surexpression du proto-oncogène amplifié

- les phénomènes de translocations chromosomiques qui peuvent déréguler l'expression d'un proto-oncogène

- enfin, l'apparition de mutations somatiques dans les proto-oncogènes a aussi été impliquée dans leurs dérégulations

Ces différents modes d'activation pourraient déréguler le proto-oncogène myc dans différents cancers. Les dérégulations de ce gène seraient impliquées dans l'émergence de ces cancers.

### A - La "LTR activation" du gène c-myc

La "LTR activation" du gène myc cellulaire a été décrite dans des tumeurs lymphoïdes chez plusieurs espèces. L'exemple le plus étudié est l'activation du gène c-myc dans des lymphomes B chez le poulet. L'intégration d'un virus ALV entier ou incomplet à proximité ou dans le locus myc peut résulter en une stimulation de l'expression du gène myc (schéma 7) (Neel *et al.*, 1981 ; Hayward *et al.*, 1981 ; Payne *et al.*, 1982 ; Linial et Groudine, 1985 ; Linial *et al.*, 1985). Les ARN myc peuvent être activement transcrits soit à partir de leur propre promoteur soit à partir du promoteur du LTR. Le taux de transcription de ce gène est alors 20 à 30 fois celui trouvé dans des cellules B

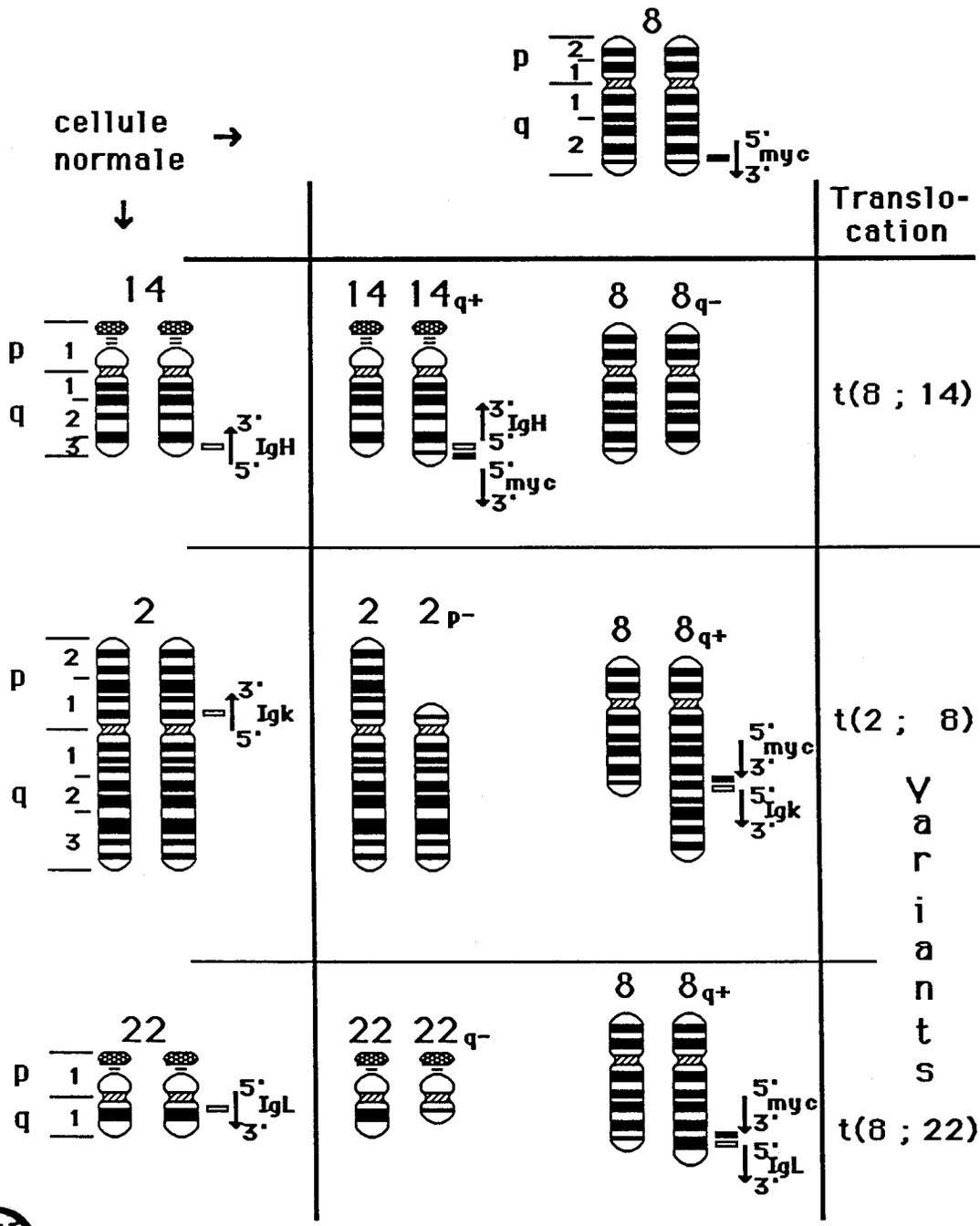


Schéma 8 :

Chromosomes impliqués dans les Lymphomes de Burkitt

- Localisation de l'allèle transloqué du gène c-myc
- = Localisation des allèles transloqués des gènes d'immunoglobulines

↓ 5' Orientation transcriptionnelle  
3' des gènes

contrôles. Dans certains cas de LTR activation, des altérations de la séquence codante du gène myc ont été décrites (Westaway *et al.*, 1984). Cependant, le rôle joué par l'activation du gène myc dans ces tumeurs n'est pas connu. Toutefois, l'émergence des lymphomes de type B chez des poulets infectés par un ALV pouvant être divisée en deux étapes, il est possible d'émettre l'hypothèse qu'à l'une des étapes correspond l'activation du gène myc. Ainsi, le gène myc activé semblerait impliqué dans la formation des follicules prénéoplasiques qui constitue la première étape. Cependant un deuxième événement non encore caractérisé serait nécessaire pour bloquer la régression des follicules prénéoplasiques qui pourraient alors évoluer vers un état néoplasique (Cooper *et al.*, 1968 ; Neiman *et al.*, 1980 ; 1985).

#### B - Activation du gène c-myc par amplification génique

L'amplification du gène myc a été décrite dans de nombreuses cellules transformées ainsi que dans certaines tumeurs. Une augmentation de l'expression des ARN myc est corrélée avec des amplifications géniques dans des lignées issues de tumeurs de carcinomes de poumon (Little *et al.*, 1983), de carcinomes du colon (Alitalo *et al.*, 1983b), de carcinomes du rein (Kozbor et Croce, 1984). Le gène myc a aussi été trouvé amplifié dans la lignée cellulaire HL60 (Dalla-Favera *et al.*, 1982). Le fait qu'un oncogène de la famille des gènes ras, l'oncogène N-ras, soit également activé dans les cellules HL60, suggère que ces deux oncogènes pourraient coopérer pour transformer ces cellules (Murray *et al.*, 1983).

#### C - Activation du gène c-myc par translocation chromosomique

Ce mode d'activation du gène myc a été trouvé dans deux types de cancers mammifères d'origine lymphocytaire, les plasmocytomes chimio-induits chez la souris et les lymphomes de Burkitt (BL) chez l'homme. Ces cancers sont le résultat de prolifération monoclonale et maligne de lymphocytes B qui ont subi des translocations spécifiques. Ces dernières possèdent la caractéristique générale de placer l'oncogène c-myc dans le voisinage de gènes d'immunoglobulines (pour revue: Kaplan et Szajnert, 1985). L'étude de l'activation du gène c-myc dans ces cellules a notamment donné accès à certaines caractéristiques de la régulation complexe de ce gène. Les deux modèles humains et murins étant similaires seul le modèle humain sera développé dans ce mémoire.

1) Le gène c-myc est placé dans le voisinage des gènes d'immunoglobulines dans les lymphomes de Burkitt.

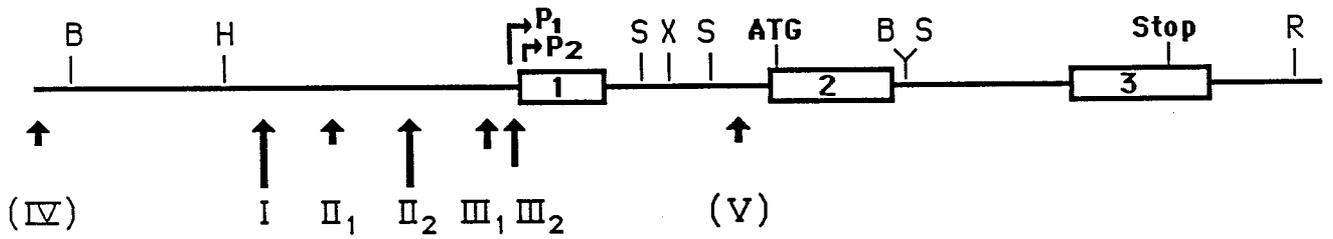
Une des constantes de ces lymphomes est la translocation réciproque entre le chromosome 8 dans la bande q24 porteuse du gène myc et l'un des chromosomes 2, 22 ou 14 dans les bandes p13, q11 ou q32 porteuses des gènes des chaînes légères Kappa, Lambda ou des chaînes lourdes respectivement (schéma 8) (Manalova *et al.*, 1979 ; Berhneim *et al.*, 1981 ; Neel *et al.*, 1982 ;

Taub *et al.*, 1982 ; Kirsch *et al.*, 1982 ; Malcolm *et al.*, 1982). De plus, il a été montré au niveau moléculaire que ces échanges chromosomiques plaçaient toujours le gène myc en 5' des gènes des régions constantes des chaînes d'immunoglobulines (pour revue: Kaplan et Szajnert, 1985). Par contre, le type d'échange chromosomique et les points de recombinaisons sont variables. En effet, dans les BL (8,14) le gène myc est transloqué du chromosome 8 sur le chromosome 14, dans les BL (8,22) ou t (2,8) ce sont les régions constantes des chaînes légères Lambda ou Kappa qui sont transloquées sur le chromosome 8 (Croce *et al.*, 1983 ; Hollis *et al.*, 1984). La majorité des translocations t(8,14) ont eu lieu dans une zone de 10 kbp en 5' du deuxième exon du gène c-myc. Les points de recombinaison, dans le cas des translocations impliquant les gènes des chaînes légères, ont été localisés en 3' du gène c-myc à quelques dizaines de kbp (Adams *et al.*, 1983 ; Dalla-Favera *et al.*, 1983 ; Marcu *et al.*, 1983 ; Erikson *et al.*, 1983).

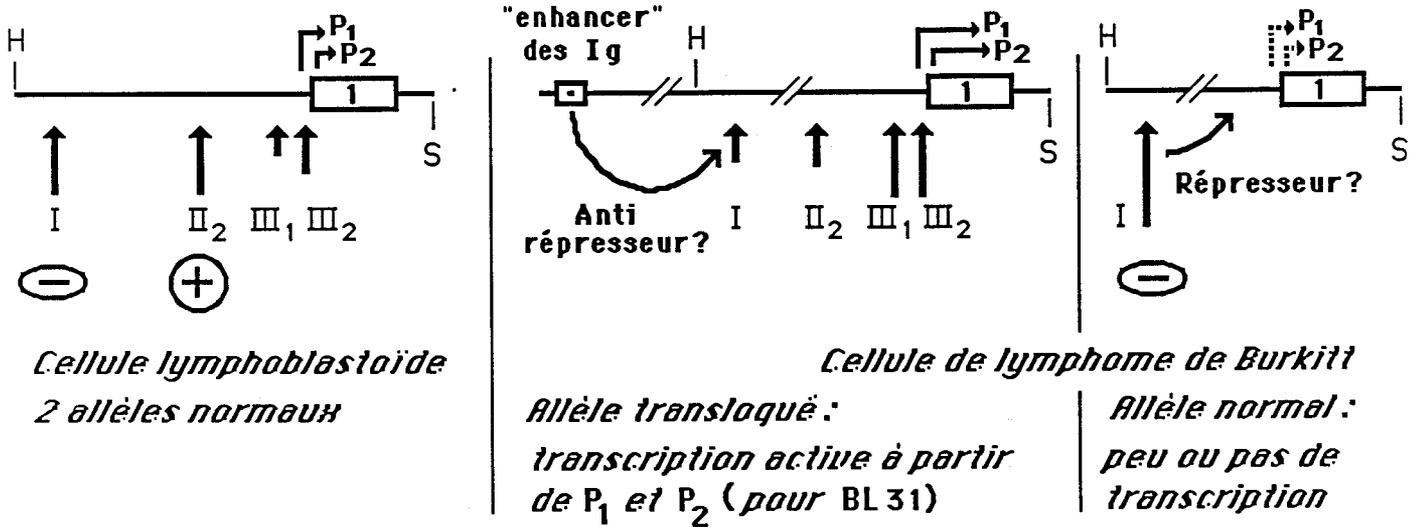
## 2) Activation du gène c-myc dans les lymphomes de Burkitt.

Aucun consensus au niveau du mécanisme d'activation du gène myc dans ces lymphomes n'a pu être établi, sans doute parce que formellement il n'en n'existe pas. En effet, à la grande diversité de cassures et recombinaisons chromosomiques sont associées de nombreuses possibilités d'activation du gène myc - dérégulation transcriptionnelle, post-transcriptionnelle ou traductionnelle de l'allèle c-myc transloqué, mutations ponctuelles dans la partie codante de cet allèle - qui ne sont pas mutuellement exclusives (pour revue: voir Kaplan et Szajnert, 1985). Toutefois, il ressort de l'étude de nombreux BL que le contexte cellulaire pourrait être un facteur déterminant dans l'activation du gène c-myc. En effet, il a été proposé que certains facteurs d'activation, spécifiques du stade de maturation du lymphocyte, pourraient interagir avec des séquences activatrices de l'allèle transloqué et par ce biais activer le gène c-myc placé dans cet environnement (Croce *et al.*, 1984 ; Feo *et al.*, 1986). Jusqu'à présent, il n'a été décrit qu'un seul cas de BL pour lequel une séquence activatrice bien caractérisée des gènes d'Ig ("enhancer") semble impliquée dans la stimulation de l'expression du gène myc (Hayday *et al.*, 1983).

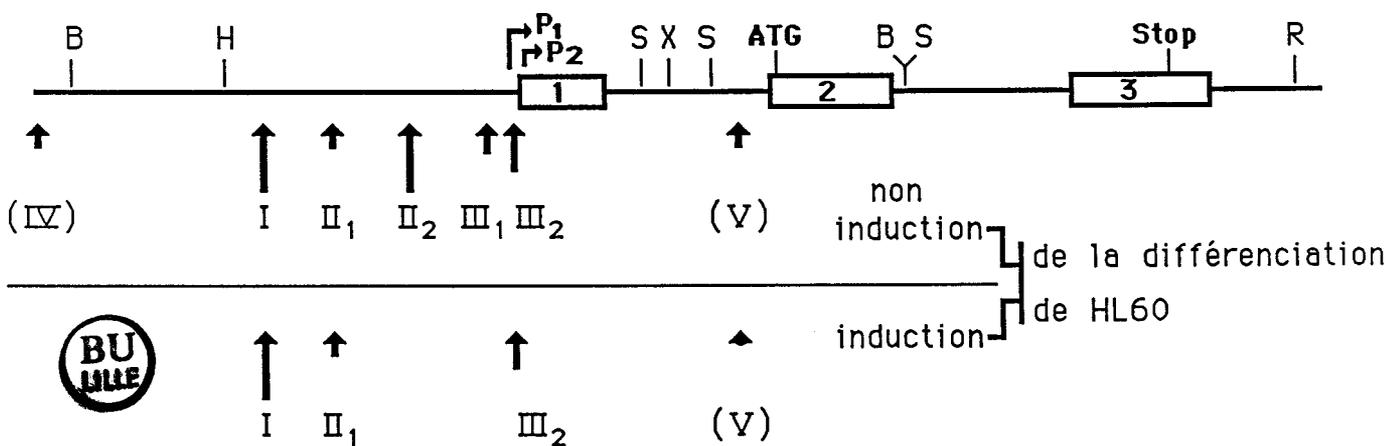
Enfin, il est à noter que d'autres oncogènes tels que les oncogènes N-ras ou B-lym ont été également trouvés activés dans ces lymphomes (Murray *et al.*, 1983 ; Diamond *et al.*, 1983). On peut ainsi émettre l'hypothèse que l'action coopérative de l'un de ces deux oncogènes avec le gène myc pourrait être un événement déterminant dans l'émergence des BL considérés. Adams *et al.* (1985) en analysant l'incidence de l'activation du gène c-myc dans l'émergence des lymphomes de type B sont également arrivés à la conclusion que la seule dérégulation du gène myc ne serait pas suffisante pour que les cellules B se transforment. En effet, ces auteurs ont montré que dans des souris transgéniques porteuses dans leur génome d'un gène myc exogène placé sous l'influence d'un enhancer d'Ig, les lymphomes B induits sont clonaux. Or la présence dans la cellule souche du gène c-myc placé sous contrôle de l'enhancer des Ig devrait conduire à une forte expression de ce gène dans tous les lymphocytes B. Ainsi, la clonalité de ces lymphomes suggère qu'en plus de la surexpression du gène c-myc, un second événement serait nécessaire pour générer une cellule



A



B



**Schéma 9 :** Régulation transcriptionnelle  
du gène c-myc.

pleinement transformée. Cet événement supplémentaire pourrait être dû, par exemple, à une ou plusieurs mutations dans le gène myc qui permettraient la suractivation de ce dernier.

## VIII - LA REGULATION DU GENE c-myc

La régulation de ce gène est complexe et joue à quatre niveaux distincts : transcriptionnel, post-transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel.

### A - Régulation du gène c-myc au niveau transcriptionnel

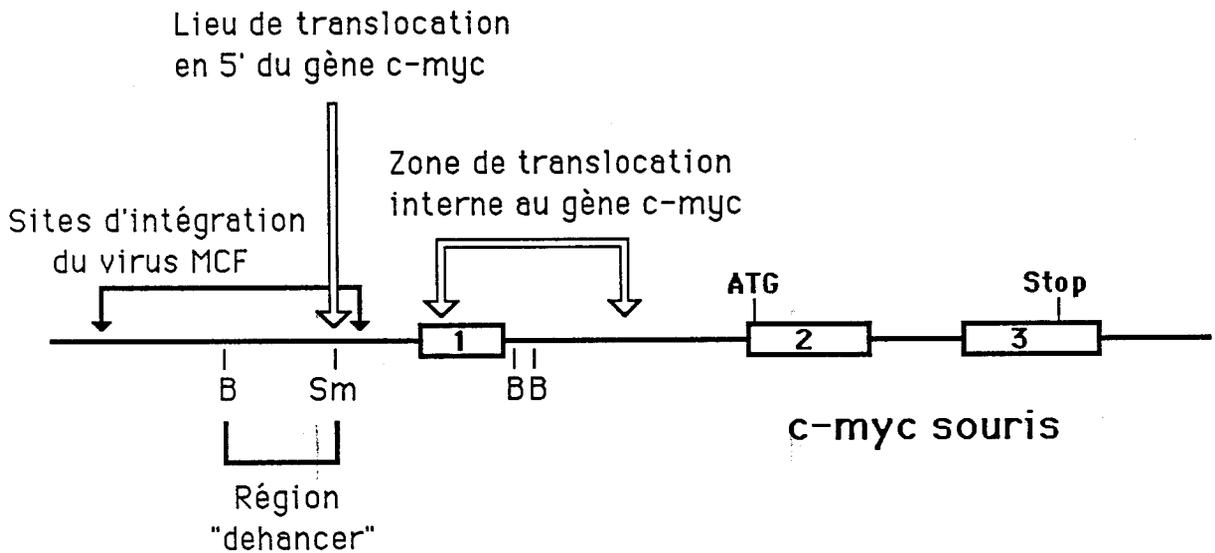
#### 1) Zones putatives de régulation de la transcription en 5' du locus c-myc.

Une analyse structurale du locus myc a été effectuée à l'aide d'une nucléase, la DNase I, capable de déceler des changements dans la structure locale de la chromatine. Comme l'indique le schéma 9, la répartition des différents sites de sensibilité à la DNase I varie suivant le type de cellule et même d'allèle du gène myc considéré (Siebenlist *et al.*, 1984). Or certaines corrélations entre des changements dans la répartition des sites et l'activation ou l'inhibition de l'expression du gène myc ont pu être établies. Ainsi une meilleure détection du site I (schéma 9A) a été corrélée avec l'inhibition de l'expression de l'allèle normal du gène myc dans le lymphome de Burkitt BL31. Ce site a donc été considéré comme une zone putative de régulation négative agissant *in cis* sur l'activation du gène myc. Par des procédés déductifs similaires, les sites II (schéma 9A) ont été assignés zones de régulations positives susceptibles de fixer une protéine régulatrice qui serait présente dans les noyaux des cellules considérées (Siebenlist *et al.*, 1984).

Ces travaux ont été en partie confirmés par Dyson *et al.* (1985). En effet, ces auteurs ont montré que dans les cellules promyélocytiques humaines HL60 induites à se différencier, la chute du taux d'expression des ARN myc est corrélée avec une baisse de la détectabilité du site II par la DNase I (schéma 9B). D'autres sites pouvant être rendus sensibles à la DNase I ont été décrits : les sites III qui correspondent aux régions de promotion normale du gène myc (promoteur P1 et P2), le site V qui pourrait correspondre au promoteur cryptique décrit par Colby *et al.* (1983) et enfin le site IV qui comme le site II voit sa détectabilité chuter lors de l'induction de la différenciation des cellules HL60.

Si l'apparition ou la disparition des sites sensibles à la DNase I sont corrélées avec des modifications du taux d'ARN myc et semblent de ce fait impliquer les zones considérées dans la régulation de la transcription, aucune démonstration directe de leur intervention dans ce processus de régulation n'a été rapportée. En effet, ces variations du taux d'ARN pourraient être le fait d'une régulation post-transcriptionnelle. Cependant, d'autres expériences ont montré que le gène myc était au moins en partie régulé au niveau transcriptionnel (Greenberg et Ziff, 1984 ; Einat *et al.*, 1985 ; Eick *et al.*, 1985 ; Remmers *et al.*, 1986). En outre, dans le cas des lymphomes de Burkitt t (2,8) ou

A)



B)

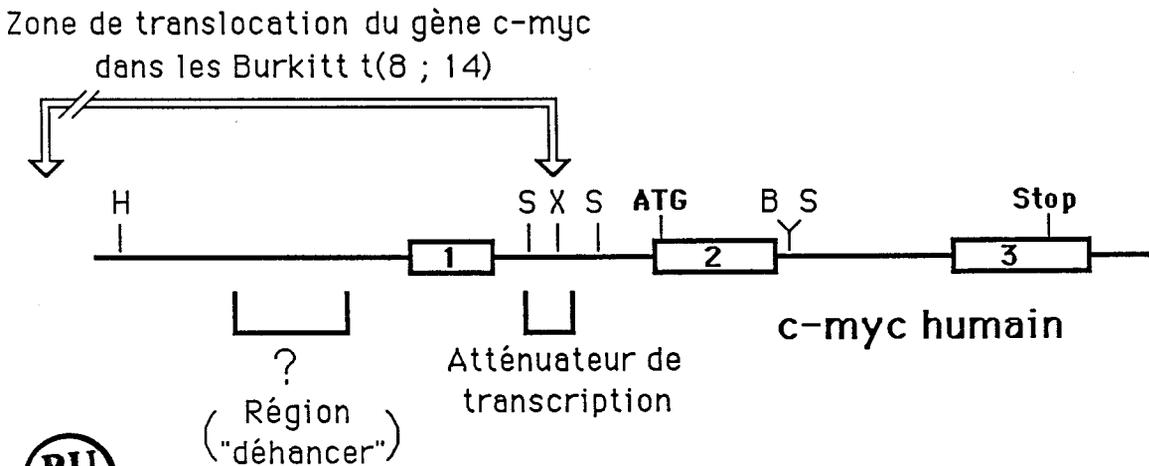


Schéma 10 : Régions impliquées dans le contrôle négatif de la transcription du gène c-myc A) de souris B) humain.

t(22,8) où la translocation amène les régions constantes des gènes d'Ig à 10 kbp et en 3' du locus myc sans apparemment altérer sa structure, il semble raisonnable de penser que l'expression élevée des ARN myc est le résultat d'une dérégulation de la transcription soit en l'activant soit en modifiant le choix des promoteurs.

### 2) Régulation transcriptionnelle au niveau du choix des promoteurs.

Il a été montré que les deux promoteurs du gène de l'  $\alpha$ -amylase murine sont activés de manière différentielle lors de la différenciation des glandes parotides (Shaw *et al.*, 1985). Ainsi, le choix d'un promoteur peut être un élément important de régulation génique. Le taux relatif d'ARN transcrit à partir des deux promoteurs normaux P1 et P2 des gènes myc humain et murin varie suivant le type cellulaire considéré. En effet, le rapport P1/P2 des ARN est plus élevé dans les cellules transformées que dans les cellules normales (Taub *et al.*, 1984a). Or dans certaines cellules humaines, les deux ARN initiés aux sites P1 et P2 ont la même stabilité (Dani *et al.*, 1984), ceci suggère que les variations du rapport P1/P2 des ARN seraient dues au choix du promoteur lors de la transcription. En outre, une corrélation a pu être établie entre un changement dans le choix des promoteurs et la détectabilité par la DNase I de ces zones du locus myc (Siebenlist *et al.*, 1984 ; Dyson *et al.*, 1985). Dans les lymphomes de Burkitt ou les plasmocytomes murins des translocations opérant en 5' du locus myc pourraient être responsables d'un changement dans le choix des promoteurs (Taub *et al.*, 1984a ; Yang *et al.*, 1985). Dans ces cellules, l'analyse du locus myc transloqué indique que l'élément de régulation s'il existe se situerait à au moins 350 bp en 5' de l'exon 1 (schéma 10) (Bernard *et al.*, 1983 ; Wiman *et al.*, 1984 ; Yang *et al.*, 1985). Enfin, dans cette même région, Remmers *et al.* (1986) ont mis en évidence des séquences de contrôle négatif de la transcription du gène myc chez la souris. Ces séquences sont situées en 5' du promoteur P1 entre les bases -428 et -1188 (le promoteur P1 étant pris pour 0) (schéma 10-A) et possèdent des propriétés opposées à celles des séquences activatrices. De ce fait, elles ont été baptisées: région "désactivatrice" de transcription.

### 3) Régulation de l'élongation de la transcription.

Récemment, Bentley et Groudine (1986) ont montré qu'un blocage de l'élongation de la transcription pouvait rendre compte de la chute du taux d'ARN myc lors de l'induction de la différenciation des cellules HL60 en granulocytes par l'acide rétinoïque. Le blocage de l'élongation se produirait dans la partie 5' de l'intron 1 du gène myc. Une région riche en résidus thymidines située dans l'intron 1 (à 300 bp de l'extrémité 3' de l'exon 1) pourrait être responsable de l'arrêt de l'élongation de la transcription (schéma 10-B). En effet, des séquences nucléotidiques similaires ont déjà été impliquées dans la terminaison de la transcription de différents gènes eucaryotes (Maderious et Chen King, 1984 ; Sato *et al.*, 1986). Cependant, des analyses ultérieures seront nécessaires pour établir si la séquence riche en thymidines située dans l'intron 1 fonctionne effectivement comme un terminateur de transcription.

En conclusion, de nombreux éléments de régulation de la transcription pourraient

exister dans le locus myc. Ainsi, par exemple, certains éléments semblent impliqués dans le choix des promoteurs, lequel choix pourrait être critique dans la régulation du métabolisme cellulaire. Or les deux ARN myc (2.4 - 2.5 kb) ont la même durée de vie et peuvent coder pour le même produit. Aussi, pour que le choix des promoteurs puisse jouer un rôle, il faut supposer que les différences structurales qui caractérisent les deux ARN soient suffisantes pour que la machinerie cellulaire les différencie. Ainsi, cette modulation de l'expression du gène myc pourrait être due à une différence de traductibilité de ces ARN qui se distinguent par leurs séquences leaders. Le choix du site de polyadénylation (deux sites décrits par Gazin *et al.*, 1984) pourrait également intervenir dans la différenciation des ARN myc.

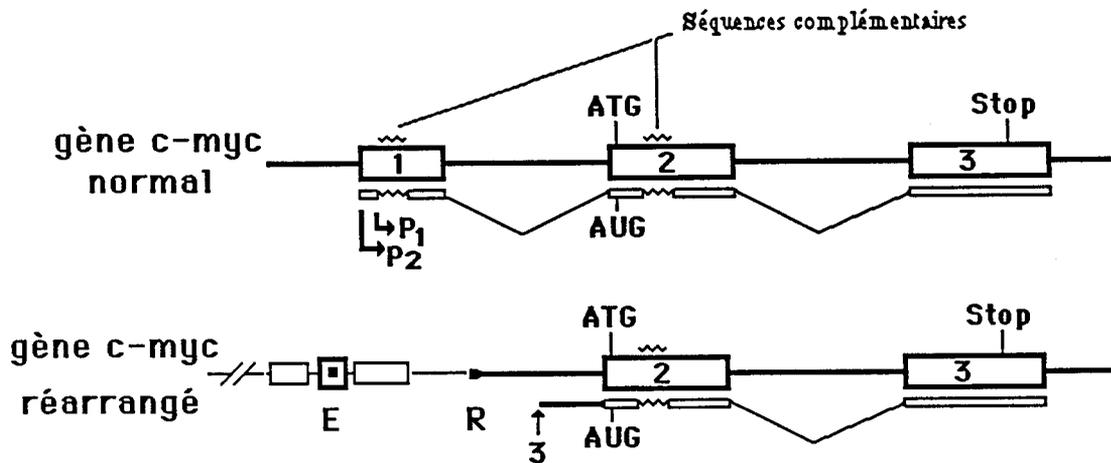
Cependant l'activation (ou l'inhibition) de la transcription ne peut pas à elle seule expliquer dans de nombreux cas le taux élevé (ou le faible taux) de transcrits du gène myc. De plus, la durée de vie très courte des ARN myc (de l'ordre de 15 minutes) suggère que ces derniers pourraient être soumis au niveau post-transcriptionnel à une étroite régulation (Dani *et al.*, 1984).

## B - Régulation du gène myc au niveau post-transcriptionnel

### 1) Stabilisation des ARN myc

L'augmentation du taux d'ARN myc lors de la transition  $G_0/G_1$  des fibroblastes quiescents induits à proliférer semble être due à la stabilisation des ARN plutôt qu'à une activation de la transcription (Blanchard *et al.*, 1985). Ces résultats sont en désaccord avec ceux du groupe de Leder qui suggèrent une régulation transcriptionnelle du gène myc (Siebenlist *et al.*, 1984). Cependant cette contradiction pourrait n'être qu'apparente car d'autres travaux suggèrent que ces deux types de régulation seraient concomittants (Greenberg et Ziff, 1984 ; Eick *et al.*, 1985). Quels sont les mécanismes qui régissent cette stabilisation des ARN myc ? Des travaux ont montré que dans certaines cellules normales ou transformées, la stabilisation des ARN myc peut être obtenue par arrêt de la synthèse des protéines (Dani *et al.*, 1984 ; Linial *et al.*, 1985). Ceci indique qu'une protéine labile pourrait être impliquée dans le processus de dégradation des ARN. Il est possible que dans les fibroblastes stimulés par un facteur de croissance, ce type de protéine labile soit réprimé, entraînant la stabilisation des ARN. Cependant dans d'autres systèmes cellulaires tel que le lymphome de Burkitt Daudi, l'arrêt de la synthèse des protéines n'a aucun effet sur la stabilisation des ARN myc. Enfin, cette stabilisation pourrait être promoteur-spécifique comme il semble que ce soit le cas pour les ARN des cellules HL60 (Dani *et al.*, 1984).

L'analyse de la stabilité des ARN myc tronqués mis en évidence dans les BL ou les plasmocytomes murins a permis de montrer que l'exon 1 pourrait jouer un rôle dans l'instabilité de ces ARN (Rabbits *et al.*, 1985b ; Piechaczyk *et al.*, 1985). En effet, les ARN myc qui ont perdu tout ou partie de l'exon 1 sont beaucoup plus stables que les ARN intacts. Leur durée de vie est multipliée par un facteur 4 (Piechaczyk *et al.*, 1985). Toutefois, il semblerait que ce ne soit pas les séquences de l'exon 1 par elles-mêmes qui conféreraient cette instabilité aux ARN myc normaux. Ceci est



Séquences complémentaires :

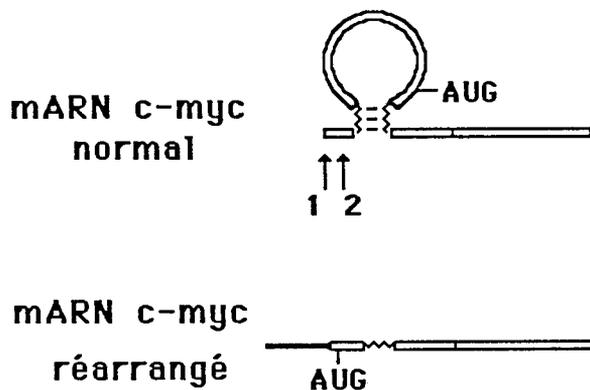
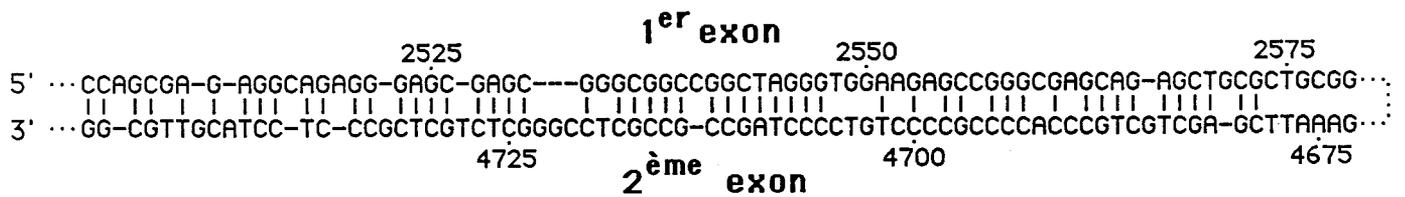


Schéma 11 : Régulation traductionnelle du gène c-myc.

suggéré par le fait que des ARN chimériques entre l'exon 1 et des séquences cellulaires présentent une stabilité équivalente aux ARN tronqués dans l'exon 1 (Eick *et al.*, 1985).

## 2) Déstabilisation des ARN myc

Il a déjà été mentionné dans ce mémoire que la différenciation de certaines cellules s'accompagne d'une chute dans le taux d'ARN myc. Dans le cas du BL Daudi induit à se différencier par l'interféron, la régulation négative du locus myc opère non seulement au niveau transcriptionnel (Einat *et al.*, 1985) mais également au niveau post-transcriptionnel (Dani *et al.*, 1985 ; Knight *et al.*, 1985). Un des mécanismes possibles pouvant rendre compte de cette régulation négative de l'expression du gène myc par l'interféron fait intervenir le système 2-5 A synthétase/RNase L. Ce système enzymatique impliqué dans la dégradation de certains ARN semble activé par l'ARN double brin (Dani *et al.*, 1985). Or, il a été rapporté que les ARN myc seraient capables de former une structure en double-brin (Battey *et al.*, 1983 ; Saito *et al.*, 1983). En outre, le système de la 2-5 A synthétase est induit au moment où le taux d'ARN myc baisse (Knight *et al.*, 1985). Tout ceci suggère que le système 2-5 A synthétase pourrait jouer un rôle dans la régulation post-transcriptionnelle des ARN myc.

En conclusion, la régulation post-transcriptionnelle des ARN myc ne semble pas être régie par les mêmes mécanismes dans les différentes cellules citées ce qui amène un degré supplémentaire dans la complexité de la régulation de ce gène.

## C - Régulation du gène myc au niveau traductionnel

La possibilité d'une régulation traductionnelle de l'expression du gène myc est étayée principalement par deux faits :

- D'une part, il existe dans les exons 1 et 2 de ce gène (au moins chez l'homme et la souris) de courtes séquences complémentaires qui pourraient permettre à l'ARN c-myc de former une structure stable en épingle à cheveux (schéma 11). Cette structure en emprisonnant dans sa boucle l'ATG initiateur des protéines myc bloquerait la traduction de l'ARN (Saito *et al.*, 1983 ; Darveau *et al.*, 1985).

- D'autre part, de nombreuses translocations du gène myc observées dans les BL résultent en une perte de l'exon 1 (pour revue, voir Kaplan et Szajnert, 1985). Ainsi les ARN initiés dans l'intron 1 ne peuvent plus présenter une structure en épingle à cheveux. De ce fait, la traduction de ce type d'ARN serait plus efficace que celle de l'ARN normal (Saito *et al.*, 1983). Cette hypothèse de régulation de la traduction par une structure secondaire particulière du mARN myc a été testée par différentes équipes. Les résultats font l'objet d'une controverse. Darveau *et al.* (1985) se sont intéressés à l'efficacité de la traduction *in vitro* de deux ARN myc murins qui diffèrent par leur séquence leader. Ils ont montré que l'ARN amputé de l'exon 1 était dix fois mieux traduit que l'ARN

contenant cet exon. Ces auteurs proposent que la structure en épingle à cheveux décrite par Saito *et al.*(1983) est responsable de la mauvaise traductabilité de l'ARN contenant le premier exon. Des résultats contraires ont été obtenus dans un système similaire à celui utilisé par Darveau *et al.*(1985) (Persson *et al.*, 1984b) ou en comparant le taux de traduction de différents ARN myc humains (avec ou sans exon 1) exprimés de manière transiente dans des cellules de singe (Butnick *et al.*, 1985).

#### D - Régulation du gène myc au niveau post-traductionnel

Récemment, Persson *et al.* (1986) ont montré que deux couples de protéines myc sont présents dans les cellules promyélocytiques HL60. L'un est phosphorylé (p64/p67), l'autre ne l'est pas (p65/p68). L'analyse de leurs stabilités respectives a permis à ces auteurs de proposer que la protéine p65 pourrait avoir comme précurseurs les trois autres protéines. Dans les cellules murines les deux protéines myc identifiées p60/p62 auraient également des durées de vie différentes (Persson *et al.*, 1985). Enfin, le taux relatif des protéines humaines myc phosphorylées p64/p67 serait différent suivant les types cellulaires (Hann et Eisenman, 1984).

#### E - Auto régulation du locus myc

Dans la quasi totalité des BL, l'allèle normal du locus myc ne s'exprime pas (Bernard *et al.*, 1983 ; Nishikura *et al.*, 1983). Il a été proposé que le produit du gène myc activé serait un élément d'une boucle de rétro-action qui opérerait *in trans* sur le locus normal mais qui n'aurait plus prise sur le locus transloqué. La capacité du produit myc à se lier à l'ADN renforce cette hypothèse. Le fait que dans le lymphome de Burkitt Raji le taux de mARN transcrit par le locus normal soit équivalent à celui transcrit par le locus transloqué n'est pas en désaccord avec le modèle. En effet, dans ces cellules le gène transloqué code pour une protéine altérée (Hann et Eisenman, 1984) qui pourrait ne plus remplir son rôle dans la régulation du gène normal (Rabbits *et al.*, 1983).

Cependant, Keath *et al.*(1984) ont montré que le gène myc murin normal activé par un promoteur viral et transfecté dans des cellules NIH/3T3 ne bloque pas la transcription de l'endogène myc. De plus, ces auteurs ont montré que les NIH/3T3 transfectées sont tumorigènes chez la souris nue et que dans cet environnement l'expression du gène myc endogène est bloquée. Il semblerait alors que des facteurs cellulaires autres que les produits du gène myc soient impliqués dans sa régulation.

**RESULTATS**

## I - ETUDE DU POUVOIR TRANSFORMANT DU GENE c-myc HUMAIN NORMAL

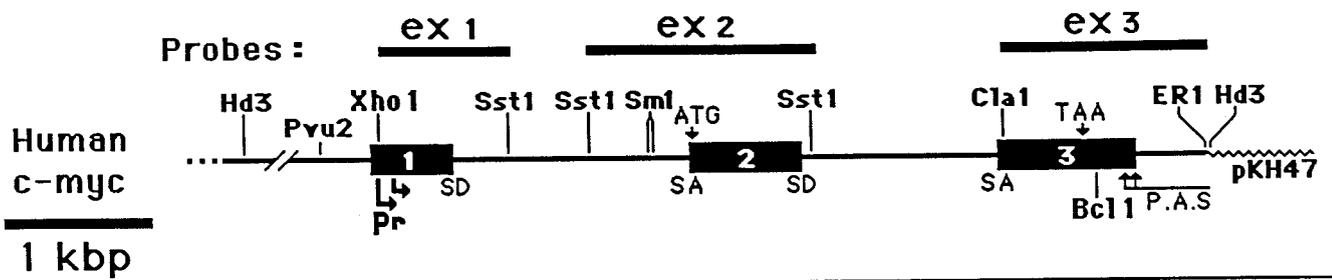
### A - Introduction

L'immense intérêt porté à l'étude du gène myc provient essentiellement du fait que ce gène est activé dans de nombreuses tumeurs. Les différents modes d'activation de l'oncogène myc pourraient consister de manière non exclusive soit en une dérégulation de son expression soit en des mutations somatiques survenues dans ses séquences codantes. Mais de "combien" doit être activé un tel gène pour acquérir un pouvoir transformant ? L'étude du pouvoir transformant de nombreux oncogènes a été effectuée *in vitro* sur différents systèmes cellulaires. Il a ainsi été montré que l'oncogène c-Ha-ras1 comme les oncogènes c-mos et c-fos sont capables lorsqu'ils sont surexprimés de transformer des fibroblastes *in vitro* (Blair *et al.*, 1981 ; Miller *et al.*, 1984 ; Chang *et al.*, 1982). Par contre, la surexpression du gène c-src normal ne lui confère pas un pouvoir transformant. En effet, ce gène doit être structurellement altéré pour acquérir une capacité à transformer les cellules (Shalloway *et al.*, 1984 ; Parker *et al.*, 1984). Qu'en est il de l'oncogène c-myc ? Des travaux récents ont montré que le gène c-myc humain normal surexprimé et associé à l'oncogène activé c-ras est capable de transformer des cellules embryonnaires de rat alors que les deux gènes exprimés séparément n'induisent pas, dans leurs conditions expérimentales, la transformation de ces cellules (Lee *et al.*, 1985).

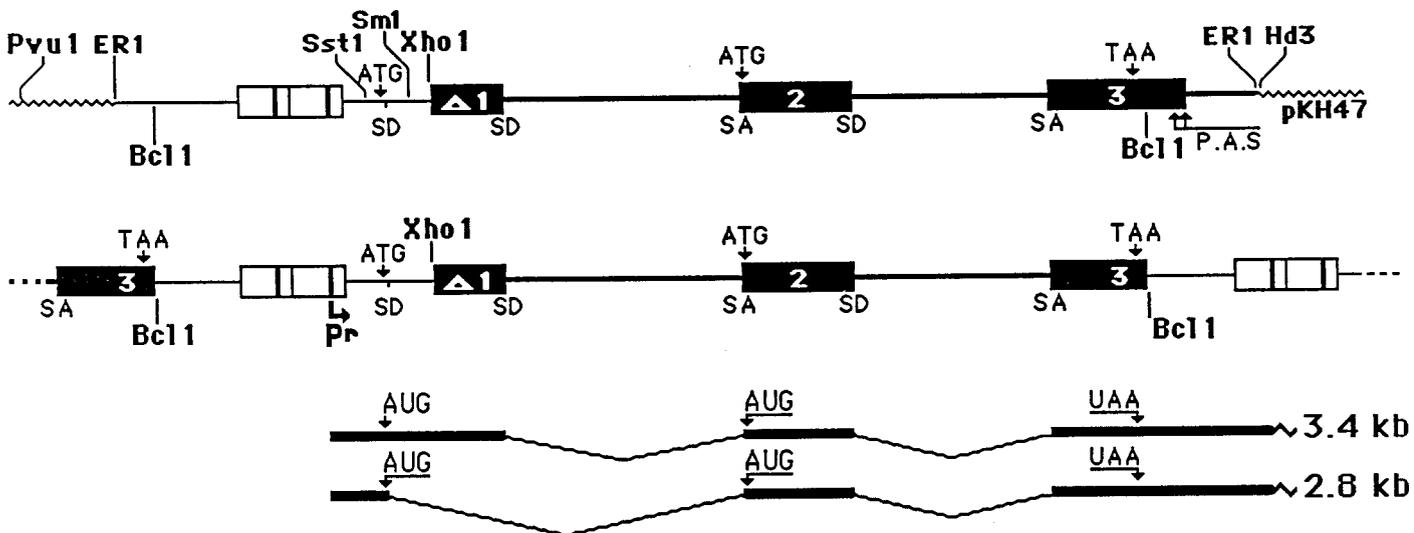
Nous nous sommes nous aussi intéressés au pouvoir transformant de l'oncogène c-myc humain. Des expériences préliminaires avaient permis de montrer que les cellules embryonnaires de caille (QEC) sont transformables par les virus de la myélocytomatose aviaire porteurs du gène v-myc tel que le virus MC29. Nous nous sommes alors demandés si la surexpression d'un gène myc cellulaire normal est capable de transformer les QEC. Différents plasmides recombinants dans lesquels le gène myc humain normal est lié à des promoteurs ou activateurs viraux ont été construits à cet effet. Nous avons montré que ces recombinants sont capables de transformer des cellules embryonnaires de caille aussi efficacement qu'un clone moléculaire du gène v-myc. Pour au moins l'un de ces recombinants la séquence codante du gène c-myc n'a pas subi de mutation, par rapport au gène c-myc humain normal, après son intégration dans l'ADN de la cellule hôte. Ces résultats suggèrent qu'une surexpression des produits normaux du gène myc est suffisante pour induire la transformation des cellules embryonnaires de caille.

### B - Résultats

Les différents recombinants ont été construits en clonant dans un vecteur pKH47 des séquences dérivées d'un clone moléculaire du virus AEV ainsi que le gène c-myc issu d'une banque de gène de foie foetal humain. Ces différentes constructions sont présentées dans les schémas 12 (A et B). Dans trois de ces recombinants X-AHM, SX-AHM et Sm-AHM le gène myc a été placé sous le



### vX-AHM



### vSX-AHM

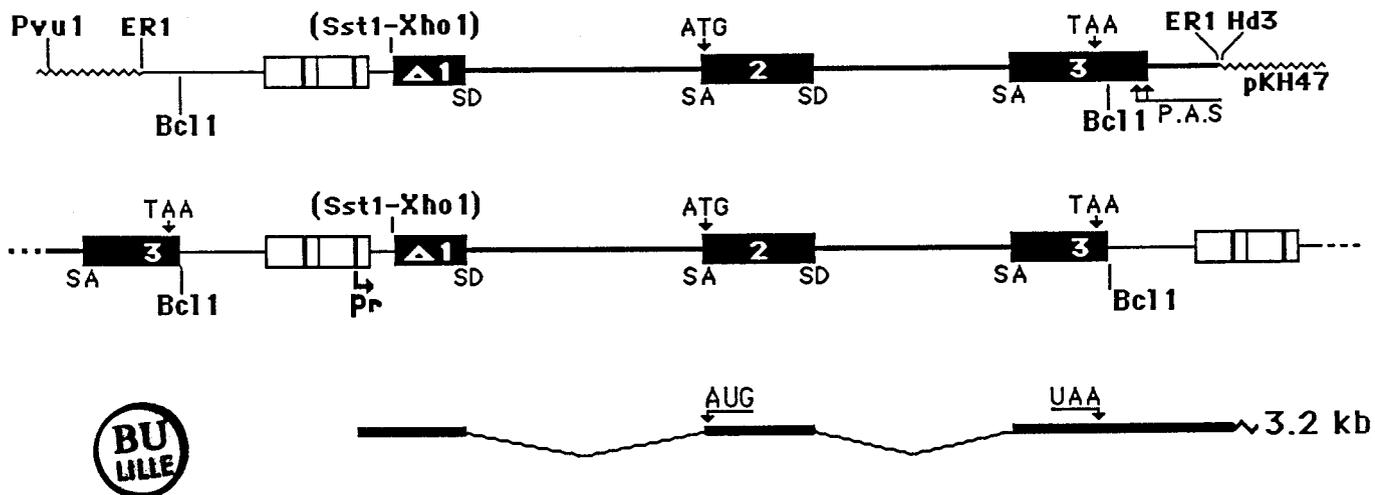


Schéma 12A : Chimères du gène myc humain  
X-AHM, SX-AHM.

contrôle du promoteur viral (LTR). Dans le recombinant X-AHM, l'ATG et le site donneur d'épissage du gène gag sont présents en 5' du gène myc humain tandis que dans le recombinant SX-AHM ces éléments du gène gag sont absents. Dans le troisième recombinant Sm-AHM le LTR du virus AEV a été inséré dans le premier intron du gène myc humain. Le premier exon du gène myc est ainsi délété dans ce recombinant. Un quatrième recombinant a été construit dans le but de faire exprimer le gène myc à partir de ces propres promoteurs. Dans cette construction, le LTR du virus AEV qui possède des séquences activatrices a été placé en orientation inverse (3'-5') par rapport au sens viral (5'-3') en amont du gène myc humain (schéma 12-B). Ainsi, le LTR ne peut plus promouvoir le gène c-myc humain à partir du promoteur viral. Par contre, les séquences activatrices du LTR pourraient stimuler les promoteurs normaux du gène myc.

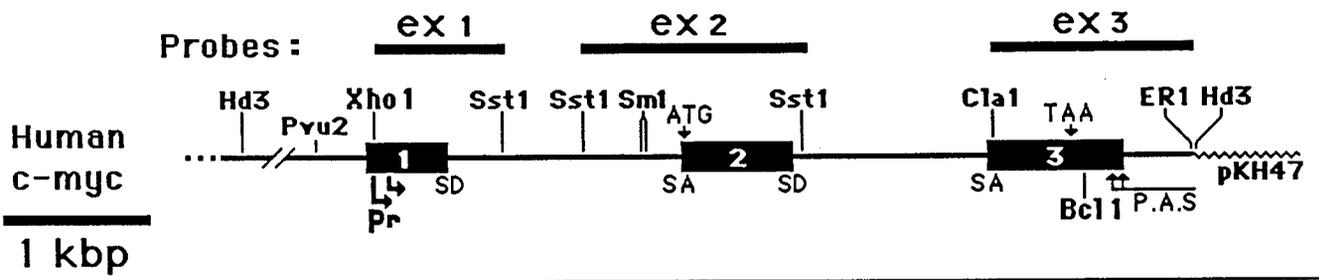
Ces différentes constructions ont été transfectées sur des cellules embryonnaires de caille par la méthode de copréciptation au phosphate de calcium (Graham et Van der Eb, 1973). Les quatre recombinants transforment les QEC à des taux similaires à ceux obtenus avec des clones moléculaires du gène v-myc (0,2 à 0,5 foyers cellulaires de transformation par  $\mu\text{g}$  de DNA) alors que le gène myc humain non activé ne transforme pas ces cellules.

Dans le but de montrer que la transformation des QEF n'est pas un événement clonal du à un contexte cellulaire particulier les trois premiers recombinants X-AHM, SX-AHM et Sm-AHM ont été modifiés pour rendre possible la propagation de l'ARN c-myc sous forme rétrovirale. Cette propagation nécessitant l'élimination des sites de polyadénylation du gène c-myc, les plasmides pX-AHM, pSX-AHM et pSm-AHM ont été digérés par l'enzyme de restriction BclI et les fragments contenant le gène myc ont été purifiés. Ces fragments purifiés sont transfectés sur les QEC. Lorsque l'ADN de ces fragments s'intègre dans l'ADN cellulaire, il peut être transcrit en un ARN rétroviral défectif pour la propagation. Cependant lorsque ces QEC sont cotransfectées avec l'ADN d'un virus compétent pour la réplication ou virus helper (RAV-1), l'ARN rétroviral défectif porteur du gène myc peut se propager. Ainsi, à l'aide du virus helper les virus vX-AHM, vSX-AHM et vSm-AHM issus des constructions pX-AHM, pSX-AHM et pSm-AHM sont capables de transformer toutes les cellules de la culture montrant que le pouvoir transformant du gène c-myc ne nécessite pas un événement particulier survenu dans quelques cellules. L'ensemble de ces résultats montre que le gène c-myc humain surexprimé est capable de transformer les cellules embryonnaires de caille.

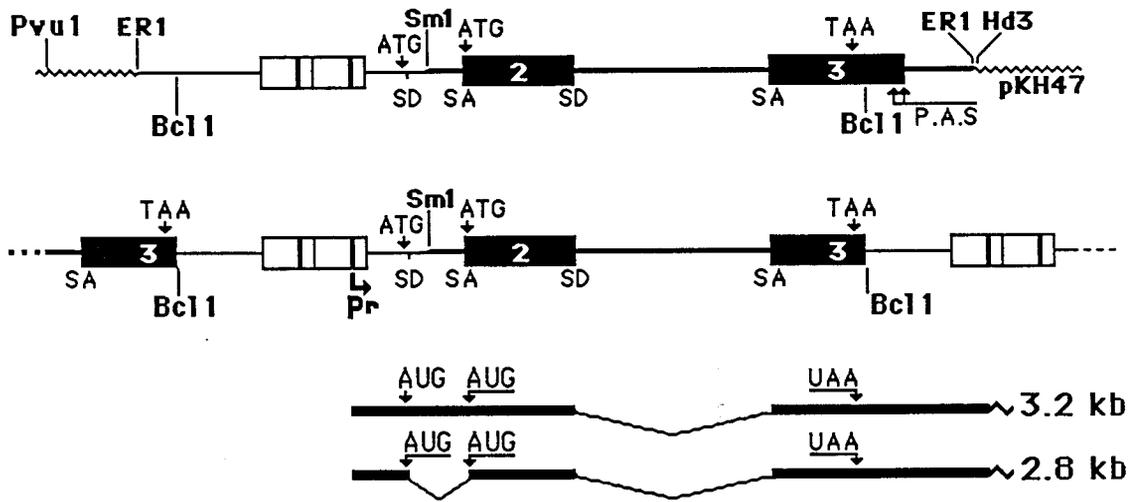
#### 1 - Analyse des ARN synthétisés par les différents recombinants

Les structures des ARN attendus dans les cellules transformées soit par les virus vX-AHM, vSX-AHM et vSm-AHM propagés à l'aide du virus helper RAV-1 soit par le plasmide pEP-AHM sont représentées sur les schémas 12 (A et B). A deux exceptions près ces ARN correspondent à ceux effectivement synthétisés dans les QEC transformées (article n°1, figure 3).

La première exception concerne l'ARN synthétisé par le virus vSX-AHM. En effet dans les cellules transformées par ce virus la taille de l'ARN est de 2.8 kb alors que sa taille attendue est de 3.2 kb (schéma 12A). La séquence nucléotidique de l'ARN proviral du clone SX-AHM montre



### vSm-AHM



### pEP-AHM

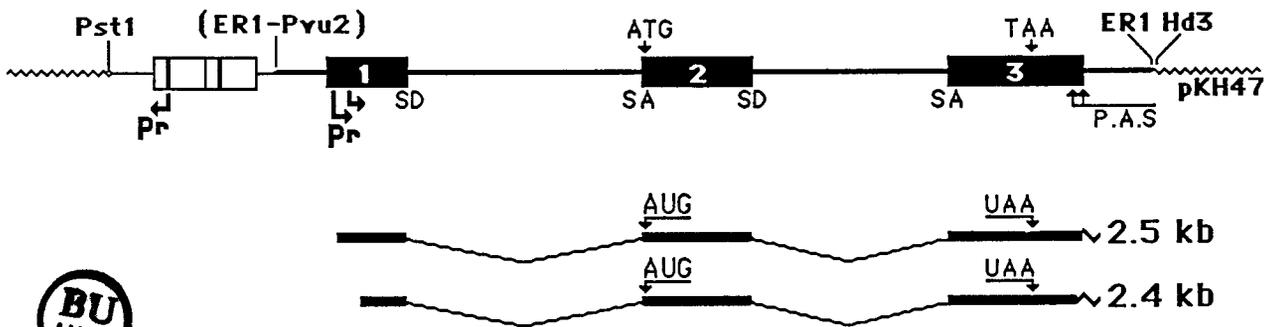


Schéma 12B : Chimères du gène myc humain  
Sm-AHM, EP-AHM.

qu'une délétion de 300 nucléotides s'est produite dans des séquences du virus AEV en 3' de l'exon 3 du gène c-myc humain.

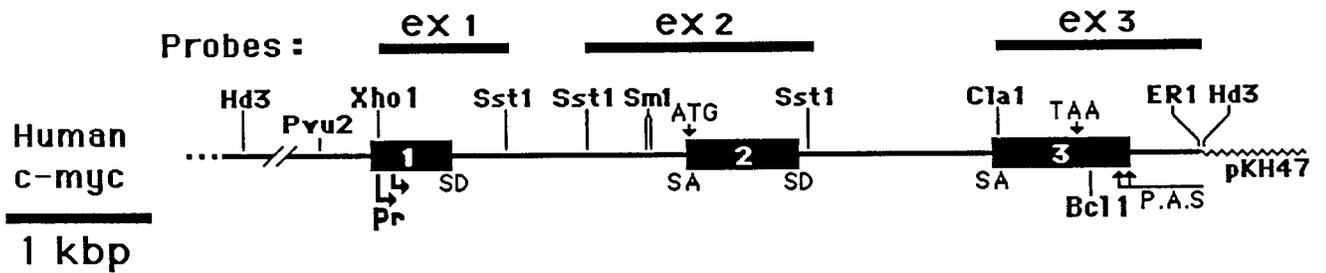
La deuxième exception est constituée par le fait que les cellules transformées par le virus vSm-AHM ne synthétisent que l'ARN sous-génomique de 2.8 kb. L'absence de l'ARN de 3.2 kb semble indiquer que soit cet ARN n'est pas capable de se propager soit cet ARN ne permet pas la synthèse des protéines myc et est de ce fait progressivement éliminé de la culture.

## 2 - Analyse des protéines myc humaines dans les QEC transformées

Les cellules transfectées et transformées par le recombinant pEP-AHM synthétisent le doublet d'ARN à 2.4-2.5 kb qui correspond à celui transcrit dans les cellules normales. En effet, des expériences de cartographie à la nucléase S1 ont montré que dans les cellules transfectées ces deux ARN étaient transcrits à partir des promoteurs normaux du gène myc humain (résultats non présentés). Nous nous sommes alors demandés si à ces transcrits normaux correspondaient des protéines normales. En premier lieu, nous avons préparé deux sera anti-myc, l'un dirigé contre des séquences d'acides aminés codées par l'exon 2 (anti-myc-ex2), l'autre dirigé contre les séquences d'acides aminés COOH terminales codées par l'exon 3 (anti-myc-ex3). Ces sera ont été obtenus après avoir injecté à des lapins des protéines contenant des séquences d'acides aminés codées par les exons 2 et 3. Ces protéines ont été synthétisées dans *E.Coli* à l'aide de vecteurs d'expression bactériens. Les deux types de sera obtenus immunoprécipitent de manière spécifique les protéines myc humaines (les détails de la préparation et de la caractérisation de ces sera sont présentés dans la troisième partie des résultats et dans l'article n°2).

Les cellules transformées par le plasmide pEP-AHM ont été marquées pendant 45 minutes à la méthionine <sup>35</sup>S puis lysées. Des expériences d'immunoprécipitation ont été conduites sur ces lysats avec l'anti myc ex3 (article n°1, figure 4). Les cellules transfectées par le recombinant pEP-AHM synthétisent un doublet de protéines de 64 et 67 kd similaire à celui synthétisé dans les cellules humaines contrôles SCLC N417, doublet déjà décrit dans des travaux antérieurs (Hann et Eisenman, 1984). Les cellules transformées par le virus vSX-AHM synthétisent le même doublet de protéines myc. Par contre, dans les cellules transformées par les virus vX-AHM et vSm-AHM une protéine de 66 kd est observée (article n°1, figure 4). Cette différence en taille peut être expliquée par le fait que ces cellules synthétisent un ARN qui pourrait permettre l'initiation de la traduction sur l'AUG du gène gag plutôt que sur l'AUG du gène myc.

Enfin, l'ADN de l'un des provirus (vSX-AHM) a été cloné à partir de l'ADN cellulaire des QEC transformées par le virus considéré et le gène c-myc humain ainsi isolé a été séquencé. Les données de séquence montrent qu'il n'existe aucune mutation dans les séquences codantes du gène c-myc du provirus SX-AHM cloné par rapport au gène c-myc humain normal. Ces résultats confirment qu'une surexpression des produits normaux du gène c-myc humain permet la transformation des cellules embryonnaires de caille.



### pP-AHM

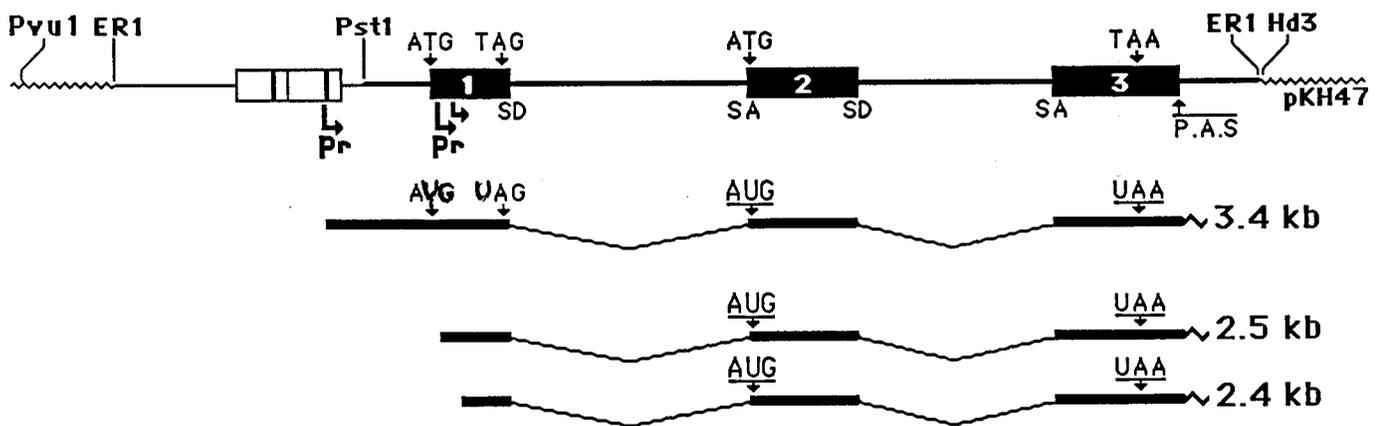


Schéma 13 : Chimère du gène myc humain, P-AHM.

### 3 - Analyse comparative de l'expression d'un recombinant du gène c-myc humain dans les QEC et les 208F

Au cours de cette étude, nous nous sommes également demandés si un recombinant du gène myc humain capable de transformer les QEC était capable de transformer des fibroblastes embryonnaires de rat établis en lignée (208F). Cette interrogation découlait du fait que le virus MC29 qui contient le gène v-myc et qui transforme les QEC peut aussi transformer les 208F (Quade *et al.*, 1983). Nous avons transfecté les 208F avec un recombinant du gène c-myc humain, P-AHM, capable de transformer par transfection les QEC. Ce recombinant dans lequel le LTR du virus AEV est placé en 5' de l'exon 1 du gène c-myc humain (schéma 13) ne transforme pas les 208F. Nous avons alors recherché si le gène c-myc humain transfecté s'exprimait différemment dans les deux types de cellules. Pour analyser l'expression du recombinant P-AHM dans les 208F, il était nécessaire de sélectionner les cellules l'ayant intégré. Dans ce but, nous avons cotransfecté l'ADN du plasmide recombinant pP-AHM en excès d'un facteur 10 avec l'ADN d'un clone moléculaire de l'oncogène ras EJ capable de transformer les cellules 208F. Puis, nous avons sélectionné les clones de cellules transformées contenant, sous forme intégrée, le recombinant P-AHM. Nous avons montré que ce recombinant s'exprime différemment dans les QEC et dans les 208F. Dans les QEC, deux types d'ARN sont synthétisés et correspondent aux ARN attendus (schéma 13) : un ARN de 3.4 kb initié dans le LTR et deux ARN de 2.4-2.5 kb initiés sur les promoteurs normaux du gène myc humain (article N°2, figure 3A). Par contre dans les 208F, seul l'ARN de 3.4 kb initié dans le LTR a été mis en évidence. Ce résultat suggère que dans les 208F, la séquence activatrice du LTR ne permet plus de stimuler les promoteurs normaux du gène myc. En outre, les protéines myc humaines p64/p67 sont présentes dans les QEC transfectées tandis qu'elles ne sont pas détectables dans les 208F transfectées (article N°2, figure 3B). Ce résultat semble indiquer que l'ARN de 3.4 kb initié dans le LTR n'est pas traduit en protéines myc humaines dans les 208F.

### C - Discussion

Nous avons montré que la surexpression des protéines myc humaines normales est responsable de la transformation *in vitro* des cellules embryonnaires de caille. Les différents recombinants du gène myc humain transfectés dans les QEC permettent la synthèse de deux types de protéines. Les cellules transformées par le virus vSX-AHM ou le plasmide recombinant pEP-AHM expriment le doublet de protéines normales p64/67 tandis que les QEC transformées par les virus vX-AHM et vSm-AHM synthétisent une seule protéine myc de 66 kd. Cette protéine p66 est probablement traduite à partir de l'AUG du gène gag qui est le premier AUG en phase avec les séquences codantes des ARN sous-génomiques exprimés par ces virus. Onze acides aminés (six acides aminés codés par le gène gag et cinq acides aminés codés par des séquences myc situées en amont de l'AUG normal du gène myc) pourraient être ainsi ajoutés à l'extrémité NH<sub>2</sub> terminale de la protéine myc. Cet ajout expliquerait la différence en poids moléculaire existante entre les deux espèces

de protéines p64 et p66. Cependant, il semble que la protéine p66 et le doublet protéique p64/p67 possèdent les mêmes pouvoirs transformants. Ainsi, les 11 acides aminés ajoutés à l'extrémité NH<sub>2</sub> terminale de la protéine p66 semblent ne pas perturber les propriétés oncogéniques de cette protéine dans le contexte cellulaire des QEC.

L'étude de l'expression du recombinant du gène myc humain P-AHM intégré dans le génome des cellules 208F semble indiquer que l'ARN de 3.4 kb initié dans le LTR ne permet pas la synthèse des protéines myc. Or cet ARN possède une structure très proche de celle de l'ARN de 3.2 kb qui est codé par le virus vSX-AHM et qui est traduit en protéines myc p64/p67. Cependant ces ARN diffèrent dans leurs parties 5'. En effet, l'exon 1 du gène myc humain est complet dans l'ARN de 3.4 kb tandis que cet exon est tronqué dans l'ARN de 3.2 kb. Or, Gazin *et al.* (1984) ont montré que l'exon 1 du gène myc humain possède un cadre de lecture ouvert de 600 nucléotides. En outre, ce cadre contiendrait un ATG fonctionnel selon les critères de Kozak (1986). Dans l'ARN de 3.4 kb, ce cadre de lecture est entier tandis que dans l'ARN de 3.2 kb, l'ATG a été délété. Aussi, il est possible que la différence de traductibilité en protéine myc p64/p67 de ces deux ARN soit due à la présence dans l'ARN de 3.4 kb du cadre de lecture ouvert de l'exon 1. La machinerie ribosomale serait bloquée sur ce cadre et ne pourrait plus réinitier sur l'ATG initiateur de la synthèse des protéines myc. Si cette proposition est correcte, elle pourrait également signifier que les ARN de 3.2 kb initiés en amont du cadre ouvert de lecture de l'exon 1 dans certaines cellules humaines (Bentley et Groudine, 1986) pourraient ne pas coder pour les protéines myc. Quel serait alors le rôle de ces ARN ? On peut émettre l'hypothèse que ces ARN de 3.2 kb mis en évidence dans les cellules humaines pourraient être traduits en un produit codé par le cadre de lecture ouvert de l'exon 1. Essayer de répondre à cette question fait l'objet de l'étude présentée dans la deuxième partie des résultats.



## II - ETUDE DE L'EXPRESSION DU PRODUIT DE L'EXON 1 DU GENE *c-myc* HUMAIN

### A - Introduction

L'analyse des dérégulations du gènes *c-myc* dans les cellules transformées ainsi que celle plus récente de l'activation de ce locus dans les cellules normales proliférantes ont permis de révéler une grande complexité dans la régulation normale du gène *myc*. Plusieurs niveaux de régulation ont été décrits pour ce gène dans différents systèmes. En effet, le gène *c-myc* serait régulé aux niveaux transcriptionnel, post-transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel. Différents éléments de structure du locus *myc* semblent jouer un rôle dans ces régulations multiples. Ainsi des séquences situées en amont de l'exon 1 des gènes *myc* murins et humains pourraient intervenir dans le choix des promoteurs (Wiman *et al.*, 1984 ; Yang *et al.*, 1985). Il a été aussi suggéré que la formation au sein de l'ARN *c-myc* d'une structure très stable en épingle à cheveux pourrait moduler sa traductabilité (Saito *et al.*, 1983 ; Darveau *et al.*, 1985). Cependant les différents éléments de régulation trouvés de manière sporadique dans diverses cellules ne permettent pas de dégager un schéma général de régulation du gène *myc*. Il est d'ailleurs possible que le contrôle de l'expression de ce gène soit géré par des facteurs cellulaires différents suivant le système auquel l'expérimentateur s'adresse. Mais il est aussi probable que nous n'ayons pas encore eu accès à toutes les clefs permettant une compréhension globale de la régulation de ce gène.

Les connaissances actuelles sur le contrôle de l'expression du gène *c-myc* proviennent pour l'essentiel de l'étude des gènes *c-myc* murins et humains. Les structures, les modes d'activations et de régulations de ces deux loci sont très similaires. Au niveau structural, ces deux gènes sont constitués de trois exons et de deux introns, seuls les deux derniers exons codent pour la protéine transformante tandis que le premier exon est considéré comme une grande séquence "leader". Toutefois, le locus *c-myc* humain normal présente la caractéristique de posséder dans l'exon 1 une phase ouverte de lecture de 600 nucléotides avec en amont de l'ATG toutes les séquences requises pour l'expression d'une protéine d'environ 20 kd (schéma 14) (Gazin *et al.*, 1984). En outre, l'ATG répond aux critères d'un ATG fonctionnel (Kozak, 1986). Or la probabilité qu'une phase ouverte de lecture de 600 bp se maintienne sans pression de sélection est faible. Deux questions immédiates se posent alors : cet exon est-il codant et si oui, son produit est-il impliqué dans un processus de régulation spécifique au locus *myc* humain. Dans le but de répondre à ces questions, nous nous sommes intéressés à la capacité codante de l'exon 1.

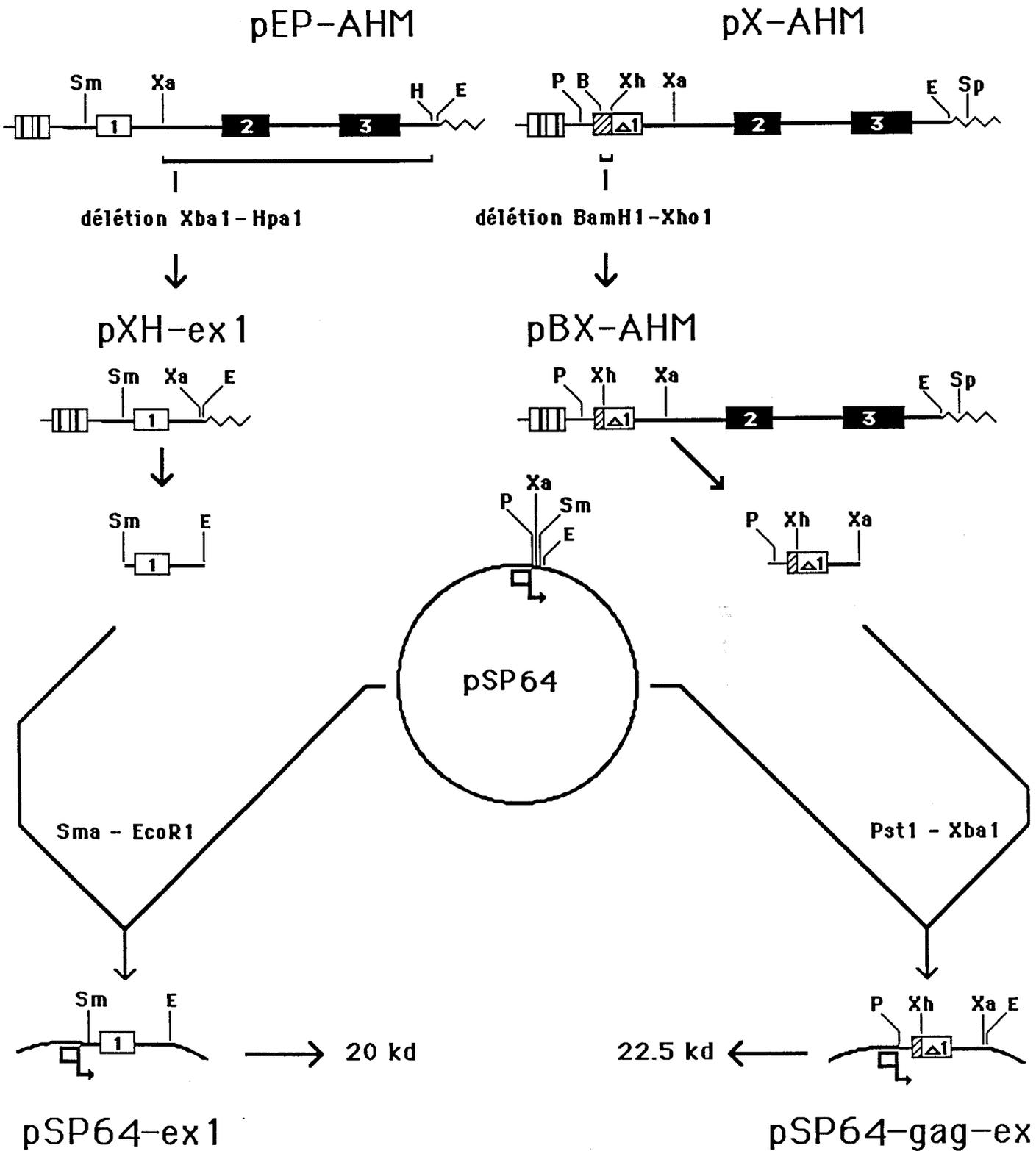


Schéma 15 : Synthèse in vitro des protéines codées par l'exon 1 et la séquence gag-ex1.



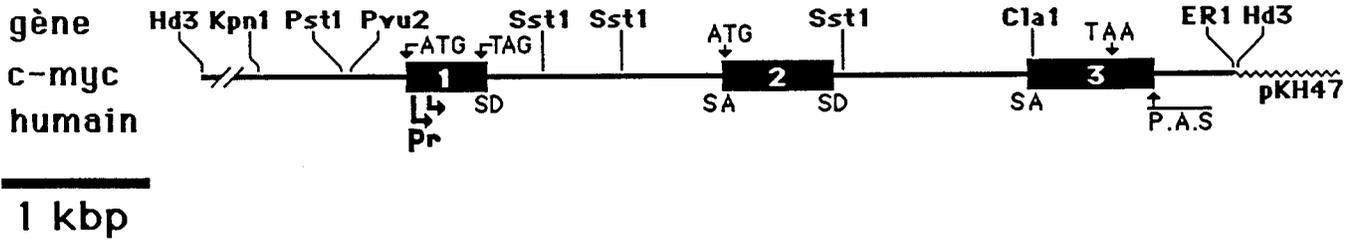
## B - Résultats

1 - Le cadre de lecture ouvert de l'exon 1 code *in vitro* pour une protéine de 20 kd

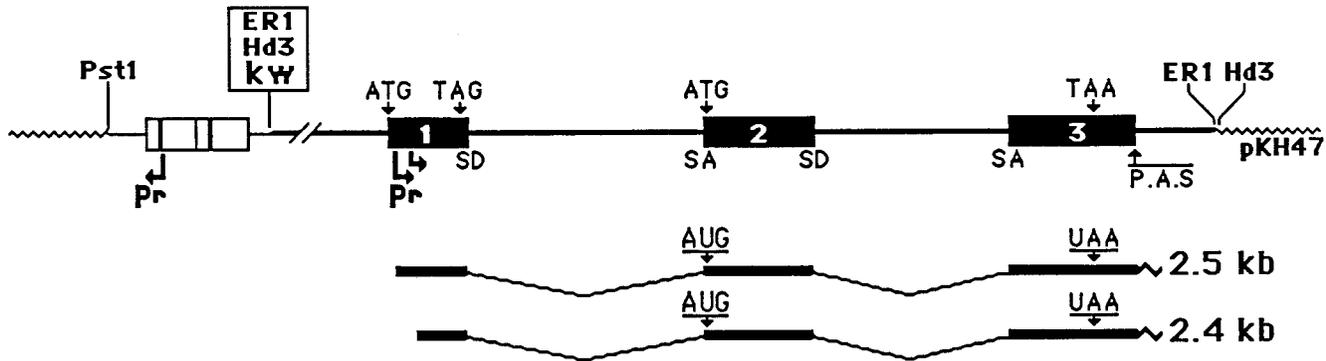
Pour tester l'existence du produit de l'exon 1 dans les cellules humaines, il était nécessaire de disposer d'antisera dirigés contre ce dernier. Cependant avant d'entreprendre la préparation de tels sera nous avons vérifié que le cadre de lecture de l'exon 1 était effectivement ouvert et pouvait être traduit en protéines. Pour ce faire, nous avons testé l'expression de l'exon 1 dans un système acellulaire. Comme contrôle et pour "forcer" l'expression de ce cadre de lecture, nous avons remplacé son ATG par celui bien caractérisé du gène gag du virus AEV en plaçant les 50 premiers codons du gène gag en phase avec le cadre de lecture présumé ouvert de l'exon 1 (schéma 15). Cette séquence sera nommée par la suite séquence gag-ex1. Il nous fallait dans un premier temps obtenir des ARN capables de synthétiser le produit de l'exon 1. Aussi nous avons cloné l'ADN de l'exon 1 et de la séquence gag-ex1 dans un vecteur d'expression sous le contrôle d'un promoteur fort spécifique d'une ARN polymérase ADN dépendante particulière, *i.e.* l'ARN polymérase du phage SP6. Des synthèses d'ARN très pur pouvant permettre la synthèse des produits putatifs codés par l'exon 1 et la séquence gag-ex1 sont obtenues à l'aide de l'ARN polymérase du phage SP6 lors d'expériences de transcription *in vitro*. Ces ARN ont ensuite été testés pour leur traductibilité dans un système de traduction *in vitro*, le lysat de réticulocyte. Les poids moléculaires attendus des produits codés par l'exon 1 et par la séquence gag-ex1 sont environ de 20 kd et 22 kd respectivement. L'analyse, par électrophorèse sur gel d'acrylamide SDS/PAGE, des produits de traduction montre que des protéines de 20 kd et 22.5 kd sont synthétisées. Ces protéines correspondent respectivement aux produits des cadres ouverts de lecture de l'exon 1 et de la séquence gag-ex1 (article 3, figure 1). Ces résultats montrent que l'exon 1 possède un cadre de lecture ouvert effectif et que cet exon code *in vitro* pour une protéine de 20 kd.

2 - Le produit de l'exon 1 n'a pas été mis en évidence dans les cellules humaines

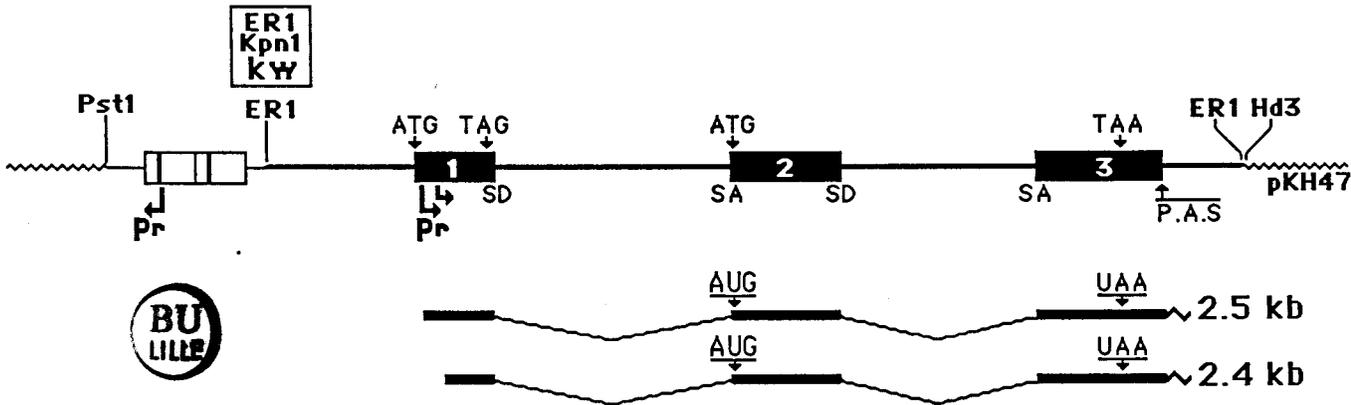
Après avoir vérifié la capacité codante de l'exon 1 *in vitro*, nous avons préparé des sera dirigés contre le produit de l'exon 1 en injectant à des lapins la portion COOH terminale de la protéine p20 exprimée dans *E.coli* à l'aide d'un vecteur d'expression bactérien. Nous avons vérifié que ces sera possèdent des déterminants dirigés contre le produit de l'exon 1. Ces sera qui sont capables d'immunoprécipiter une protéine contenant des séquences d'acides aminés codées par l'exon 1 seront par la suite nommés sera anti p20 (le détail de la préparation et de la caractérisation de ces sera est rapporté dans la troisième partie des résultats). A l'aide de ces séra, nous avons testé l'existence de la protéine p20 dans différentes cellules humaines. Dans les cellules promyélocytiques HL60, les cellules érythroïdes K562 dans lesquelles un ARN de 3.2 kb initié en amont du cadre de lecture ouvert de l'exon 1 a été identifié (Bentley et Groudine, 1986). Cet ARN pourrait permettre l'expression de la protéine p20. Nous avons testé aussi la présence du produit de l'exon 1 dans les cellules du lymphome de Burkitt JBL2. Dans ces dernières, une duplication en tandem de l'exon 1



pEH-AHM



pEK-AHM



ER1  
Kpn1  
KW

: kw indique que les sites enzymatiques placés dans le rectangle ont été traités par la polymérase Klenow.

Schéma 16A : Structure de chimères du gène myc humain. EH-AHM et EK-AHM, transfectées sur QEF.

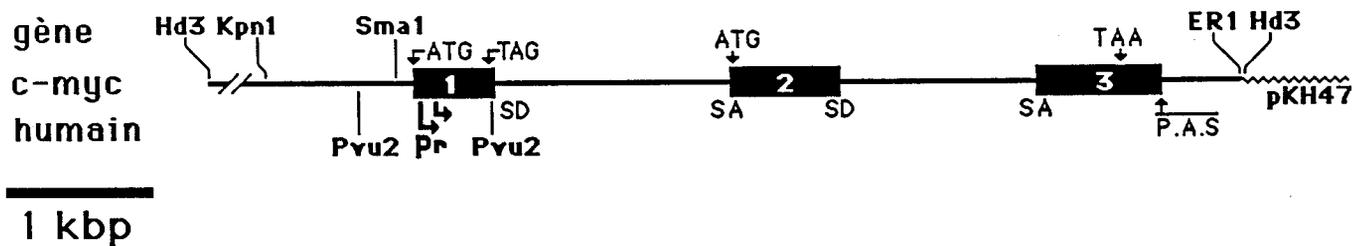
s'est opérée dans l'un des loci myc. Cette duplication permet la synthèse d'un ARN de 6.6 kb qui s'initie dans le premier exon 1. Bien que ces exons aient subi des mutations, les données de séquences montrent que les mutations ne bloquent pas la capacité codante du deuxième exon 1 (Taub *et al.*, 1984b). Ces différentes cellules humaines ont été marquées pendant 30 minutes à la cystéine  $^{35}\text{S}$  puis lysées et immunoprécipitées par les sera anti p20. Aucun produit de l'exon 1 n'a pu être mis en évidence dans ces cellules. Avant de poursuivre les recherches sur l'existence de la protéine p20 dans les cellules humaines nous avons voulu nous assurer que cette protéine pouvait être faite lorsqu'elle est placée dans son environnement génique normal en 3' et dans un contexte cellulaire. Nous avons donc construit des recombinants du gène myc humain aptes à synthétiser des grandes quantités d'ARN susceptibles de coder pour la protéine p20. Le système cellulaire utilisé fut celui des cellules embryonnaires de caille. Nous nous sommes servis de la transformation cellulaire pour sélectionner les cellules contenant nos recombinants.

### 3 - Synthèse de la protéine p20 dans des QEC transfectées par différents recombinants du gène myc humain.

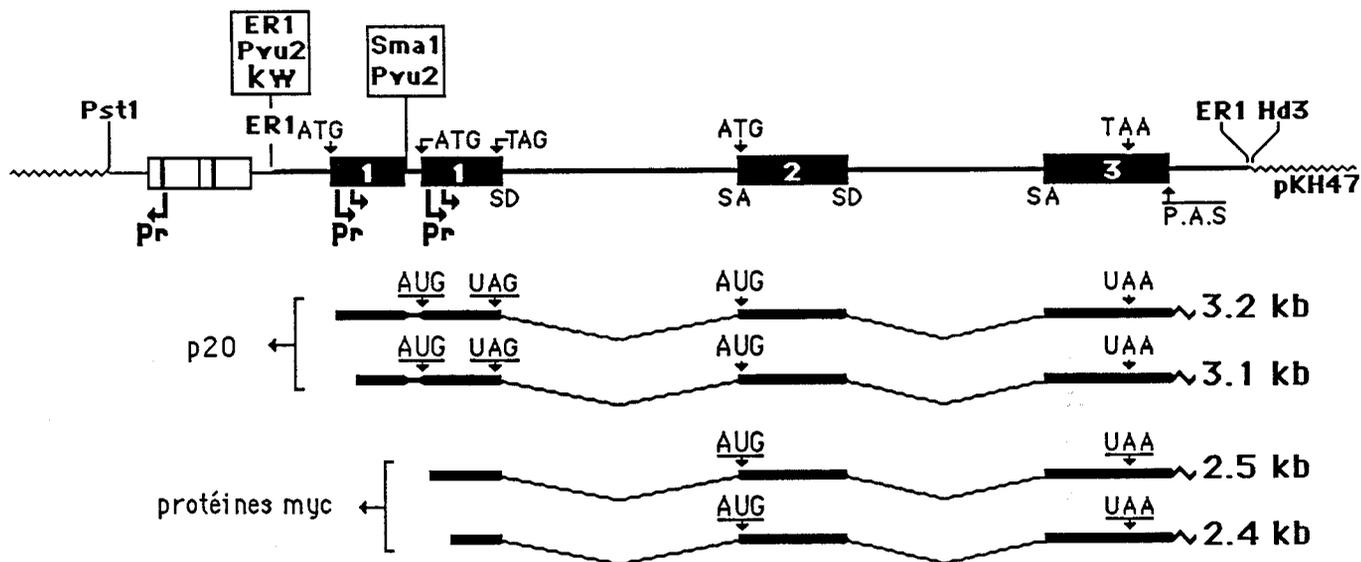
Nous avons, en premier lieu, testé si des promoteurs potentiels situés en amont de l'exon 1 tel que le promoteur P0 proposé par Gazin *et al.* (1984) initiaient la synthèse d'ARN capable de coder pour la protéine p20. Nous avons essayé de démasquer de tels promoteurs par les séquences activatrices du LTR du virus AEV. Nous avons construit deux recombinants, EH-AHM et EK-AHM, du gène myc humain dans lesquels le LTR a été placé respectivement à 2.3 et 1.2 kbp de l'extrémité 5' de l'exon 1 dans une orientation inverse (3'5') (schéma 16A). Dans cette orientation les séquences du LTR ne peuvent plus promouvoir le gène myc mais peuvent stimuler ses promoteurs normaux (Martin *et al.*, 1986). Ainsi, des QEC transfectées et transformées par les recombinants EH-AHM (résultats non présentés) ou EK-AHM (article N°3, figure 4) expriment les ARN myc normaux. Cependant, aucun promoteur situé en 5' de l'ATG du cadre ouvert de l'exon 1 n'est stimulé par ces séquences activatrices.

Aussi, pour "forcer" l'expression d'un ARN susceptible de coder pour la protéine p20, nous avons construit deux autres recombinants nommés EP-PS-AHM et BX-AHM.

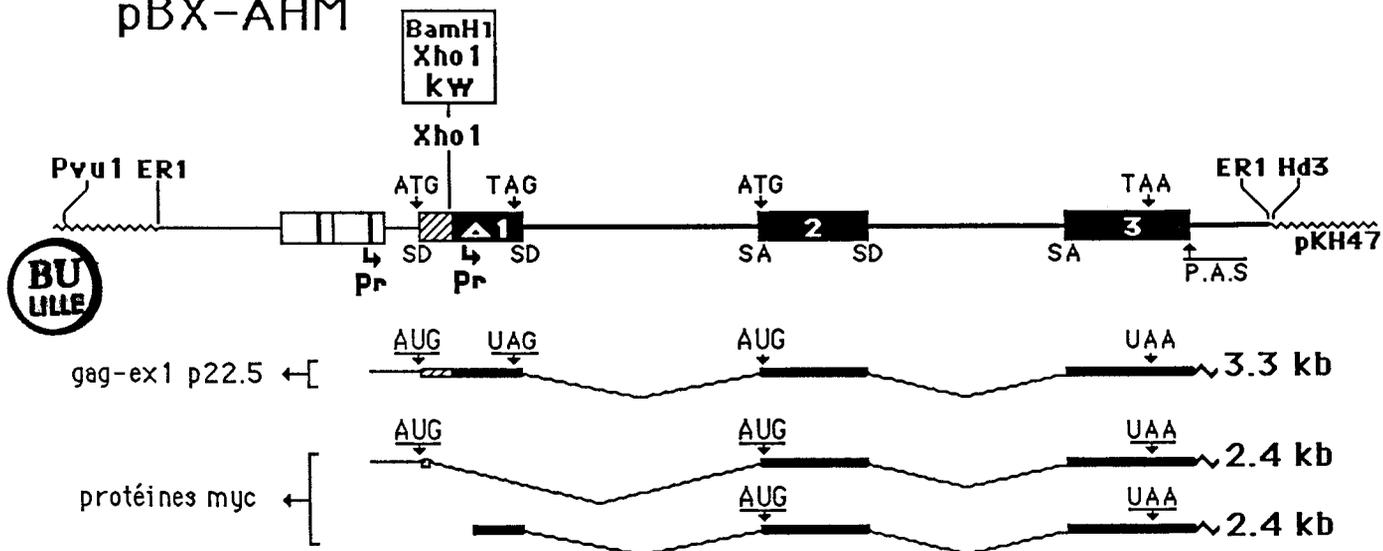
Dans le recombinant EP-PS-AHM nous avons dupliqué l'exon 1 en tandem (schéma 16B). Les séquences activatrices du LTR du virus AEV placées en amont des deux exons 1 (comme dans le recombinant EP-AHM décrit dans la première partie) devraient permettre de stimuler les promoteurs normaux P1 et P2 des deux exons. Les ARN initiés sur le premier exon 1 pourraient coder pour la protéine p20 tandis que ceux initiés sur le deuxième exon 1 devraient synthétiser les protéines myc. Les cellules transfectées et transformées par le recombinant pEP-PS-AHM expriment ces deux types d'ARN à des taux similaires (article N°3, figure 4). Or, un marquage de 30 minutes des cellules transformées par le vecteur pEP-PS-AHM permet de détecter la protéine myc mais pas la protéine p20. Ce résultat pourrait indiquer que la protéine p20 a une durée de vie très courte. De fait, un marquage en "pulse" de 5 minutes des cellules transfectées permet de déceler la protéine p20



### pEP-PS-AHM



### pBX-AHM



**Schéma 16B:** Structure de chimères du gène myc humain, EP-PS-AHM et BX-AHM, transfectées sur QEF.

(article N°3, figure 4). Cependant son taux très faible et la présence dans ces cellules d'un peptide de 12 kd spécifiquement immunoprécipité par les sera anti p20 laisse à penser que la protéine p20 est très labile dans le contexte cellulaire des QEC.

Nous avons également analysé dans les QEC, la traductabilité du cadre de lecture ouvert de la séquence gag-ex1 décrite précédemment. Pour ce faire, nous avons construit le vecteur pBX-AHM dans lequel le fragment gag-ex1 est placé en 5' des exons 2 et 3 du gène myc humain (schéma 16B). Les QEC transfectées par cette construction et transformées par les protéines myc, expriment à l'aide de l'ARN de 3.3 kb initié dans le LTR (ARN génomique) une protéine de 22.5 kd caractérisée comme étant le produit de fusion gag-ex1. L'analyse de l'expression de la protéine P22.5 dans les QEC suggère que l'ARN génomique synthétise très médiocrement cette dernière. En effet, cette protéine de fusion est exprimée à très faible taux comparativement aux protéines myc alors que les taux d'ARN susceptibles de synthétiser les deux types de protéines sont similaires (article N°3, figure 4). De plus, des expériences de chasse après marquage en pulse montrent que la protéine de fusion P22.5 et les protéines myc ont une durée de vie similaire d'environ 20 minutes (article N°3, figure 5). Enfin, la protéine de fusion gag-ex1 est immunoprécipitée de manière équivalente par un sérum anti-gag qui reconnaît parfaitement les 50 premiers acides aminés de la protéine p19-gag et par le sérum anti-p20, indiquant que le faible taux de protéine P22.5 détecté n'est pas dû à la mauvaise reconnaissance de cette protéine par le sérum anti-p20.

Les marquages en "pulse" de 5 minutes des QEC transfectées ayant permis de visualiser la protéine p20, nous avons utilisé ces conditions pour tester à nouveau l'existence d'un produit de l'exon 1 dans les cellules humaines précédemment citées. A nouveau, les résultats furent négatifs. Nous avons également utilisé la technique de "l'immunoblotting" (qui permet de visualiser l'accumulation d'une protéine dans une cellule) pour rechercher le produit de l'exon 1 dans les cellules humaines. Cette technique nous a permis de détecter la protéine gag-ex1 P22.5 dans les QEC transfectées mais ne nous a pas permis de mettre en évidence la protéine p20 dans les QEC transfectées par le recombinant EH-PS-AHM comme dans les cellules humaines analysées (résultats non présentés). Ces résultats semblent indiquer que la protéine p20 n'est pas accumulée dans ces cellules. En outre, au moins pour les QEC transfectées par le recombinant EH-PS-AHM, ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par immunoprécipitation qui indiquent que la protéine p20 est très labile.

L'ensemble de ces résultats suggère que la protéine p20 n'est pas présente (ou est présente en très faible quantité) dans les cellules humaines analysées.

### C - Discussion

L'objectif de ce travail était de tester l'existence dans les cellules humaines du produit de l'exon 1 du gène myc humain. En 1984, Gazin *et al.* montraient que le premier exon du gène myc humain possède un cadre de lecture ouvert de 600 nucléotides. Ce dernier est flanquée en 5' des

séquences canoniques nécessaires à son expression (promoteur, ATG...). Il était donc tentant d'émettre l'hypothèse que cet exon pourrait coder pour une protéine dont le poids moléculaire calculé est de 20.931 D. Dans un premier temps, nous avons montré que des ARN synthétisés *in vitro* et ne contenant que l'exon 1 du gène myc humain sont capables de synthétiser une protéine de 20 kd dans un lysat de réticulocyte. Ce résultat démontrait une capacité codante effective pour le premier exon du gène myc humain.

Dans un deuxième temps, nous avons testé l'existence d'une telle protéine dans les cellules humaines à l'aide de sera dirigés contre un peptide qui contient des séquences d'acides aminés codés par l'exon 1 et qui a été produit par *E.coli*. Ces sera nommés anti-p20 sont capables d'immunoprécipiter une protéine possédant des déterminants de la protéine p20. A l'aide de ces sera anti p20, nous avons testé l'existence du produit de l'exon 1 dans différentes cellules humaines et notamment dans des cellules synthétisant des ARN myc susceptibles de coder pour le produit de l'exon 1. Dans aucune des cellules humaines testées, la protéine p20 n'a été détectée. Ainsi dans les cellules HL60, le produit de l'exon 1 n'est pas détecté bien qu'un ARN de 3.2 kb initié en amont de l'exon 1 soit synthétisé et représente 7% des ARN myc totaux (Bentley et Groudine, 1986). Ce résultat pourrait s'expliquer soit par une grande instabilité de la protéine p20 soit par une mauvaise traductibilité de l'ARN de 3.2 kb. Dans les cellules JBL2, L'ARN de 6.6 kb ne semble pas non plus permettre la synthèse du produit de l'exon 1. Cependant, il est probable que cet ARN qui arbore une très longue séquence leader de 2.3 kb soit très mal traduit.

Devant ces résultats négatifs et avant de nous attaquer à une analyse plus exhaustive de l'existence du produit de l'exon 1 dans les cellules humaines, nous avons dans un troisième temps développé un système biologique qui devait nous permettre d'étudier la capacité codante de l'exon 1 placé dans son environnement normal en 3' et en aval de séquences leader bien caractérisées en 5'. Ce système biologique est celui des QEC, cellules transformables par transfection de l'ADN de recombinants du gène myc humain. Nous avons utilisé cette propriété pour sélectionner des cellules contenant des recombinants du gène myc humain capables de synthétiser, outre les produits transformants, des grandes quantités d'ARN susceptibles de coder pour la protéine p20. Deux types de vecteurs ont été développés : le premier pEP-PS-AHM permet l'expression de la protéine p20 à partir de son propre ATG tandis que dans le deuxième recombinant, pBX-AHM, la séquence codante de l'exon 1 a été placée en phase avec l'ATG fonctionnel du gène gag du virus AEV

- Dans les cellules transfectées et transformées par le recombinant pEP-PS-AHM qui expriment des ARN susceptibles de coder pour les protéines p20 et myc à des taux similaires, la protéine p20 est très faiblement synthétisée par rapport à la protéine myc. Une des explications à cette très médiocre expression serait une forte dégradabilité de la protéine. Cette hypothèse est confortée par le fait qu'un peptide de 12 kd est spécifiquement immunoprécipité par les sera anti p20 dans les cellules transfectées et pourrait ainsi représenter un produit de dégradation de la protéine p20. L'instabilité de la protéine p20 pourrait être due au contexte cellulaire. C'est par exemple le cas pour l'une des protéines oncogènes *v-abl* stable dans les fibroblastes et instable dans les cellules

lymphoïdes (Priwes *et al.*, 1985).

- Dans les cellules transfectées et transformées par le recombinant pBX-AHM, la protéine de fusion gag-ex1 P22.5 est également présente à faible taux comparativement aux protéines myc. Or l'instabilité de la protéine gag-ex1 comme le taux d'ARN codant pour cette dernière ne semblent pas responsables de la faible quantité de protéine P22.5 dans les QEC. En effet, dans ces cellules les durées de vie des protéines myc et gag-ex1 p22.5 ainsi que les taux d'ARN codant pour ces dernières sont similaires. Aussi, il est possible que la faible quantité de protéine gag-ex1 trouvée dans les QEC soit le résultat d'une mauvaise traductibilité de l'ARN. Or, il semble raisonnable de considérer que la séquence leader et l'ATG du gène gag, fonctionnels dans leur environnement normal, soient également fonctionnels dans la protéine de fusion gag-ex1. Par contre, il est tentant d'incriminer certaines structures de l'ARN dans sa médiocre traductibilité. En effet, des séquences complémentaires situées dans l'exon 1 pourraient former des structures en épingle à cheveux stables (Battey *et al.*, 1983) qui interféreraient avec la traduction du cadre ouvert de l'exon 1. En outre, une structure similaire pourrait également s'établir entre des séquences complémentaires des exons 1 et 2 (Saito *et al.*, 1983). Certains auteurs ont suggéré que la formation de cette boucle dans l'ARN du gène myc humain modulerait l'expression des protéines myc (Darveau *et al.*, 1985). Ainsi, ces différentes structures pourraient être impliquées dans la faible traductibilité des ARN codant pour la protéine p22.5.

Qu'en est-il de l'existence du produit de l'exon 1 dans les cellules humaines ?

Les résultats obtenus sur l'expression de la protéine gag-ex1 dans les QEC suggèrent que la non détection du produit de l'exon 1 dans les cellules HL60 pourrait être due à une mauvaise traductibilité des ARN de 3.2 kb. Cependant, il reste à montrer si il y a effectivement blocage de la traduction des ARN de 3.2 kb initiés aux sites P0. Dans l'affirmative, il serait en outre intéressant de savoir où se situe ce blocage.

### III - PREPARATION DES SERA DIRIGES CONTRE LES PRODUITS DU GENE c-myc HUMAIN

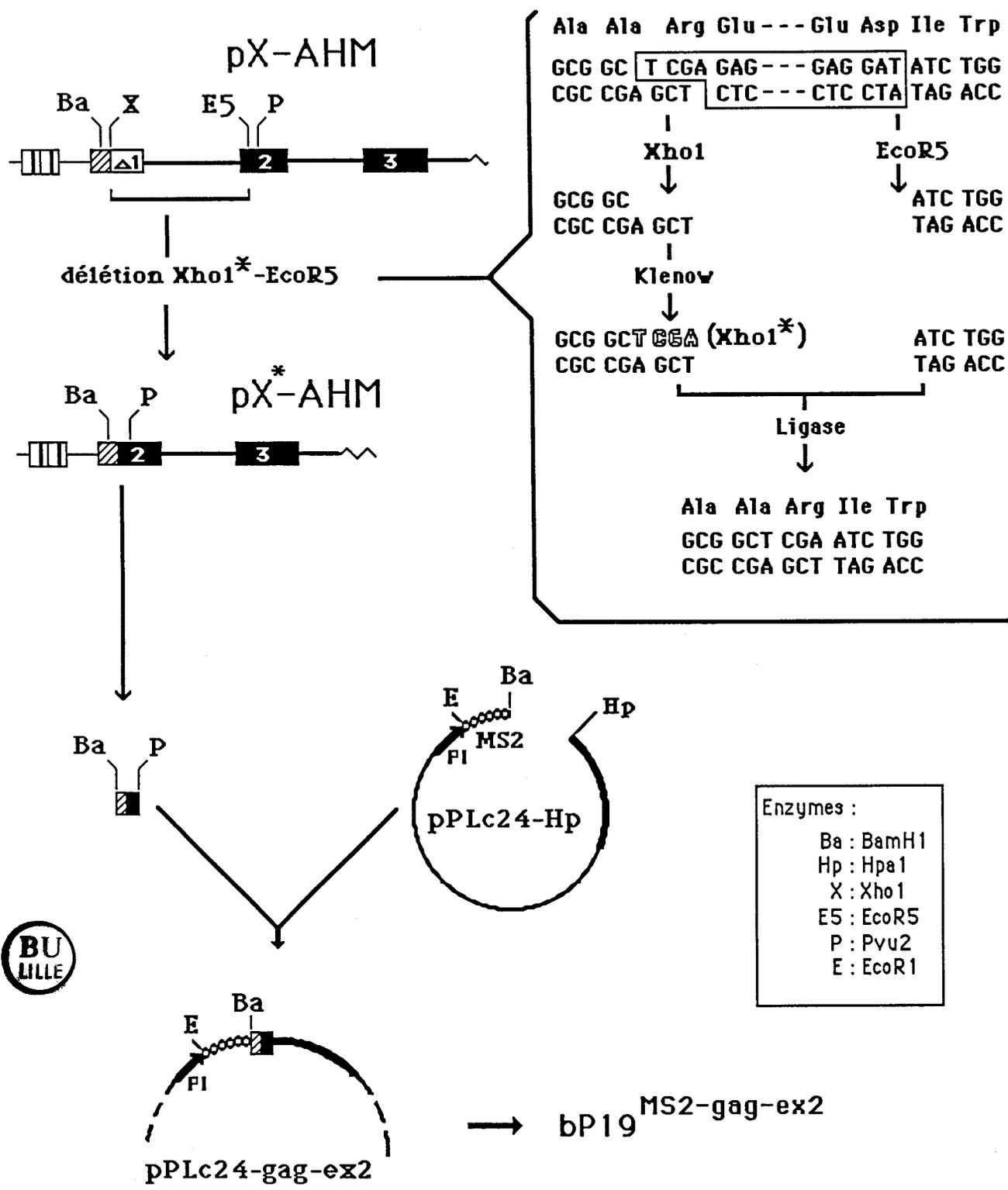
Dans le but de préparer des sera dirigés contre les protéines que le gène myc humain pourrait coder, nous avons utilisé des vecteurs d'expression bactériens qui nous ont permis de synthétiser dans *E.coli* des polypeptides contenant des séquences d'acides aminés (A.A) codés par les différents exons du gène myc. Des sera spécifiques dirigés contre les produits du gène myc ont été obtenus à partir du sang de lapins injectés avec les polypeptides purifiés. Les vecteurs d'expression utilisés ont été construits à partir de vecteurs dérivés du vecteur d'expression PLc24.

#### A - Principe d'utilisation du vecteur d'expression bactérien PLc24.

Le vecteur d'expression bactérien choisi est le PLc24. Il appartient à une famille de plasmides dans lesquels a été inséré le promoteur gauche (PL) de transcription du phage Lambda (Remaut *et al.*, 1981). Dans cette étude nous avons utilisé des plasmides dérivés du vecteur PLc24 tels que les plasmides pPLc24-Hp (schéma 17), pPLc24-Bg (schéma 18) ou pPLc24-S (schéma 19). Ces plasmides ont été obtenus au laboratoire à partir du vecteur PLc24 et présentent l'intérêt, par rapport à ce dernier, de posséder des sites enzymatiques de restriction supplémentaires.

Dans ces différents vecteurs, le fragment d'ADN compris entre les sites de clivage des nucléases de restriction EcoRI et BamHI fournit les éléments essentiels à la traduction correcte de l'ARN messager transcrit à partir du promoteur PL (schéma 17). Ces éléments incluent le site de fixation du ribosome (séquence de Shine et Dalgarno :SD), l'AUG initiateur ainsi que les 98 premiers A.A de la réplicase du bactériophage à ARN MS2 (Devos *et al.*, 1979). Outre la séquence SD et l'AUG initiateur l'intégrité de cette séquence nucléotidique semble essentielle pour l'accessibilité, au niveau de l'ARN, de l'AUG initiateur par les ribosomes. Dans les différents vecteurs utilisés, la séquence nucléotidique codant pour les 98 A.A de la polymérase MS2 est suivie d'un fragment d'ADN portant des sites enzymatiques qui permettent l'insertion de séquences exogènes et leur expression sous le contrôle du promoteur PL (schéma 17-18-19). La séquence exogène est donc traduite sous forme d'un produit de fusion incluant 99 AAs de la polymérase de MS2 à son extrémité aminoterminal.

Ainsi l'association - PL-MS2polymérase-ADNcloné - est une unité transcriptionnelle et traductionnelle efficace dans *E.coli* (Remaut *et al.*, 1981). Le maintien des plasmides pPLc 24 (et des plasmides recombinants dérivés de pPLc24) dans la population bactérienne requiert la répression complète de la transcription à partir de PL. Pour cette raison, ces plasmides sont amplifiés dans une souche d'*E.coli* dans laquelle le répresseur C1 qui régule l'activité de PL est exprimé à partir d'un prophage partiel, non excisable. Dans ce type de souche la transcription est bloquée par l'interaction de la protéine CI et du promoteur PL ce qui permet la réplication du plasmide. Dans le cas présent, le choix de la souche amplificatrice (LE392) a été dicté par un deuxième impératif : la nécessité de modifier le plasmide recombinant pour qu'il ne soit pas détruit par le système de restriction de la



**Schéma 17 :** Construction du vecteur d'expression PLc24-gag-ex2

souche d'*E.coli* utilisée pour l'expression (NF1).

Le plasmide extrait de la souche LE392 est ensuite transfecté dans la souche NF1 qui possède un prophage partiel codant pour un répresseur CI thermosensible (CI<sub>ts</sub>).

Dans les étapes de croissance la souche (NF1) transformée par les recombinants PLc24 est maintenue à 28°C. Dans ces conditions le répresseur CI est fonctionnel et aucune transcription n'a lieu. Le transfert de la culture à 42°C résulte en l'inactivation du répresseur C1 et en une induction d'un taux considérable de transcription/traduction du gène exogène.

La protéine néosynthétisée est identifiée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en comparant les protéines extraites d'une culture à 28°C (où elle n'est pas exprimée) et les protéines extraites d'une culture à 42°C (où elle est exprimée).

#### B - Obtention des vecteurs recombinants.

Les fragments exoniques à exprimer ont été choisis à l'aide de la séquence nucléotidique du gène c-myc humain établie par Gazin *et al.*(1984). Le choix des fragments a été dicté par les exigences de clonage. C'est à dire, par la présence dans le fragment considéré d'enzymes de restriction adéquats. Cependant, nous avons plus particulièrement utilisé les séquences codantes pour les acides aminés COOH terminaux car, pour des raisons encore mal définies, il semble que ces derniers sont d'excellents candidats pour l'obtention d'anticorps hautement spécifiques.

Le détail des différentes constructions est donné dans le chapitre II des Matériels et Méthodes.

##### 1 - Vecteur recombinant PLc24-gag-ex2

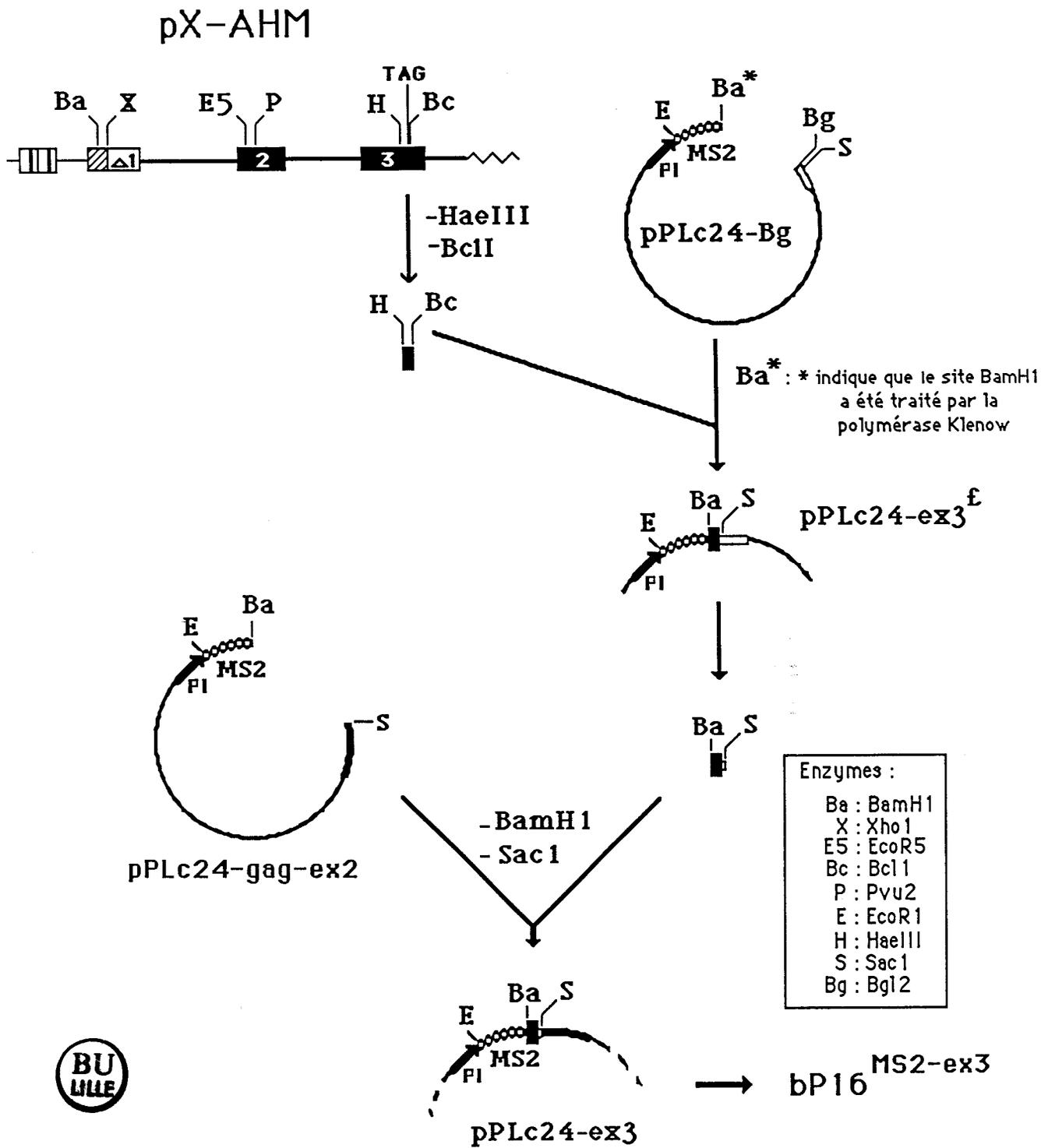
Ce vecteur a été obtenu par insertion aux sites BamHI et HpaI du plasmide pPLc24-Hp d'un fragment BamHI-Pvu2 contenant des séquences codantes du gène gag du virus AEV et de l'exon 2 du gène c-myc humain en phase avec les séquences MS2 (schéma 17).

L'induction à 42°C de bactéries NF1 transformées par ce vecteur recombinant devrait entraîner la synthèse d'une protéine de fusion comportant :

- 99 acides aminés de la polymérase MS2
- 34 acides aminés du gène gag (acides aminés 51 à 85 de la protéine p19 codée par le gène gag).
- 50 acides aminés de l'exon 2 du myc humain (acides aminés 49 à 99 de la protéine myc).
- 24 acides aminés dérivés de séquences du plasmide pPLc24-Hp , soit une protéine d'environ 19000 daltons (19 kd).

##### 2 - Vecteur recombinant PLc24-ex3

Ce vecteur a été préparé par insertion aux sites BamHI et SacI du vecteur précédent PLc24-gag-ex2 d'un fragment contenant les séquences de l'exon 3 codant pour l'extrémité COOH terminale de la protéine myc (schéma 18).



**Schéma 18** : Construction du vecteur d'expression PLc24-ex3

Ce vecteur devrait permettre la synthèse d'une protéine de fusion comportant :

- 99 acides aminés de la polymérase MS2
- 49 acides aminés de l'extrémité 3' de l'exon 3 du gène myc humain soit une protéine

d'environ 16000 daltons (16 kd).

### 3 - Vecteur recombinant PLc24-ex1

Ce vecteur a été obtenu par insertion aux sites BamHI et SacI du vecteur PLc24-S d'un fragment contenant la majeure partie des séquences de l'exon 1 du gène myc humain en phase avec les séquences MS2 (schéma 19).

Ce vecteur devrait permettre la synthèse d'une protéine de fusion comportant :

- 99 acides aminés de la polymérase MS2
- 158 acides aminés de l'exon 1 du gène myc humain (acides aminés 31 à 188 du cadre

ouvert de lecture de l'exon 1) soit une protéine d'environ 25000 daltons (25 kd).

Ces différents vecteurs ont été construits et testés pour leurs contenus en ADN à l'aide des techniques classiques du génie génétique (voir chapitre I du Matériel et Méthodes).

## C - Obtention des antigènes et antisera spécifiques.

### 1 - Transfection dans la souche NF1

Les plasmides recombinants adéquats préparés à partir de la souche de *E.coli* LE 392 ont été introduits dans la souche NF1 de *E.coli*. Cette souche a été rendue compétente par traitement au CaCl<sub>2</sub> et sélectionnée en présence de 100 µg/ml de carbénicilline.

Rappelons que cette souche possède un prophage non excisable codant pour un répresseur CI thermosensible. A 28°C, CI est actif et réprime toute transcription à partir de PL tandis qu'à 42°C CI est inactif et la transcription à partir de PL a lieu à un taux élevé. Les ARNs ainsi synthétisés sont traduits par la machinerie de synthèse protéique bactérienne.

### 2 - Expression des protéines de fusion : étude analytique

Des cultures de *E.coli* NF1 transformées par respectivement les vecteurs PLc24-ex1, PLc24-gag-ex2 et PLc24-ex3 sont amenées en début de phase exponentielle de croissance (*i.e.* 1 à 2.10<sup>8</sup> bactéries/ml) puis induites à 42°C.

Après 2 heures d'incubation une aliquote des cultures est centrifugée et les bactéries sont lysées à 100°C en présence de 1% SDS et 5% β mercaptoéthanol. Les protéines sont alors séparées selon leur poids moléculaire par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS et révélées par coloration du gel au bleu de Coomassie.

L'incubation à 42°C induit l'apparition de protéines spécifiques de PM 25 kd, 19 kd et 16 kd dans les souches NF1 transformées par les plasmides PLc24-ex1, PLc24-gag-ex2 et PLc24-ex3

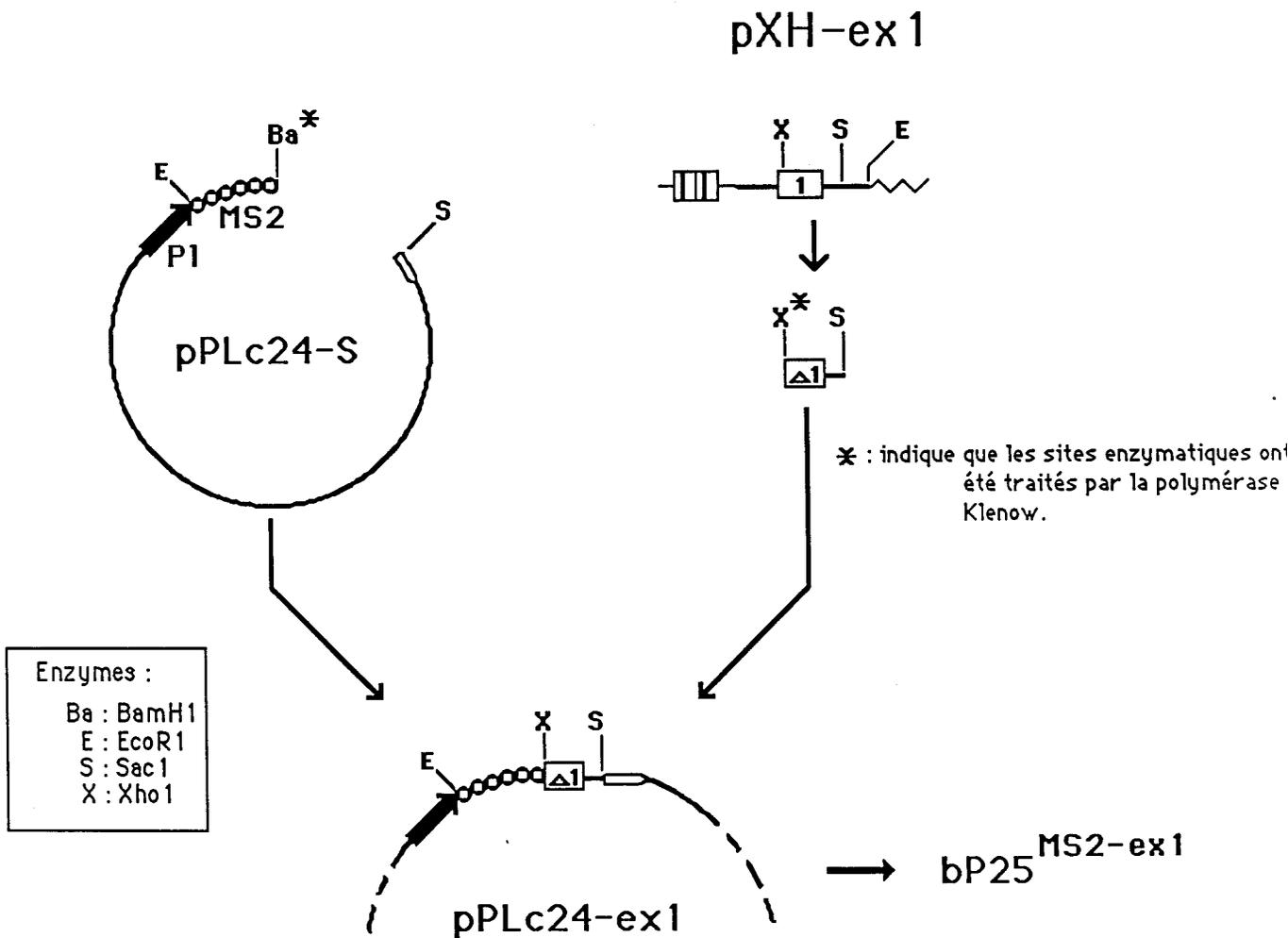


Schéma 19 : Construction du vecteur d'expression PLc24-ex1

respectivement (article N°3, figure 2B ; article N°2, figure 2). Cette induction est spécifique des plasmides recombinants puisqu'elle n'est pas observée dans les bactéries transformées par le plasmide PLc24 induites dans les mêmes conditions (article N°2, figure 2).

Ces protéines ont été produites en quantités importantes par induction de cultures de 500 ml de bactéries NF1 transformées par les plasmides PLc24-ex1, PLc24-gag-ex2 et PLc24-ex3. Les protéines 25 kd, 19 kd et 16 kd ont été purifiées par électrophorèse en gel de polyacrylamide préparatif et récupérées par électroélution.

Des antisera spécifiques ont été obtenus par injection de lapins avec les préparations des protéines 25 kd, 19 kd et 16 kd purifiées.

3 - Caractérisation du produit de l'exon 1 synthétisé dans *E.coli* : La protéine p25 se lie *in vitro* à l'ADN.

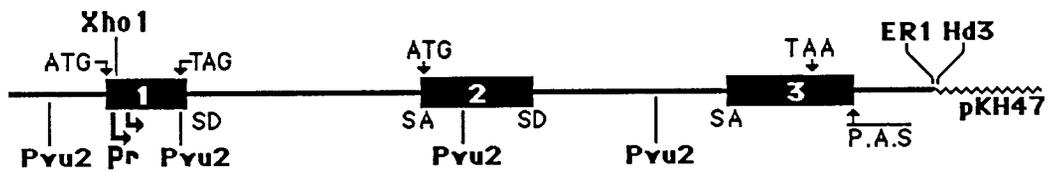
Il a été montré que la protéine myc humaine exprimée chez *E.coli* à partir d'un vecteur d'expression est capable de se lier *in vitro* à l'ADN double brin. Cette interaction protéine myc - ADN est aspécifique et serait en grande partie due à la richesse en acides aminés basiques de cette protéine (Watt *et al*, 1985). La phase ouverte de lecture de l'exon 1 devrait également coder pour une protéine riche en acides aminés basiques (20 % des A.A). Nous avons montré que la protéine bactérienne p25 se lie de manière aspécifique à l'ADN *in vitro* (article 3, figure 2B). Dans cette expérience les protéines séparées par électrophorèse sur gel d'acrylamide sont transférées sur filtre de nitrocellulose. Le filtre est ensuite mis à incuber en présence d'ADN radioactif (ADN du plasmide recombinant pEK-AHM du gène myc humain) puis lavé, séché et autoradiographié. L'ADN est retenu par la protéine p25 alors qu'il ne se lie pas à une autre protéine chimérique de 22 kd exprimée aussi à l'aide d'un plasmide dérivé du vecteur PLc24 et qui de ce fait contient également les 99 acides aminés de la polymérase MS2. Ces résultats indiquent que la fixation de l'ADN sur la protéine p25 est liée à la présence dans cette protéine des acides aminés codés par l'exon 1.

#### D - Tests de spécificités des différents sera obtenus

##### 1 - Immunoprécipitation des protéines myc d'origine virale, aviaire et humaine

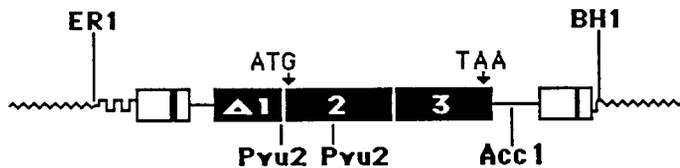
Les sera dirigés contre les protéines myc ont été obtenus à partir des protéines de 19 kd et 16 kd décrites précédemment. Pour tester la spécificité de ces sera, nous avons analysé leur capacité à immunoprécipiter des protéines myc synthétisées dans des cellules humaines établies en lignée dans lesquelles le taux d'ARN myc est élevé. Ces sera nous ont permis de mettre en évidence dans les cellules SCLC-N417 un doublet de protéines myc p64/p67, doublet décrit antérieurement par Hann et Eisenman (1984) dans les mêmes cellules. Par contre, ces sera adsorbés contre leurs antigènes bactériens respectifs *i.e.* p19 ou p16 ne reconnaissent plus les protéines myc (article N°2, figure 3B). Pour ces expériences d'immunoprécipitation, les cellules ont été marquées à la méthionine (<sup>35</sup>S) et les lysats cellulaires ont été obtenus selon les techniques décrites dans Matériel et Méthodes.

gène  
c-myc  
humain

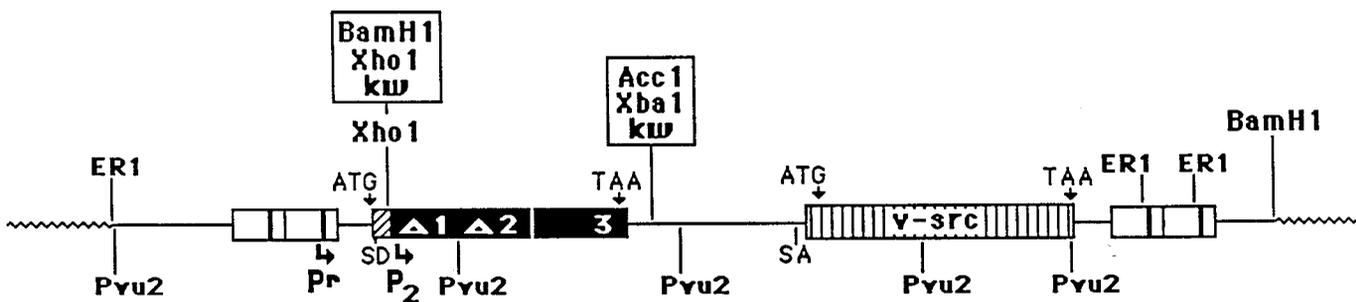


1 kbp

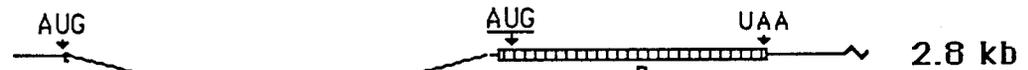
pSX-AHM  
cloné



gag - Ex1 - Δmyc-src



P75<sup>gag-Ex1-myc</sup>



pp60<sup>src</sup>

Schéma 20 : Structure de la chimère gag-Ex1-myc-src transfectée sur FEP.

Ainsi les deux sera anti-myc-ex2 et anti-myc-ex3 reconnaissent les protéines myc humaines. Cependant seul le sérum anti-myc-ex3 reconnaît les protéines aviaires d'origines virale ou cellulaire. En effet, ce sérum reconnaît spécifiquement les protéines myc virales p61/p63 codées par le gène v-myc du virus MH2 de la myélocytomatose aviaire (article 4, figure 3) ainsi que les protéines c-myc des cellules aviaires RP9 dont le taux de mARN myc est élevé (résultat non présenté).

Le fait que le sérum anti-myc-ex2 ne reconnaisse pas les protéines aviaires peut être dû à la grande divergence entre les séquences aviaires et humaines existante dans la portion de l'exon 2 à partir de laquelle la protéine bactérienne p19 a été synthétisée. Les parties COOH terminales des protéines aviaires et humaines sont beaucoup mieux conservées.

## 2 - Tests de spécificités des sera dirigés contre le produit de l'exon 1.

Les sera obtenus à partir de la protéine bactérienne p25 reconnaissent cette dernière de manière spécifique (résultats non présentés). Deux lapins ont été inoculés avec l'antigène bactérien pour donner des sera équivalents. Cependant, cette reconnaissance spécifique de la protéine bactérienne ne démontre pas la présence dans ces sera d'anticorps dirigés contre la protéine putative de l'exon 1 (la protéine p20). En effet, si seuls des anticorps anti-MS2 sont présents dans ces sera, la protéine bactérienne sera également identifiée de manière spécifique. Les anticorps anti-MS2 ne pouvant pas être complètement éliminés, il est nécessaire de tester les sera anti-p25 pour leurs déterminants dirigés contre la protéine p20 sur d'autres protéines contenant des séquences d'acides aminés codées par l'exon 1. En outre, il serait aussi utile de comparer directement le titre en anticorps précipitants anti-p20 des sera anti-p25 avec ceux de sera bien caractérisés.

Dans ce double but, nous avons construit un vecteur d'expression eucaryote p-gag-Ex1-myc-src qui devrait permettre la synthèse d'une triple chimère protéique gag-Ex1-myc d'environ 60 kd (schéma 20). Nous avons utilisé la transformabilité des fibroblastes aviaires par le gène src du virus du sarcome de Rous pour sélectionner les cellules embryonnaires de poulet transfectées par le recombinant p-gag-Ex1-myc-src. Nous avons inséré le gène src dans le recombinant p-gag-Ex1-myc-src de manière à ce qu'il puisse s'exprimer à partir d'un ARN sous génomique (schéma 20). Les cellules transfectées et transformées par le recombinant p-gag-Ex1-myc-src ont été isolées et marquées en pulse de 45 minutes à la méthionine <sup>35</sup>S. La présence de la protéine gag-Ex1-myc a été testée par immunoprécipitation avec différents sera. Le serum dirigé contre la protéine bactérienne p25 immunoprécipite spécifiquement la protéine de fusion gag-Ex1-myc p75 (article N°3, figure 3) tandis que le même serum adsorbé préalablement avec l'antigène bactérien p25 ne reconnaît plus la protéine gag-Ex1-myc. En outre, dans les conditions de l'expérience, le serum anti-p25 reconnaît cette protéine au moins aussi bien que le serum anti-myc-ex3 (caractérisé précédemment) ou qu'un serum anti-p19-gag également bien caractérisé (article N°3, figure 3). Il est à noter que la protéine de fusion gag-Ex1-myc comme la protéine myc à un poids moléculaire apparent (75 kd) en gel de polyacrylamide (PAGE) supérieur au poids moléculaire théorique (60 kd).

En conclusion, ces résultats montrent que les séras dirigés contre la protéine bactérienne p25 possèdent des déterminants dirigés contre le produit de l'exon 1 (p20) et sont capables d'immunoprécipiter une protéine contenant la majeure partie des séquences d'acides aminés codés par l'exon 1. Ces séras ont été nommés séras anti-p20.

**DISCUSSION GENERALE**  
**CONCLUSIONS**

Le fait que le gène c-myc soit exprimé dans des cellules normales amène la question de savoir si la surexpression des protéines c-myc normales est suffisante pour conférer à ces dernières un pouvoir oncogène ou si des mutations dans les séquences codantes du gène c-myc sont nécessaires pour que ce dernier devienne un oncogène. L'un des buts de ce travail a été d'essayer de répondre à ces questions. Nous avons montré que la surexpression des produits normaux du gène c-myc humain permet la transformation morphologique des cellules embryonnaires de caille (QEC) *in vitro*. Ces cellules acquièrent également la possibilité de cloner en agar semi-solide. En outre, le gène c-myc humain sous-cloné à partir de QEC transformées par ce dernier ne présente aucune mutation par rapport au gène normal de départ. Ceci démontre clairement que la seule surexpression d'un gène c-myc normal peut interférer avec la physiologie de la cellule pour la conduire vers la malignité.

Cependant, la formation d'une tumeur découlant fort probablement de processus biologiques beaucoup plus complexes que la transformation cellulaire maligne *in vitro*, le fait que des cellules transformées par le gène c-myc clonent en agar ne prouve pas que ces cellules placées dans un environnement animal soient tumorigènes. Aussi, on peut se demander si la seule surexpression des protéines myc normales permet de rendre les cellules tumorigènes *in vivo*. Dans le système murin, à l'aide d'animaux transgéniques, Adams *et al.* (1986) ont montré que l'expression d'un gène c-myc murin normal placé sous le contrôle d'un enhancer des immunoglobulines et intégré dans le génome de l'oeuf d'une souris est impliquée dans l'émergence de lymphomes de types B chez la souris adulte. Toutefois, ces travaux suggèrent également que le gène c-myc surexprimé dans les lymphocytes ne semble pas *per se* capable de transformer pleinement ces cellules. Il est donc possible qu'*in vivo* un autre événement soit nécessaire pour conduire les cellules vers l'état tumoral. Ce deuxième événement pourrait être lié à des mutations dans les séquences codantes du gène c-myc. Ce type de suractivation a déjà été rapporté pour l'oncogène ras.

En collaboration avec l'équipe de F.Dieterlein, nous avons également étudié le pouvoir oncogène du gène c-myc *in vivo*. Le virus vSX-AHM qui contient le gène c-myc humain et que nous décrivons dans ce mémoire a été injecté avec un virus helper (RAV1) dans des embryons de poulet. Des résultats préliminaires indiquent que ce virus induit des endothéliomes et des tumeurs solides dans le poulet (F.Dieterlein et S.Saule, communication personnelle). Aussi, il sera intéressant de savoir si le gène c-myc humain a été muté pour donner au virus un pouvoir transformant *in vivo*.

Quoi qu'il en soit, les différents travaux précédemment cités ainsi que les nôtres convergent pour suggérer qu'*in vivo* la cellule ne doit pas être insensible à toute altération de la régulation du gène c-myc conduisant à une augmentation de l'expression des produits normaux de ce gène. Cette proposition est renforcée par le fait que ce gène semble être soumis à une étroite régulation. En effet, au moins pour les espèces murines et humaines, le gène c-myc est "truffé" de séquences de régulation :

- Séquences "dehancer" (Remmers *et al.*, 1986) ainsi que séquences impliquées dans le choix

des promoteurs (Yang *et al.*, 1985) situées en amont de l'exon 1.

- Séquences promotrices (deux) situées dans l'exon 1 (Stanton *et al.*, 1983 ; Saito *et al.*, 1983).

- Séquences atténuatrices situées dans l'intron 1 (Bentley et Groudine, 1986).

En outre, d'autres éléments de séquence tels que les deux sites putatifs de polyadénylation identifiés dans le gène c-myc humain et situés en 3' de l'exon 3 (Gazin *et al.*, 1984) pourraient également jouer un rôle dans la régulation du gène c-myc.

Enfin, un élément spécifique au gène c-myc humain pourrait aussi être impliqué dans la régulation de ce gène, il s'agit du cadre de lecture ouvert de l'exon 1. Ce cadre code-t-il pour une protéine dans les cellules humaines, et si oui, quel rôle joue cette protéine ? Ce sont des questions auxquelles l'étude présentée dans la deuxième partie de ce mémoire avait pour but de répondre.

Comme prélude à cette étude, nous avons voulu vérifier que le cadre de lecture était effectivement ouvert et que l'ATG considéré comme codon d'initiation était fonctionnel. Ces deux points ont été acquis en montrant que l'exon 1 synthétise une protéine de 20 kd ou p20 dans un système acellulaire. Nous nous sommes ensuite attachés à produire des anticorps dirigés contre le produit de l'exon 1. Ces derniers ont été obtenus en injectant à des lapins une protéine de fusion contenant 158 acides aminés codés par l'exon 1 et produite dans *E.coli* par un vecteur d'expression. Nous avons montré que ces anticorps possèdent des anticorps précipitants dirigés contre des épitopes portés par la protéine p20. A l'aide de cet outil moléculaire, nous avons recherché le produit de l'exon 1 dans les cellules humaines. Cependant, dans ces dernières la quête de la protéine p20 est restée vaine. Nous avons notamment recherché le produit de l'exon 1 dans des cellules HL60 qui expriment un ARN de 3.2 kb initié à environ 0.5 kb de l'ATG du cadre de lecture ouvert de l'exon 1 (Bentley et Groudine, 1986). Cet ARN susceptible de coder pour la protéine p20 est synthétisé en quantité non négligeable puisqu'il représente dans ces cellules 7% des ARN myc totaux. On est alors en droit de se demander pourquoi le produit de l'exon 1 n'est pas détecté dans ces cellules.

Nous ne pouvons pas éliminer la première hypothèse qui est de considérer que le cadre de lecture ouvert de l'exon 1 ne code pour rien et ne sert à rien. Toutefois, il est difficile de concevoir que ce gène qui semble sujet à une régulation des plus fines porte en son sein un cadre de lecture ouvert de 600 nucléotides qui ne serve à rien !

Nous nous intéresserons à la deuxième hypothèse qui consiste à "vouloir" que ce cadre de lecture serve à quelque chose. Le fait que nous ne mettions pas en évidence le produit de l'exon 1 dans les cellules humaines testées telles que les cellules HL60 peut être dû à plusieurs raisons :

- Premièrement, la protéine p20 serait synthétisée en quantité non négligeable dans ces cellules mais nos anticorps ne nous permettraient pas de la détecter. Les différentes données sur les propriétés précipitantes des anticorps anti p20 et notamment celles sur la précipitation de la protéine de fusion gag-ex1 rendent cette hypothèse fort peu probable. Cependant, nous ne pouvons pas la réfuter complètement. En effet, la protéine p20 pourrait subir, dans les cellules humaines, des

modifications post-traductionnelles qui la rendraient inapte à être reconnue par nos sera.

- Deuxièmement, la protéine p20 est synthétisée en quantité négligeable ou n'est pas synthétisée dans les cellules testées. Les résultats que nous avons obtenus sur la synthèse de la protéine gag-ex1 dans les cellules aviaires vont dans le sens d'une mauvaise traductibilité de l'ARN. On peut alors supposer que la traduction des ARN susceptibles de coder pour la protéine p20 nécessite la présence d'éléments spécifiques (hormones) qui sont absents dans les cellules humaines analysées ainsi que dans les cellules aviaires. Ces facteurs seraient synthétisés dans des tissus spécifiques ou au cours du développement embryonnaire et permettraient l'expression ponctuelle du produit de l'exon 1.

- Troisièmement, on peut également proposer que le cadre de lecture ouvert de l'exon 1 ne code pas pour un produit mais au contraire est utilisé par la cellule pour bloquer la synthèse des protéines myc. Cette hypothèse hautement spéculative pourrait être cependant étayée par certaines observations. Dans les cellules 208F transfectées par un recombinant du gène c-myc humain P-AHM, l'ARN myc de 3.4 kb qui contient le cadre de lecture de l'exon 1 en amont du cadre de lecture codant pour les protéines myc p64/p67, ne code pas pour ces dernières. Ce résultat permet de penser que le cadre ouvert de l'exon 1 empêche la synthèse des protéines myc à partir de cet ARN. Plus encore, on peut supposer que la traduction du cadre de lecture ouvert de l'exon 1 soit bloquée. Cette hypothèse est renforcée par le fait que dans les 208F transfectées par le recombinant pP-AHM, le produit de l'exon 1 n'est pas détecté. Ce blocage interdirait toute réinitiation de la machinerie ribosomale sur l'AUG initiateur des protéines myc. En effet, si l'on en croit les récents travaux de l'équipe de Berg, 10 % à 20 % de réinitiation des ribosomes peut être obtenue en aval d'un cadre de lecture ouvert traduit et ceci dans les cellules eucaryotes. Or dans les 208F transfectées, nous aurions vu 10 à 20 % de réinitiation des ribosomes sur l'AUG initiateur des protéines myc sur l'ARN de 3.4 kb. Aussi, nous proposons que le cadre de lecture de l'exon 1 pourrait être un "piège à ribosomes" qui régulerait l'expression des protéines myc en bloquant la synthèse de ces dernières sur les ARN initiés en amont du promoteur P1. Quel serait alors le gain, en terme de régulation du gène c-myc, pour la cellule. On peut imaginer que les ARN initiés en amont du promoteur P1 et donc en amont de l'AUG du cadre de lecture ouvert de l'exon 1, correspondent à des initiations "sauvages" qui s'effectueraient au niveau des zones de régulation du gène myc, régions où la structure de la chromatine est ouverte. Ces initiations ne seraient pas régulées au niveau transcriptionnel mais ne perturberaient pas à terme la régulation du gène c-myc puisque les ARN correspondants ne seraient pas codants. Les ARN de 3.2 kb pourraient-ils correspondre à de telles initiations ? Il est difficile de répondre à cette question. Toutefois, le fait que les sites de promotion de ces ARN de 3.2 kb ne soient pas stimulés par les séquences activatrices d'un LTR aviaire alors que les promoteurs P1 et P2 sont stimulés suggère déjà que ces zones de promotion doivent différer au niveau structural.

En conclusion, codant ou non codant, le cadre de lecture ouvert de l'exon 1 pourrait avoir un autre rôle que celui d'être simplement un "casse-tête" pour chercheur.

**BIBLIOGRAPHIE**

- ADAMS, J.M., A.W.MARRIS, C.A.PINKERT, L.M.CORCORAN, W.S.ALEXANDER, S.CORY, R.D.PALMITER and R.L.BRINSTER. (1985). The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature* 318 : 533-538.
- ADAMS, J.M., S.GERONDAKIS, E.WEBB, L.M.CORCORAN and S.CORY. (1983) Cellular myc oncogene is altered by chromosome translocation in an immunoglobulin locus in murine plasmacytomas and is rearranged similarly in human Burkitt lymphomas. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80 : 1982-1986.
- ALITALO, K., G.RAMSAY, J.M.BISHOP, S.OHLSSON-PFEIFER, W.W.COLBY and A.D.LEVINSON (1983a) Identification of nuclear proteins encoded by viral and cellular myc oncogenes. *Nature* 306 : 274-277.
- ALITALO, K., M.SCHWAB, C.C.LIN, H.E.VARMUS and J.M.BISHOP. (1983b) Homogeneously staining chromosomal regions contain amplified copies of an abundantly expressed cellular oncogene (c-myc) in malignant neuroendocrine cells from a human colon carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80 : 1707-1711.
- ALLAN, M., J.ZHU, P.MONTAGUE and J.P.PAUL. (1984). Differential response of multiple E-Globin cap sites to cis- and trans- acting controls. *Cell* 38 : 399-407.
- ARMELIN, H.A., M.C.S.ARMELIN, K.KELLY, T.STEWART, P.LEDER, B.H.COCHRAN and C.D.STILES. (1984). Functional role for c-myc in mitogenic response to platelet-derived growth factor. *Nature* 310 : 655-660.
- BALTIMORE, D. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 226 : 1209-1211.
- BALTIMORE, D. (1975). Tumor viruses : 1974. Cold spring harbor symp. quant. biol. 39 : 1187-1200.
- BATTEY, J., C.MOULDING, R.TAUB, W.MURPHY, T.STEWART, H.POTTER, G. LENOIR and P.LEDER. (1983). The human c-myc oncogene : structural consequences of translocation into the IgH locus in burkitt lymphoma. *Cell* 34 : 779-787.
- BECHADE, C., B.PESSAC, G.CALOTHY, P.MARTIN, J.COLL, F.DENZEZ, S. SAULE, J.GHYSDAEL and D.STEHELIN. (1985). Proliferation and transformation of chicken embryo neuroretina cells by retrovirus Mill Hill n°2 (MH2) depends on the expression of the v-mil oncogene. *Nature (London)* 316 : 559-562.
- BEGG, A.M. (1927) A filtrable endothelioma of the fowl. *Lancet* 2 : 912-915.
- BENTLEY, D.L. and M.GROUDINE (1986) A block to elongation is largely responsible for decreased transcription of c-myc in differentiated HL60 cells. *Nature* 321 : 702-706.
- BERK, A.J., F.LEE, T.HARRISON, J.WILLIAMS and P.A.SHARP (1979). Pre-early adenovirus 5 gene product regulates synthesis of early viral messenger RNAs. *Cell* 17 : 935-944.
- BERNARD, O., S.CORY, S.GERONDEKIS, E.WEBB and J.M.ADAMS. (1983). Sequence of the murine and human cellular myc oncogenes and two modes of myc transcription resulting from chromosome translocation in B lymphoid tumours. *EMBO J.* 2 : 2375-2383.
- BERNHEIM, A., R.BERGER and G.LENOIR. (1981). Cytogenetic studies on African Burkitt's lymphoma cell lines t(8;14), t(2;8) and t(8;22) translocations. *Cancer Genet. Cytogenet.* 3 : 307-315.
- BISHOP, J.M. (1985). Viral oncogenes. *Cell* 42 : 23-28.

- BLAIR,D.G., M.OSKARSSON, T.G.WOOD, W.L.McCLEMENTS, P.J.FISHINGER AND G.F.VAN DE WOUDE. (1981) Activation of the transforming potential of a normal cell sequence : a molecular model for oncogenesis. *Science* 212 : 941-943.
- BLANCHARD,J.M., M.PIECHACZYK, C.DANI, J.C.CHAMBARD, A.FRANCHI, J.POUYSSEGUR and P.JEANTEUR. (1985). c-myc gene is transcribed at high rate in G0 arrested fibroblasts and is post-transcriptionally regulated in response to growth factors. *Nature* 317 : 443-445.
- BOWEN,B., STEINBERG,J., LAEMMLI,U.K. and WEINTRAUB H. (1980) The detection of DNA binding proteins by protein blotting. *Nucleic Acids Research* 8 : 1-20.
- BRAUN,M.J., P.L.DEININGER and J.W.CASEY (1985). Nucleotide sequence of a transduced myc gene from a defective feline leukemia provirus. *J.Virol.* 55 : 177-183.
- BRAVO,R., J.BURCKHARDT, T.CURRAN and R.MULLER. (1985). Stimulation and inhibition of growth by EGF in different A431 cell clones is accompanied by the rapid induction of c-fos and c-myc proto-oncogenes. *EMBO J.* 4 : 1193-1197.
- BROOKS,R.F. (1977). Continuous protein synthesis is required to maintain the probability of entry into S phase. *Cell* 12 : 311-317.
- BUNTE,T., P.DONNER, E.PFAFF, B.REIS, I.GREISER-WILKE, H.SCHALLER and K.MOELLING. (1984). Inhibition of DNA-binding of purified p55v-myc in vitro by antibodies against bacterially expressed myc protein and a synthetic peptide. *EMBO J.* 3 : 1919-1924.
- BUNTE,T., I.GREISER-WILKE and K.MOELLING. (1983). The transforming protein of the MC29- related virus CMII is a nuclear DNA-binding protein whereas MH2 codes for a cytoplasmic RNA-DNA binding protein.*EMBO J.* 2 : 1087-1092.
- BUNTE,T., I.GREISER-WILKE, P.DONNER and K.MOELLING (1982) Association of gag-myc proteins from avian myeloblastosis virus wild-type and mutants with chromatin. *EMBO J.* 1 : 919-927.
- BUTNICK,N.Z., C.MIYAMOTO, R.CHIZZONITE, B.R.CULLEN, G.Ju and A.M.SKALKKA. (1985). Regulation of the human c-myc gene : 5' noncoding sequences do not affect translation. *Mol. Cell. Biol.* 5 : 3009-3016.
- CAMPISI,J., H.E.GRAY, A.B.PARDEE, M.DEAN and G.E.SONENSHEIN. (1984) Cell-cycle control of c-myc but not c-ras expression is lost following chemical transformation. *Cell* 36 : 241-247.
- CHANG,E.H., M.E.FURTH, E.SCOLNICK and D.R.LOWY. (1982) Tumorigenic of mammalian cells induced by a normal human gene homologous to the oncogene of Harvey murine sarcoma virus. *Nature* 297 : 479-482.
- COCHRAN,B.H., J.ZULLO, J.M.VERMA and C.D.STILES. (1984). Expression of the c-fos gene and of a fos related gene is stimulated by platelet divided growth factor. *Science* 226 : 1080-1082.
- COFFIN,J.M. (1979). Structure replication and recombination of retrovirus genomes : some unifying hypotheses. *J. gen. virol.* 42 : 1-26.
- COLBY,W.W., E.Y.CHEN, D.H.SMITH and A.D.LEVINSON. (1983). Identification and nucleotide sequence of a human locus homologous to the v-myc oncogene of avian myelocytomatosis virus MC29. *Nature* 301 : 722-725.

- COLL,J.,M.RIGHI, C.DE TAISNE, C.DISSOUS, A.GEGONNE and D.STEHELIN (1983a) Molecular cloning of the avian acute transforming retrovirus MH2 reveals a novel cell-derived sequence (v-mil) in addition to the myc oncogene. *The EMBO J.* 2 : 2189-2194.
- COLL,J., S.SAULE, P.MARTIN, M.B.RAES, C.LAGROU, T.GRAF, H.BEUG, I.E.SIMON and D.STEHELIN. (1983b). The cellular oncogenes c-myc, c-myb and c-erb are transcribed in defined types of avian hematopoietic cells. *Exp. Cell. Res.* 149 : 151-162.
- COOPER,M.D., L.N.PAYNE, P.B.DENT, B.R.BURMESTER and R.A.GOOD. (1968). Pathogenesis of avian lymphoid leukosis. I.Histogenesis. *J.Natl. Cancer. Inst.* 41 : 373-389.
- COOPER,G.M. and P.E.NEIMAN. (1981). Two distinct candidate transforming genes of lymphoid leukosis virus-induced neoplasms. *Nature* 292 : 857-858.
- COUGHLIN,S.R., W.M.F.LEE, P.W.WILLIAMS, G.M.GIELS and L.T.WILLIAMS. (1985). c-myc gene expression is stimulated by agents that activate protein kinase C and does not account for the mitogenic effect of PDGF. *Cell* 43 : 243-251.
- COVEY,L. Y.CHOI and C.PRIVES. (1984). Association of simian virus 40T antigen with the nuclear matrix of infected and transformed monkey cells. *Mol. Cell. Biol.* 4 : 1384-1392.
- CROCE,C.M., ERICKSON,J., Ar-RUSHDI,A., ADEN,D. and K.NISHIKURA (1984) Translocated c-myc oncogene of Burkitt lymphoma is transcribed in plasma cells and repressed in lymphoblastoid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 81 : 3170-3174.
- CROCE,C.M., W.THIERFELDER, J.ERIKSON, K.NISHIKURA, J.FINAN, G.M.LENOIR and P.C.NOWELL. (1983). Transcriptional activation of an unrearranged and untranslocated c-myc oncogene by translocation of a C lambda locus in Burkitt lymphoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80 : 6922-6926.
- CURRAN,T., A.D.MILLER, L.ZOKAS and J.M.VERMA. (1984). Viral and cellular fos proteins : A comparative analysis. *Cell* 36 : 259-268.
- DALLA-FAVERA,R., S.MARTINOTTI, R.C.GALLO, J.ERIKSON and C.M.CROCE. (1983). Translocation and rearrangements of the c-myc oncogene locus in human undifferentiated B-cell lymphomas. *Science* 219 : 963-967.
- DALLA-FAVERA,R., F.WONG-STAAAL and R.C.GALLO. (1982). Onc gene amplification in promyelocytic leukaemia cell line HL-60 and primary leukaemic cells of the same patient. *Nature* 299 : 61-63.
- DANI,C., N.MECHTI, M.PIECHACZYK, B.LEBLEU, P.JEANTEUR and J.M.BLANCHARD. (1985). Increased rate of degradation of c-myc mRNA in interferon-treated daudi cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 82 : 4896-4899.
- DANI,C., J.M.BLANCHARD, M.PIECHACZYK, S.El SABOUTY, L.MARTY and P.JEANTEUR. (1984). Extreme instability of c-myc mRNA in normal and transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81 : 7046-7050.
- DARVEAU,A., J.PELLETIER and N.SONENBERG. (1985). Differential efficiencies of in vitro translation of mouse c-myc transcript differing in the 5' untranslated region. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 82 : 2315-2319.
- DEVOS,R., VAN EMMEIO,J., CONTRERAS,R. and FIERS,W. (1979) Construction and characterization of a plasmid containing a nearly full-size DNA copy of bacteriophage MS2 RNA. *J.Mol.Biol.* 128 : 595-619.

- DIAMOND,A., G.M.COOPER, J.RITZ and M.A.LANE. (1983). Identification and molecular cloning of the human B-lym transforming gene activated in Burkitt's lymphomas. *Nature* 305 : 112-116.
- DONNER,P., T.BUNTE, I.GREISER-WILKE and K.MOELLING. (1983). Decreased DNA-binding activity of purified transformation-specific proteins from deletion mutants of the acute avian leukemia virus-MC29. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80 : 2861-2865.
- DONNER,P., I.GREISER-WILKE and K.MOELLING. (1982). Nuclear localization and DNA binding of the transforming gene product of avian myelocytomatosis virus. *Nature* 296 : 262-265.
- DONY,C., M.KESSEL and P.GRUSS. (1985). Post-transcriptional control of myc and p53 expression during differentiation of the embryonal carcinoma cell line F9. *Nature* 317 : 636-639.
- DOWNWARD,J., Y.YARDEN, E.MAYES, G.SCRACE, N.TOTTY, P.STOCKWELL, A.ULLRICH, J.SCHLESSINGER and M.D.WATERFIELD. (1984). Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erbB oncogene protein sequences. *Nature* 307 : 521-525.
- DUESBERG,P.H. and P.K.VOGT. (1970). Differences between the ribonucleic acids of transforming and nontransforming avian tumor viruses. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 67 : 1673.
- DYSON,P.J., T.D.LITTLEWOOD, A.FORSTER and T.H.RABITTS. (1985). Chromatin structure of transcriptionally active and inactive human c-myc alleles. *EMBO J.* 4, 2885-2891.
- EICK,D., M.PIECHACZYK, B.MENGLIN, J.M.BLANCHARD, B.TRAUB, E.KOFLER, S.WIEST, G.M.LENOIR and G.W.BORNKAMM. (1985). Aberrant c-myc RNAs of Burkitt's lymphoma cells have longer half-lives. *EMBO J.* 4 : 3717-3725.
- EINAT,M., D.RESNITZKY and A.KIMCHI. (1985). Close link between reduction of c-myc expression by interferon and G0/G1 arrest. *Nature* 313, 597-600.
- EISENMAN,R.N., C.Y.TECHIBANO, H.D.ABRAMS and S.R.HANN. (1985). v-myc and c-myc encoded proteins are associated with the nuclear matrix. *Mol. Cell. Biol.* 5 : 114-126 .
- ENRIETTO,P.J. and M.J.HAYMAN. (1982) Restriction enzyme analysis of partially transformation-defective mutants of acute leukemia virus MC29. *J.Virol.* 44 : 711-715.
- ERIKSON,J., K.NISHIKURA, A.AR-RUSDHI, J.FINAN, B.EMANUEL, G.LENOIR, P.C.NOWELL and C.M.CROCE. (1983). Translocation of an immunoglobuline Kappa locus to a region 3' of an unrearranged c-myc oncogene enhances c-myc transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 80 : 7581-7585.
- EVAN,I.E. and D.C.HANCOCK. (1985). Studies on the interection of the human c-myc protein with cell nuclei : p62<sup>c-myc</sup> as a member of a discret subset of nuclear proteins. *Cell* 43 : 253-261.
- FAVA,R.A. and S.COHEN. (1984). Isolation of a calcium dependant 35-kilodelton substrate for the epidermal growth factor receptor/kimse from A-341 cells. *J. Biol. Chim.* 259 : 2636-2645.
- FELDMAN,L.T. and J.R.NEVINS. (1983). Localization of the adenovirus E1Aa protein, a pasitive acting transcriptional factor, in infected cells. *Mol. Cell. Biol.* 3 : 829-838.
- FEO,S., R.HARVEY, L.SHOWE and C.M.CROCE. (1986). Regulation of translocated c-myc genes transfected into plasmacytoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 83 : 706-709.
- FLINT,S.J. (1981). Transformation by adenoviruses. In *molecular biology of tumor viruses, part II. DNA tumor viruses*, J.Tooze, ed (New-York : cold spring harbor press), 574-576

- FRIED, M. (1965). Cell transformation ability of temperature sensitive mutant of polyoma virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 53 : 486-491.
- GAYNOR, R.B., P.HILLMAN and A.J.BERK. (1984). Adenovirus early region 1A protein activates transcription of nonviral gene introduced into mammalian cells by infection or transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 : 1193-1197 .
- GAZIN, C., S.DUPONT DE DINECHIN, A.HAMPE, J.M.MASSON, P.MARTIN, D.STEHELIN and F.GALIBERT. (1984). Nucleotide sequence of the human c-myc locus : provocative open reading frame within the first exons. *EMBO J.* 3 : 383-387.
- GINGERAS, T., D.SCIAKY, R.GELINAS, J.BING DONG, C.YEN, M.KELLY, P.BULLOCK, B.PARSONS R.O'NEILL and R.ROBERTS. (1982) : Nucleotide sequences from the Adenovirus-2 genome. *J. biol. chim.* 257 : 13475-13491.
- GOUBIN, G., D.S.GOLDMAN, J.LUCE, P.E.NEIMAN and G.M.COOPER. (1983). Molecular cloning and nucleotide sequence of a transforming gene detected by transfection of chicken B-cell lymphoma DNA. *Nature* 302 : 114-119.
- GOUSTIN, A.J., E.B.LEOF, G.D.SHIPLEY and H.L.MOSES. (1986). Growth factors and cancer. *Cancer research* 46 : 1015-1029 .
- GOUSTIN, A.S., C.BETSHOLTZ, S.PFEIFER-OHLSSON, H.PERSSON, J.RYDNERT, M.BYWATER, G.MOIMGREN, C.H.HELDIN, B.WESTERMARK and R.OHLSSON. (1985). Coexpression of the sis and myc proto-oncogenes in developing human placenta suggests autocrine control of trophoblast growth. *Cell* 41 : 301-312.
- GRAF, T. and D.STEHELIN. (1982). Avian leukaemia viruses oncogenes and genome structure. *Bioch. Bioph. Acta* 651 : 245-271.
- GRAF, T. and H.BEUG. (1978). Avian leukemia viruses. Interaction with their target cells in vivo and in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* 516 : 269-299 .
- GRAHAM, F.L. and A.J.VAN DER EB. (1973) A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52 : 456-467.
- GREEN, M.R., R.TREISMAN and T.MANIATIS. (1983). Transcriptional activation of cloned human B-globin genes by viral immediate early gene products. *Cell* 35 : 137-148.
- GREENBERG, M.E. and E.B.ZIFF. (1984). Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. *Nature* 311 : 433-438.
- HANN, S.R., C.B.THOMPSON and R.N.EISENMAN. (1985). c-myc oncogene protein synthesis is independent of the cell cycle in human and avian cells. *Nature (London)* 314 : 366-369.
- HANN, S.R. and R.N.EISENMAN. (1984). Proteins encoded by the human c-myc oncogene : differential expression in neoplastic cells. *Mol. Cell. Biol.* 4 : 2486-2497.
- HANN, S.R., H.D.ABRAMS, L.R.ROHRSCHEIDER and R.N.EISENMAN. (1983). Proteins encoded by the v-myc and c-myc oncogenes : Identification and localization in acute leukemia virus transformants and bursal lymphoma cell line. *Cell* 34 : 789-798.
- HARRIS, L.J., R.B.LANG and K.B.MARCU. (1982). Non immunoglobulin associated DNA rearrangements in mouse plasmacytomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 79 : 4175-4179.

- HAYDAY, A.C., S.D.GILLIES, H.SAITO, C.WOOD, K.WIMAN, W.S.HAYWARD and S.TONEGAWA. (1984). Activation of a translocated human c-myc gene by an enhancer in the immunoglobulin heavy chain locus. *Nature* 307 : 334-340.
- HAYMAN, M.J. (1981) Transforming proteins of avian retroviruses. *J. Gen. Virol.* 52 : 1-14.
- HAYWARD, W.S., B.G.NEEL and S.M.ASTRIN. (1981). Activation of a cellular oncogene by promoter insertion in ALV induced lymphoid leukemia. *Nature* 290 : 475-480.
- HOLLIS, G.F., K.F.MITCHELL, J.BATTEY, M.POTTER, R.TAUB, G.M.LENOIR and P.LEDER. (1984). A variant translocation places the lambda immunoglobulin genes 3' to the c-myc oncogene in Burkitt's lymphoma. *Nature* 307 : 752-755.
- IMPERIALE, M.J., H.KAO, L.T.FELDMAN, J.R.NEVINS and S.STRICKLAND (1984). Common control of the heat shock gene and early adenovirus genes : evidence for a cellular EIA-like activity. *Mol. cell. biol.* 4 : 867-874.
- IVANOV, X., Z.MLADENOV, S.NEDYALKOV, T.G.TODOROV and M.YAKIMOV (1964) Experimental investigations into avian leukemia virus : transmission, haematology and morphology of avian myelocytomatosis. *Bull. Inst. Pathol. Comp. Anim. Acad. Bulg. Sci.* 10 : 5-38.
- JOHNSON, A., C.H.HELDIN, A.WASTESON, B.WESTERMARK, D.F.DEUEL, J.S.HUANG, P.H.SEEBURG, A.GRAY, A.ULLRICH, G.SCRACE, P.STROOBANT and M.D.WATERFIELD. (1984). The c-sis gene encodes a precursor of the B chain of platelet-derived growth factor. *EMBO J.* 3 : 921-928.
- KACZMAREK, L., J.K.HYLAND, R.WAIT, M.ROSENBERG and R.BASERGA. (1985). Microinjected c-myc as a competence factor. *Science* 228 : 1313-1315.
- KAPLAN, J.C. et M.F.SZAJNERT. (1985). Le paradigme du lymphome de Burkitt. *Medicine/Sciences* 1 : 17-23.
- KEATH, E.J., P.G.CAIMI and M.D.COLE. (1984). Fibroblast lines expressing activated c-myc oncogenes are tumorigenic in nude mice and syngenic animals. *Cell* 39 : 339-348.
- KELLY, K., B.H.COCHRAN, C.D.STILES and P.LEDER. (1983). Cell-specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor. *Cell* 35 : 603-610.
- KINGSTON, R.E., A.S.BALDWIN, Jr and P.A.SHARP. (1984b). Regulation of heat shock protein 70 gene expression by c-myc. *Nature* 312 : 280-282.
- KIRSCH, I.R., C.C.MORTON, K.NAKAHARA and P.LEDER. (1982). Human immunoglobulin heavy chain genes map to a region of translocation in malignant B Lymphocytes. *Science* 216 : 301-303.
- KLEMPNAUER, K.H., G.SYMONDS, G.I.EVAN and J.M.BISHOP. (1984). Subcellular localization of proteins encoded by oncogenes of avian myeloblastosis virus and avian leukemia virus E26 and by the chicken c-myb gene. *Cell* 37 : 537-547.
- KNIGHT, E., ANTON, E.D., FAHEY, D., FRIEDLAND, B.K. and G.J.JONAK (1985) Interferon regulates c-myc gene expression in Daudi cells at the post-transcriptional level. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 82 : 1151-1154.
- KOHL, N.E., E.LEGOUY, R.A.DELINHO, P.D.NISEN, R.K.SMITH, C.E.GEE and F.W.ALT. (1986). Human N-myc is closely related in organization and nucleotide sequence to c-myc. *Nature (London)* 319 : 73-77.

- KOHL,N.E., N.KANDA, R.R.SCHRECK, G.BRUNS, S.A.LATT, F.GILBERT and F.W.ALT. (1983). Transposition and amplification of oncogene related sequences in human neuroblastomas. *Cell* 35 : 359-367.
- KOZAK,M. (1986) Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* 44 : 283-292.
- KOZBOR,D. and C.M.CROCE. (1984). Amplification of the c-myc oncogene in one of five human breast carcinoma cell lines. *Cancer. Res.* 44 : 438-441.
- KRUIJER,W., J.A.COOPER, T.HUNTER and I.M.VERMA. (1984). Platelet derived growth factor induces rapid but transient expression of the c-fos gene and protein. *Nature* 312 : 711-716.
- LACHMAN,H.M., K.S.HATTON, A.I.SHOULTCHI and C.L.SCHILDKRAUT. (1985). c-myc mRNA levels in the cell cycle change in mouse erythro leukemia cells following inducer treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 82 : 5323-5327.
- LAI,M.M.C., P.H.DUESBERG, J.HORST and P.K.VOGT. (1973) Avian tumor virus RNA : a comparison of three sarcoma viruses and their transformation defective derivatives by oligonucleotide fingerprint and DNA-RNA hybridization. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 70 : 2266-2270.
- LAND,H., L.F.PARADA and R.A.WEINBERG. (1983). Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* 304 : 596-602.
- LEE,W.M.F., M.SCHWAB, D.WESTAWAY and H.VARMUS. (1985). Augmented expression of normal c-myc is sufficient for cotransformation of rat embryo cells with a mutant ras gene. *Mol. Cel. Biol.* 5 : 3345-3356.
- LINIAL,M. (1982). Two retroviruses with similar transforming genes exhibit differences in transforming potential. *Virology* 119 : 382-391.
- LINIAL,M. and M.GROUDINE. (1985). Transcription of three c-myc exon is enhanced in chicken bursal lymphoma cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82 : 53-57.
- LINIAL,M., N.GUNDERSON and M.GROUDINE. (1985). Enhanced transcription of c-myc in bursal lymphoma cells requires continuous protein synthesis. *Science* 230 : 1126-1132.
- LITTLE,C.D., M.M.NAU, D.N.CARNEY, A.F.GAZDAR and J.D.MINNA. (1983). Amplification and expression of the c-myc oncogene in human lung cancer cell lines. *Nature* 306 : 194-196.
- LÖLIGER,H.C. (1964) Experimentelle untersuchungen zu übertragung der hühnerleukose. *Deut.Tiernerzh. Wachenschr.* 71 : 207-212.
- MACPHERSON,I. and L.MONTAGNIER (1964) Agar suspension culture for the selective of cells transformed by polyoma virus. *Virology* 23 : 291-294.
- MADERIOUS,A. and S.CHEN-KIANG (1984) Pausing and premature termination of human RNA polymerase II during transcription of adenovirus in vivo and in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 81 : 5931-5935.
- MALCOM,S., P.BARTON, C.MURPHY, M.A.FERGUSSION-SMITH, D.L.BENTLEY and T.RABBITS. (1982). Localization of human immunoglobulin Kappa light chain variable region genes to the short arm of chromosome 2 by in situ hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79 : 4957-4961.

- MANOLOVA, Y., G. MANOLOV, J. KIELER, A. LEVAN and G. KLEIN. (1979). Genesis of the 14q+ marker in Burkitt's lymphoma. *Hereditas* 90 : 5-10.
- MARCU, K.B., L.J. HARRIS, L.W. STANTON, J. ERIKSON, R. WATT and C.M. CROCE. (1983). Transcriptionally active c-myc oncogene is contained within NIARD, a DNA sequence associated with chromosome translocations in B-cell neoplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80 : 519-523.
- MARTIN, G.S. (1970). Rous sarcoma virus : a function required for the maintenance of the transformed state. *Nature* 227 : 1021-1023.
- MARTIN, P., HENRY, C., FERRE, F., DUTERQUE-COQUILLAUD, M., LAGROU, C., GHYSDAEL, J., DEBUIRE, B., STEHELIN, D. and S. SAULE (1986) Transformation of quail embryo fibroblasts by a retrovirus carrying a normal human c-myc gene. *EMBO J.* 5 : 1529-1533.
- MARTIN, R.G. (1981). The transformation of cell growth and trans-modification of DNA synthesis by simian virus 40. *Adv. cen. res.* 34 : 1-68.
- MILLER, D.A., T. CURRAN and I.M. VERMA. (1984) c-fos protein can induce cellular transformation : a novel mechanism of activation of a cellular oncogene. *Cell* 36 : 51-60.
- MIYAMOTO, C., R. CHIZZONITE, R. CROWD, K. RUPPRECHT, R. KRAMER, M. SHABER, G. KUMAR, M. POONIAN and G. JU. (1985). Molecular cloning and regulated expression of the human c-myc gene in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* : comparison of the protein products. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 82 : 7232-7236.
- MONTELL, C., E.F. FISHER, M.H. CARUTHERS and A. BERK. (1984). Complete transformation by adenovirus 2 requires both E1A proteins. *Cell* 36 : 951-961.
- MULLER, R. (1986). Proto-oncogene and differentiation. *TIBS* II : 129-132.
- MULLER, R., R. BRAVO, J. BURCKHARDT and T. CURRAN. (1984). Induction of c-fos gene and protein by growth factors precedes activation of c-myc. *Nature* 312 : 716-720.
- MURRAY, M.J., J.M. CUNNINGHAM, L.F. PARADA, F. DAUTRY, P. LEBOWITZ and R.A. WEINBERG. (1983). The HL-60 transforming sequence : A ras oncogene coexisting with altered myc gene in hematopoietic tumors. *Cell* 33 : 749-757.
- NAU, M.M., B.J. BROOKS, J. BATTEY, E. SAUSVILLE, A.F. GAZDAY, I.R. KIRSCH O.W. Mc BRIDE, V. BERTNESS, G.F. HOLLIS and J.D. MINNA. (1985). L-myc, a new myc related gene amplified and expressed in human small cell lung cancer. *Nature (London)* 318 : 69-73.
- NEEL, B.G., S.C. JHANWAR, R.S.K. CHAGANTI and W.S. HAYWARD. (1982). Two human c-onc genes are located on the long arm of chromosome 8. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79 : 7842-7846.
- NEEL, B.G., W.S. HAYWARD, H.I. ROBINSON, J. FANG and S.M. ASTRIN. (1981). Avian leukosis virus-induced tumors have common proviral integration sites and synthesize discrete new RNAs : Oncogenesis by promoter insertion. *Cell* 23 : 323-334.
- NEIMAN, P.E., C. WOLF, P.J. ENRIETTO and J.M. COOPER. (1985). A retroviral myc gene induces preneoplastic transformation of lymphocytes in a bursal transplantation assay. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82 : 222-226.
- NEIMAN, P.E., L. JORDAN, R.A. WEISS and I.N. PAYNE. (1980). Malignant lymphoma of the bursa of Fabricius : Analysis of early transformation. *Cold Spring Harbor. Conf. Cell Proliferation* 8 : 519-528.

- NISHIKURA, K., A. AR-RUSHDI, J. ERIKSON, R. WATT, G. ROVERA and C. M. CROCE. (1983). Differential expression of the normal and of the translocated c-myc oncogenes in B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80 : 4822-4826.
- OKER-BLOM, N., L. HORTLING, A. KALLIS, E.-L. NURMIAHO and H. WESTERMARK (1978) OK10, an avian retrovirus resembling the acute leukaemia viruses. *J. Gen. Virol.* 40 : 623-633.
- PARKER, R. C., VARMUS, H. E. and J. M. BISHOP (1984) Expression of v-src and chicken c-src in rat cells demonstrates qualitative differences between pp60<sup>v-src</sup> and pp60<sup>c-src</sup>. *Cell* 37 : 131-139.
- PAYNE, G. S., J. M. BISHOP and H. E. VARMUS. (1982). Multiple arrangements of viral DNA and an activated host oncogene in bursal lymphomas. *Nature* 295 : 209-214.
- PERSSON, H., H. E. GRAY, F. GODEAU, S. BRAUNHUT and A. R. BELLVE. (1986). Multiple growth associated nuclear proteins immunoprecipitated by antisera raised against human c-myc peptide antigens. *Mol. Cell. Biol.* 6 : 942-949.
- PERSSON, H., H. E. GRAY and F. GODEAU. (1985). Growth dependent synthesis of c-myc encoded proteins : early stimulation by serum factors in synchronized mouse 3T3 Cells. *Mol. Cell. Biol.* 5 : 2903-2912.
- PERSSON, H. and P. LEDER. (1984a). Nuclear localization and DNA binding properties of a protein expressed by human c-myc oncogene. *Science* 225 : 718-720.
- PERSSON, H., L. HENNIGHAUSEN, R. TAUB, W. DEGRADO and P. LEDER. (1984b). Antibodies to human c-myc oncogene product : Evidence of an evolutionarily conserved protein induced during cell proliferation. *Science.* 225 : 687-693.
- PFEIFER-OHLSSON, S., A. S. GOUSTIN, J. RYDNERT, T. WAHLSTROM, L. BJERSING, D. STEHELIN and R. OHLSSON. (1984). Spatial and temporal pattern of cellular myc oncogene expression in developing human placenta : implications for embryonic cell proliferation. *Cell* 38 : 585-596.
- PIECHACZYK, M., J. Q. YANG, J. M. BLANCHARD, D. JEANTEUR and K. B. MARCU. (1985). Post-transcriptional mechanisms are responsible for accumulation of truncated c-myc RNAs in murine plasma cell tumors. *Cell* 42 : 589-597.
- PLEDGER, W. J., C. D. STILES, H. N. ANTONIADES and C. D. SCHER. (1978). An ordered sequence of events is required before Balb/c 3T3 cells become committed to DNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75 : 2839-2846.
- PRYWES, R., HOAG, J., ROSENBERG, N. and D. BALTIMORE (1985) Protein stabilization explains the gag requirement for transformation of lymphoid cells by Abelson murine leukemia virus. *J. Virol.* 54 : 123-132.
- QUADE, K., SAULE, S., STEHELIN, D., KITCHENER, G. and M. J. HAYMAN (1983) Virus gene expression in rat cells transformed by avian erythroblastosis virus strain MC29 and avian erythroblastosis virus. *J. Gen. Virol.* 64 : 83-94.
- RABBITTS, P. H., J. V. WATSON, A. LAMOND, A. FORSTER, M. A. STINSON, G. EVAN, W. FISCHER, E. ATHERTON, R. SHEPPARD and T. H. RABBITTS. (1985a). Metabolism of c-myc gene products : c-myc mRNA and protein expression in the cell cycle. *EMBO J* 4 : 2009-2015.
- RABBITTS, P. H., A. FORSTER, M. A. STINSON and T. H. RABBITTS (1985b). Truncation of exon 1 from the c-myc gene results in prolonged c-myc mRNA stability. *EMBO J.* 4 : 3727-3733.

- RABBITTS, T.H., P.H.HAMLYN and R.BAER. (1983). Altered nucleotide sequences of a translocated c-myc gene in Burkitt lymphoma. *Nature* 306 : 760-765.
- RALSTON, R. and J.M.BISHOP. (1983). The protein products of the myc and myb oncogenes and adenovirus E1a are structurally related. *Nature* 306 : 803-806.
- RAMSAY, G., G.I.EVAN and J.M.BISHOP. (1984). The protein encoded by the human proto-oncogene c-myc. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81 : 7742-7746.
- RAMSAY, G., M.J.HAYMAN and K.BISTER. (1982). Phosphorylation of specific sites in the gag-myc polyproteins encoded by MC29-type viruses correlates with their transforming ability. *EMBO J.* 1 : 1111-1116.
- RAMSAY, G., T.GRAF and M.J.HAYMAN. (1980). Mutants of avian myelocytomatosis virus MC29 with smaller gag gene-related proteins have an altered transforming ability. *Nature* 288 : 170-172.
- REDDY, E., REYNOLDS, R.K., WATSON, D.K., SCHULTZ, R.A., LAUTENBERGER, J. and T.S.PAPAS (1983) Nucleotide sequence analysis of the proviral genome of avian myelocytomatosis virus MC29. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 80 : 2500-2504.
- REITSMA, P.H., P.G.RATHBERG, S.M.ASTRIN, J.TRIAL, Z.BAR-SHAVIT, A. HALL, S.L.TEITELBAUM and A.J.KAHN. (1983) Regulation of myc gene expression in HL60 leukemia cells by a vitamin D metabolite. *Nature (London)* 306 : 492-494.
- REMAUT, E., STANSSENS, P. and W.FIERS (1981) Plasmid vectors for high-efficiency expression controlled by the PL promoter of coliphage lambda. *Gene* 15 : 81-93.
- REMMERS, E.F., J.YANG and K.B.MARCU. (1986). A negative transcriptional control element located upstream of the murine c-myc gene. *EMBO J.* 5 : 899-904.
- RIGBY, P.W. and D.P.LANE. (1983). Structure and function of simian virus 40 large T-Antigen. In *advances in viral oncology vol 3*, George Klein, ed. (New-York : Raven Press), 31-58.
- ROUSSEL, M., S.SAULE, C.LAGROU, C.ROMMENS, H.BEUG, T.GRAF and D.STEHELIN (1979) Three new types of viral oncogene of cellular origin specific for haematopoietic cell trans formation. *Nature* 281 : 452-455.
- RULEY, H.E., J.F.MOOMAW and K.MARUYAMA. (1984). Avian myelocytomatosis virus myc and adenovirus early region 1A promote the in vitro establishment of cultured primary cells. *Cancer Cells* 2 : 481-486.
- SAITO, H., A.C.HAYDAY, K.WIMAN, W.S.HAYWARD and S.TONEGAWA. (1983). Activation of c-myc gene by translocation : a model for translational control. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80 : 7476-7480.
- SARNOW, P., C.A.SULLIVAN and A.J.LEVINE. (1982). A monoclonal antibody detecting the adenovirus type5 E1B-58 KD tumor antigen in adenovirus infected and transformed cells. *Virology* 120 : 510-517.
- SATO, K., ITO, R., BAEK, K. and K.AGARWAL (1986) A specific DNA sequence controls termination of transcription in the gastrin gene. *Mol.Cell.Biol.* 6 : 1032-1043.
- SAULE, S., J.COLL, M.RIGHI, C.LAGROU, M.B.RAES and D.STEHELIN (1983) Two different types of transcription for the myelocytomatosis viruses MH2 and CMII. *The EMBO J.* 2 : 805-809.

- SAULE,S., A.SERGEANT, G.TORPIER, M.B.RAES, S.PFEIFER and D.STEHELIN (1982) Subgenomic mRNA in OK10 defective leukemia virus transformed cells. *J.Virol.* 42 : 71-82.
- SCHWAB,M., J.ELLISON, M.BUSCH, W.ROSENAV, H.E.VARMUS and J.M. BISHOP. (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. (USA)* 81 : 4940-4944.
- SHALLOWAY,D., COUSSENS,P.M. and P.YACIVK (1984) Overexpression of the c-src protein does not induce transformation of NIH 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 81 : 7071-7075.
- SHANK,P.R. and H.E.VARMUS. (1978). Virus-specific DNA in the cytoplasm of avian sarcoma virus-infected cells is a precursor to covalently closely circular viral DNA in the nucleus. *J.Virol.* 25 : 104-114.
- SHAW,P., B.SORDAT and V.SCHIBLER. (1985). The two promoters of the mouse x-amylase gene Amy-1 are differentially activated during parotid gland differentiation. *Cell* 40 : 907-912.
- SHEINESS,D.,L.FANSHIER and J.M.BISHOP (1978) Identification of nucleotide sequences which may encode the oncogenic capacity of avian retrovirus MC29. *J.Virol.* 28 : 600-610.
- SHERR,C.J., C.W.RETTENMIER, R.SACCA, M.F.ROUSSEL, A.T.LOOK and E.R.STANLEY. (1985). The c-fms proto-oncogene product is related to the receptor for the mononuclear phagocyte growth factor, CSF-1. *Cell* 41 : 665-676.
- SHIH,C., M.LINIAL, M.M.GOODENOW and W.S.HAYWARD. (1984). Nucleotide sequence 5' of the chicken c-myc coding region : localization of a noncoding exon that is absent from myc transcripts in most avian leukosis virus-induced lymphomas. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81 : 4697-4701.
- SIEBENLIST,U., L.HENNIGHAUSEN, J.BATTEY and P.LEDER. (1984). Chromatin structure and protein binding in the putative regulatory region of the c-myc gene in Burkitt lymphoma. *Cell* 37 : 381-391.
- SMELAND,E., T.GODAL, E.RUDD, K.BEISKE, S.FUNDERUD, E.A.CLARK, S.PFEIFER-OHLSSON and R.OHLSSON. (1985). The specific induction of myc protooncogene expression in normal human B cells is not a sufficient event for acquisition of competence to proliferate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82 : 6255-6259.
- SMITH,A.E. and B.K.ELY. (1983). The biochemical basis of transformation by polyoma virus. In *advances in vival oncology*, vol. 3, George Klein, Ed. (New-York : Raven Press), 3-30.
- SOEDA,E., J.ARRAND, N.SMOLAR, J.WALSH and B.GRIFFIN (1980). Coding potential and regulatory signals of the polyoma virus genome. *Nature (London)* 283 : 445-453.
- STANTON,L.W., R.WATT and K.B.MARCU. (1983). Translocation, breakage and truncated transcripts of c-myc oncogene in murine plasmacytomas. *Nature* 303 : 401-406.
- STEHELIN,D., R.V.GUNTAKA, H.E.VARMUS and J.M.BISHOP. (1976a) Purification of DNA complementary to nucleotide sequences required for neoplastic transformation of fibroblasts by avian sarcoma viruses. *J.Mol.Biol.* 101 : 349-365.
- STEHELIN,D., H.E.VARMUS, J.M.BISHOP and P.K.VOGT. (1976b). DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma virus is present in normal avian DNA. *Nature* 260 : 170-173.
- TAUB,R., C.MOULDING, J.BATTEY, W.MURPHY, T.VASICEK, G.M.LENOIR and P.LEDER. (1984a). Activation and somatic mutation of the translocated c-myc gene in Burkitt lymphoma cells. *Cell* 36 : 339-348.

- TAUB,R., K.KELLY, J.BATTEY, S.LATT, G.M.LENOIR, U.TANTRAVAHU, S.TU and P.LEDER. (1984b). A novel alteration in the structure of an activated c-myc gene in a variant t(2;8) Burkitt lymphoma. *Cell* 37 : 511-520.
- TAUB,R., I.KIRSCH, C.MORTON, G.LENOIR, D.SWAN, S.TRONICK, S.AARONSON and P.LEDER. (1982). Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79 : 7837-7841.
- TEMIN,H.M. and S.MIZUTAMI. (1970). RNA directed DNA polymrase in virions of Rous Sarcoma Virus. *Nature* 226 : 1211-1213.
- THOMPSON,C.B., P.B.CHALLONER, P.E.NEIMAN and M.GROUDINE. (1985). Levels of c-myc oncogene mRNA are invariant in the cell cycle. *Nature* 314 : 363-366.
- TREISMAN,R., M.R.GREEN and T.MANIATIS. (1983). cis and trans activation of globin gene transcription in transient assays. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 80 : 7428-7432.
- VARMUS, H. (1984) The molecular genetics of cellular oncogenes. *A. Rev.Genet.* 18 : 553-612.
- VENNSTROM,B., P.KAHN, B.ADKINS, P.ENRIETTO, M.J.HAYMAN, T.GRAF and P.LUCIW. (1984). Transformation of mammalian fibroblasts and macrophages in vitro by a murine retrovirus encoding an avian v-myc oncogene. *EMBO J.* 3 : 3223-3229.
- VERMA,I. (1984). From c-fos to v-fos. *News and Views. Nature (London)* 308 : 317.
- WATSON,O.K., M.C.PSALLIDOPOULOS, K.P.SAMUEL, R.DALLA-FAVERA and T.S.PAPAS. (1983). Nucleotide sequence analysis of human c-myc locus, chicken homologue, and myelocytomatosis virus MC29 transforming gene reveals a highly conserved gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 80 : 3642-3645.
- WATT,R.A., A.R.SHATZMAN and M.ROSENBERG. (1985). Expression and characterization of the human c-myc DNA-binding protein. *Mol. cell. biol.* 5 : 448-456.
- WEINBERG,R.A. (1985) The action of oncogenes in the cytoplasm and nucleus. *Science* 230 : 770-776.
- WESTAWAY,D., G.PAYNE and H.E.VARMUS. (1984). Proviral deletions and oncogene base-substitutions in insertionally mutagenized c-myc alleles may contribute to the progression of avian bursal tumors. *Proc. Natl. Acad.Sci.* 81 : 843-847.
- WIMAN,K.G., CLARKSON,B., HAYDAY,A.C., SAITO,H., TONEGAWA,S. and W.S.HAYWARD (1984) Activation of a translocated c-myc gene : role of structural alteration in the upstream region. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 81 : 6798-6802.
- WINQUIST,R., K.SAKSELA and K.ALITALO. (1984). The myc proteins are not associated with chromatin in mitotic cells. *EMBO J.* 3 : 2947-2950.
- YANCOPOULOS,G.D., P.D.NISEN, A.TESFAYE, N.E.KOHL, M.P.GOLDFARB and F.W.ALT. (1985). N-myc can cooperate with ras to transform normal cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 82 : 5455-5459.
- YANG,J., S.R.BAVER, J.F.MUSHINSKI and K.B.MARCU. (1985). Chromosome translocations clustered 5' of the murine c-myc gene qualitively affect promoter usage : implications for the site of normal c-myc regulation. *EMBO J.* 4 : 1441-1447.

- YEE, S.P., D.T. ROWE, M.L. TREMBLEY, M. McDERMOTT and P.E. BRANTON. (1983). Identification of human adenovirus early region 1 products by using antisera against synthetic peptides corresponding to the predicted carboxy termini. *J. Virol.* 46 : 1003-1013.
- ZULLO, J.N., B.H. COCHRAN, A.S. HUANG and C.D. STILES. (1985). Platelet-derived growth factor and double stranded ribonucleic acids stimulate expression of the same genes in 3T3 cells. *Cell* 43 : 793-800.

**ANNEXE I**

## Annexe du III : MATERIEL ET METHODES

### Abréviations utilisées :

AcONa : Acétate de Sodium.	EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétate
SDS : Sodium Dodécyl Sulfate.	DMSO : DiMéthyl SulfOxide
BET : Bromure d'ETHydium.	U.V. : Ultra Violet
D.O : Densité Optique	cpm : coup par minute
rpm : rotations par minute	P/V : Poids pour Volume
V/V : Volume pour Volume	kbp : kilo base pairs

### I - TECHNIQUES DE CLONAGE UTILISEES POUR L'INSERTION D'UN FRAGMENT D' ADN DANS UN PLASMIDE

#### A - DIGESTION D'ADN PAR LES ENZYMES DE RESTRICTION

L'ADN, à une concentration d'environ 30µg/ml dans le tampon de digestion préconisé par le fabricant, est incubé à 37°C en présence de l'enzyme, à raison de deux unités par µg d'ADN (plasmide ou phage), pendant deux heures.

#### B - ELECTROPHORESE

L'électrophorèse est conduite sous une tension constante de 2 à 3 volts/cm pendant 16 à 20 heures dans un tampon phosphate de sodium 10mM pH6,8. La migration est visualisée sous U.V. (254nm) après coloration du gel dans une solution aqueuse de BET à 20µg/ml.

#### C - ELECTROPHORESE EN GEL PREPARATIF

Tampon d'électrophorèse: TEA 1X préparé à partir de la solution TEA 200X: Tris-HCl 2M pH8,15; NaCl 1M; AcONa 1M; EDTA 50mM.

La migration est suivie aux U.V. (360nm) et, quand elle est suffisante, une "fenêtre" est découpée dans l'agarose sous la bande désirée et on y coule un gel d'agarose (Bio-Rad) à 0,3% (P/V). L'électrophorèse est reprise dans les mêmes conditions que précédemment et quand toute la bande d'ADN a pénétré dans le nouveau gel, elle est découpée, placée dans un tube avec 1ml d'EDTA 10mM et congelée pendant une heure à -70°C, puis décongelée à 37°C. Ce cycle de gel/dégel a pour effet de casser le réseau d'agarose et de libérer l'ADN dans le surnageant; celui-ci est filtré dans une seringue au fond de laquelle on a mis de la laine de verre. L'ADN est précipité à l'éthanol, centrifugé et repris dans de l'eau.

La quantité d'ADN récupérée est évaluée par comparaison avec une gamme étalon, sur un gel d'agarose coulé dans une boîte de Pétri: 3ml d'agarose 0,6% contenant 5µg/ml de BET. 2µl des dilutions d'une gamme étalon de 4 à 100µg/ml d'ADN sont déposés sur le gel et également 2µl de l'échantillon à évaluer; 10mn plus tard la boîte de Pétri est photographiée sous U.V 254nm et l'évaluation est faite suivant la brillance de l'échantillon par rapport à la gamme étalon.

#### D - INSERTION D'UN FRAGMENT D'ADN DANS UN PLASMIDE

Un fragment d'ADN digéré par des enzymes de restriction est inséré par réaction de ligation dans un plasmide, ayant lui-même été ouvert par digestion par des enzymes de restriction générant des sites de ligation compatibles avec ceux du fragment.

Tampon de ligation 1X: obtenu par dilution d'un tampon 10X de composition: Tris-HCl 200mM pH7,9, MgCl<sub>2</sub> 100mM, ATP 1mM, β-mercaptoéthanol 100mM.

La réaction de ligation: le fragment d'ADN à insérer (à une concentration d'environ 30µg/ml dans le tampon de ligation) est mis en présence du plasmide digéré (environ 3µg/ml), de T4 DNA ligase (Boehringer) à raison de 0,05U/µg d'ADN et la réaction s'effectue à +4°C pendant 12h. On vérifie que la réaction a bien eu lieu en faisant

migrer une aliquote sur gel d'agarose, avec le mélange fragment-plasmide comme contrôle.

Le plasmide recombinant désiré est ensuite isolé par intégration dans une bactérie hôte et clonage de celle-ci.

#### E – INTEGRATION DES PRODUITS DE LIGATION DANS LA SOUCHE LE392

Milieu de culture: milieu LB (Luria Broth) bacto-tryptone (Difco) 10g/l, extrait de levure (Difco) 5g/l, NaCl 5g/l, stérilisé par autoclavage à 120°C pendant 45 mn. Avant emploi, ce milieu est complété avec 50ug/ml de thymidine et d'acide diaminopimélique.

Milieu LB gélosé: milieu LB ajusté à 1,2% de bacto-agar (Difco) avant autoclavage.

Centrifugation des bactéries: 7.000 rpm pendant 10mn à +2°C dans un rotor JA21, centrifugeuse J21 Beckman.

##### 1 – Traitement au CaCl<sub>2</sub> de la souche réceptrice LE392:

10 ml de milieu LB sontensemencés par la souche LE392 et la culture à 37°C sous agitation est arrêtée quand elle atteint une D.O de 0,9 à 570nm. A partir de cette étape, les suspensions et les réactifs sont gardés dans de la glace fondante. Les bactéries sont centrifugées et le culot bactérien est repris dans 5 ml de CaCl<sub>2</sub> 0,1M. Cette étape est répétée et la suspension gardée 20mn dans la glace, puis centrifugée. Les bactéries sont resuspendues dans 0,5ml de CaCl<sub>2</sub> 0,1M et elles sont alors compétentes pour la transfection.

##### 2 – Transfection des produits de ligation:

200ul de suspension de bactéries compétentes sont mélangées à 1ug d'ADN (dans 100ul de STE) provenant de la réaction de ligation. Le mélange est placé à 37°C pendant 1mn puis remis dans la glace 1h ; 600ul de milieu LB sont ensuite additionnés et la suspension bactérienne incubée à 37°C pendant 1h.

##### 3 – Sélection des bactéries ayant intégré un plasmide :

Cette sélection se fait par l'antibiotique auquel la bactérie est rendue résistante par l'apport des gènes du plasmide.

Les 900ul d'incubation sont étalés sur une boîte de milieu gélosé contenant l'antibiotique adéquat (carbénicilline 100µg/ml) et incubés à 37°C dans l'étuve jusqu'à apparition des colonies.

#### F – RECHERCHE DE LA COLONIE CONTENANT LE RECOMBINANT DESIRE:

Cette recherche se fait par transfert des colonies sur filtre de nitrocellulose et hybridation avec des sondes marquées au <sup>32</sup>P.

Solution de dénaturation: NaOH 0,5N, NaCl 1,5M.

Tampon de neutralisation: Tris-HCl 0,5M pH7,4, NaCl 1,5M.

Tampons de pré- et d'hybridation: voir hybridation moléculaire des "blots" (I-I -2) et remplacer SSC 3X par 5X.

Solutions de lavage des filtres: voir lavage des "blots" et autoradiographie (I-I-3).

Le transfert s'effectue en déposant le filtre de nitrocellulose (aux dimensions de la boîte) sur les colonies pendant 1mn et des repères sont faits sur la boîte et sur le filtre afin de pouvoir retrouver la colonie positive après autoradiographie des filtres hybridés. Le filtre est déposé (face contenant les colonies dirigée vers le haut) sur un papier Whatman 3M imbibé de solution de dénaturation pendant 5mn, il est ensuite neutralisé pendant 10mn, rincé et cuit à 80°C pendant 2h. La boîte de culture est remise à incuber pour que les colonies amputées repoussent. Après cuisson, les filtres sont préhybridés, hybridés, lavés et séchés. Avant autoradiographie, les repères du filtre sont reportés sur le film. Les colonies positives sont repiquées sur boîte de milieu gélosé, incubées et transférées sur nitrocellulose afin de confirmer les résultats de l'hybridation, ou pour les hybrider avec une autre sonde. Un étalement, par épuisement, de la colonie choisie est ensuite réalisé, afin de choisir un clone bactérien contenant le recombinant. Ce clone est ensuite cultivé en milieu liquide "riche" (LB complété à 1% d'extrait de viande (Liebig)) pour sa conservation à -20°C après ajustement en glycérol 20% (V/V). Il est également cultivé en masse afin de préparer un stock d'ADN du plasmide recombinant qu'il contient.

#### G – PREPARATION DES SONDES D'ADN

Après digestion de l'ADN par les enzymes de restriction, le fragment choisi est isolé par électrophorèse sur gel d'agarose, extrait, purifié (gel préparatif) et marqué au <sup>32</sup>P.

### 1 – Marquage du fragment par translation de coupure

Composition du STE : Tris-HCl, PH:7.1:10mM NaCl:100mM EDTA:1mM .

Le milieu réactionnel utilisé est celui d'un kit commercial : "Nick Translation kit" N5000 (Amersham). Le précurseur radioactif est du dCTP marqué au  $^{32}\text{P}$  en position alpha (NEN, activité spécifique 580 Ci/mole). La cinétique de la réaction est suivie par précipitation d'un aliquote à l'acide perchlorique. Lorsque l'incorporation est maximum, après environ 2h d'incubation à 12°C, la réaction est stoppée par addition de 1 ml de STE, protéinase K à 200µg/ml pendant 10 minutes

### 2 – Séparation de l'ADN marqué et des nucléotides radioactifs libres

Composition du tampon A Tris-HCl-PH:7.1:10mM - EDTA:10mM -NaCl:100mM

Composition du tampon B Tris-HCl-PH:7.1:10mM - EDTA:10mM -NaCl:1M

Utilisation d'élutip : DEAE Cellulose (Schleicher et Schull) Principe: à basse force ionique l'ADN se fixe sur l'élutip alors qu'à haute force ionique il est élué.

L'échantillon est percolé au travers de la colonne "élutip". Ensuite, la colonne est lavée avec 3 ml de tampon-A. L'éluat se fait avec le tampon B (300µl) 50µl de NaOH 6N, 30µl d'ADN entraîneur (400µg/ml) ainsi que du NaCl 3M qsp 500µl sont ajoutés à l'éluat. La neutralisation est réalisée par addition de 30µl d'HCl 6N et de 2,5ml d'H<sub>2</sub>O.

3 – Comptage des Sondes 10ul de la sonde sont ajoutés à 200ul d'une solution d'ADN entraîneur à 400µg/ml et 2ml d'acide perchlorique à 10%. Après 10 minutes l'échantillon est filtré et compté.

## H – PREPARATION D'UN STOCK D'ADN PLASMIDIQUE

### 1 – Culture du clone bactérien

200ml de milieu LB sontensemencés (D.O 0,01 à 570nm) par le clone et incubés sous agitation à 37°C pendant 16 à 20 heures.

### 2 – Extraction de l'ADN plasmidique

Centrifugation de la culture: 15mn à 8.000 rpm, rotor JA10, centrifugeuse J21 Beckman.

Tampon de resuspension: Tris-HCl 50mM pH8, saccharose 25% (P/V).

Solution de lysozyme: Tris-HCl 50mM pH8, lysozyme 10mg/ml, préparée extemporanément.

Solution de lyse: Tris-HCl 50mM pH8, EDTA 25mM pH8, Triton X-100 0,1%.

Les solutions sont refroidies dans la glace avant emploi.

Centrifugation de clarification: 45mn à +4°C, 20.000 rpm, rotor SW50, centrifugeuse L8 Beckman.

Tampon de dialyse: Tris-HCl 10mM pH7,4, EDTA 1mM.

Les bactéries de la culture sont centrifugées (200ml) et le culot repris dans 3ml de tampon de resuspension.

Les étapes suivantes se font dans la glace : addition de 1ml de la solution de lysozyme et agitation douce pendant 5mn, addition de 1ml d'EDTA 200mM pH8 et agitation douce pendant 5mn, addition de 5ml de solution de lyse. La solution de bactéries lysées est ensuite centrifugée (élimination des débris et de l'ADN bactériens) pour clarifier la solution contenant le plasmide. Le surnageant est prélevé, son volume mesuré et 1g de CsCl ainsi que 50µl d'une solution de BET (à 1mg/ml) sont ajoutés par ml. Le plasmide est alors purifié par centrifugation (4h à 18°C, 65.000 rpm, rotor VTI.65, centrifugeuse L8 Beckman), la bande contenant l'ADN, visualisée grâce à la coloration rose due au BET, est récupérée par ponction à la seringue. Le BET est éliminé par extraction par un volume d'isopropanol, et la phase aqueuse (phase inférieure) est ensuite dialysée contre 3 fois 1 litre de tampon TE pendant 2h, afin d'éliminer le CsCl. Le dialysat est récupéré et sa concentration en ADN mesurée par lecture de la D.O à 260nm. L'ADN est conservé à +4°C.

## I – FIXATION DE L'ADN SUR NITROCELLULOSE

Après digestion par les enzymes de restriction, les fragments obtenus sont séparés sur électrophorèse en gel d'agarose, transférés et fixés sur nitrocellulose, puis hybridés (technique du "Southern blot").

### 1 – Transfert et fixation de l'ADN sur nitrocellulose

Tampon de dénaturation: soude 0,5N, NaCl 1,5M.

Tampon de neutralisation: Tris-HCl 0,5N pH7, NaCl 1,5M.

Tampon de transfert: SSC 6X préparé à partir d'une solution SSC 20X composée de citrate trisodique 0,3M, NaCl 3M.

Après électrophorèse et photographie, le gel est mis dans le bain de dénaturation pendant 45mn pour mettre l'ADN sous forme simple brin, ce qui permet sa fixation sur nitrocellulose et l'hybridation avec les sondes. Le gel est

ensuite neutralisé par deux bains de 45mn de tampon de neutralisation (la nitrocellulose étant sensible au pH alcalin). Le transfert s'effectue suivant le dispositif suivant: 2 bandes superposées de papier Whatman 3MM, coupées à la largeur du gel, sont saturées en tampon de transfert et déposées sur la plaque de façon à ce que les deux extrémités des bandes trempent dans le tampon. Le gel est déposé sur ces bandes, arrosé de tampon et recouvert d'une feuille de nitrocellulose. La nitrocellulose est ensuite recouverte d'une feuille de papier Whatman 1M saturée en tampon de transfert et l'ensemble est surmonté d'un bloc de papier filtre qui, en pompant le tampon à travers le gel, crée un flux qui transfère les fragments d'ADN sur la nitrocellulose. Après 10 à 20 heures de transfert, le papier, copie conforme du gel d'origine, est cuit pendant 2 heures à 80°C; le Southern blot ainsi obtenu peut être hybridé.

## 2 - Hybridation moléculaire des "blots"

L'hybridation s'effectue de la même manière pour les "Northern blots" (ARN) et les "Southern blots" (ADN). Une étape de préhybridation est nécessaire pour saturer les sites de fixations des supports avant l'hybridation et éviter ainsi la fixation aspécifique de la sonde.

Tampon d'hybridation: formamide 50%, polyvinylpyrrolidone 0,02%, sérum albumine bovine 0,02%, Ficoll 400 0,02%, Hepes 0,05M pH6,8, SSC 3X, 100µg/ml d'ADN de thymus de veau simple brin préparé en dissolvant de l'ADN (Sigma) dans de l'eau distillée, et en le dénaturant, après sonication, par chauffage à 100°C pendant 10mn.

Les "blots" sont placés dans des sachets en plastique et préhybridés dans du tampon d'hybridation à 41°C pendant 12h. La sonde est ajoutée à raison de 5.105 cpm par "blot" et la réaction d'hybridation s'effectue à 41°C pendant 24 à 48h.

## 3 - Lavage des "blots" et autoradiographie

Après hybridation des "blots", le tampon contenant la sonde est enlevé et conservé à -20°C pour une réutilisation éventuelle. Les "blots" sont ensuite lavés deux fois à 50°C par une solution de premier lavage: SSC 2X, SDS 0,1% et deux fois par une solution de second lavage: SSC 0,1X, SDS 0,1%, chacun des bains durant 20mn. Les "blots" sont ensuite séchés, enveloppés dans du "scello-frais" et mis dans une cassette Kodak en contact d'un film Kodak X-O Mat AR entre deux écrans intensificateurs "Cronex lighthight plus". L'ensemble est placé à -70°C pendant un temps variant entre 24h à 3 semaines puis les films sont révélés.

Les "blots" peuvent être hybridés avec une autre sonde si ils sont déshybridés préalablement avec de la soude 0,1N pendant 15mn à 41°C pour les "Southern blots" (ADN), avec de la formamide 95% pendant 1h à 80°C pour les "Northern blots" (ARN). Ils sont ensuite lavés deux fois par du SSC 0,1 X pendant 50mn à 41°C avant d'être préhybridés puis hybridés.

# II - CONSTRUCTION DES DIFFERENTS VECTEURS D'EXPRESSION

## A - CONSTRUCTION DU VECTEUR D'EXPRESSION PLc24-gag-ex2

Ce vecteur a été obtenu par insertion entre les sites BamHI et HpaI du vecteur d'expression recombinant PLc24 XhoII-Hp d'un fragment BamHI-PvuII issu du plasmide pX<sup>\*</sup>-AHM dont la construction est explicitée dans le schéma 17. Ce plasmide dérive de la construction plasmidique pX-AHM précédemment décrite (schéma 12A). L'ADN plasmidique pX-AHM a été digéré par l'enzyme de restriction XhoI puis les extrémités cohésives simple brin ainsi obtenus ont été transformées en extrémités "franches" (double brin) après action de la polymérase klenow (dérivée de la polymérase I). Ces extrémités franches ont permis l'aboutage en phase de la séquence codante de l'exon 2 au niveau du site EcoR5 pour donner le plasmide pX<sup>\*</sup>-AHM. En outre dans le vecteur d'expression PLc24-gag-ex2 les séquences codantes des gènes MS2 et gag sont aboutées en phase au niveau du site BamHI, ce qui permettra aux ribosomes bactériens de lire dans la même phase les séquences codantes de la polymérase MH2, du gène gag et de l'exon 2 du gène myc humain.

## B - CONSTRUCTION DU VECTEUR D'EXPRESSION PLc24-ex3

Le fragment HaeIII-BclI contenant l'extrémité 3' de l'exon 3 du gène myc humain a été inséré dans un vecteur d'expression recombinant PLc24-Bg (issu du vecteur PLc24).. L'ADN du vecteur PLc24-Bg a été dirigé par l'enzyme de restriction BamHI puis les extrémités cohésives simple brin ainsi obtenus ont été transformées en extrémités "franches" (double brin) après action de la polymérase klenow. L'aboutage en phase des séquences codantes de la polymérase MS2 et de l'exon 3 du gène myc au niveau du site HaeIII a ainsi été obtenu et a donné le vecteur pPLc24-ex3<sup>f</sup> (schéma 18). Cette ligation permet également de recouvrir le site de restriction BamHI. Pour des raisons

non définies, E.Coli tranfectée par ce vecteur ne produit pas de protéine de fusion MS2-myc-exon 3. Nous avons alors placé la partie codante de l'exon 3 dans un autre environnement. Ainsi le fragment BamHI-SacI du vecteur PLc24-ex3<sup>f</sup> a été inséré dans le vecteur d'expression PLc24-gag-ex2 au site BamHI et SacI (schéma 18). Le vecteur PLc24-ex3 ainsi construit permet l'expression de la protéine chimérique bP16<sup>MS2-ex 3</sup>.

### C – CONSTRUCTION DU VECTEUR D'EXPRESSION PLc24-ex1

Le fragment Xho1-Sac1 comprenant l'extrémité 3' de l'exon 1 du gène myc humain a été inséré par ligation dans le vecteur Plc24-S aux sites BamHI-Sac1. Pour que la ligation puisse avoir lieu et pour que la phase de lecture soit conservée entre les phases codantes de la polymérase MS2 et de l'exon 1, les coupures Xho1 et BamHI ont été préalablement transformées en extrémités "franches" (double brin) par la polymérase klenow (schéma 19). L'aboutage en phase des séquences codantes de la polymérase MS2 et de l'exon 1 du gène myc a ainsi été obtenu. Cet aboutage permet de retrouver le site de restriction Xho1.

## III – TECHNIQUES D'ANALYSE DES PROTEINES BACTERIENNES

### A – TRANSFECTION DANS LA SOUCHE NF1

#### 1 – Traitement au CaCl<sub>2</sub> de la souche réceptrice NF1

Technique décrite précédemment : paragraphe I-E-1

#### 2 – Transfection des plasmides recombinants

A 200 µl de suspension de bactéries compétentes est ajouté 1 µg d'ADN, repris dans 100 µl de STE. Le mélange est placé à 28°C pendant 1 mn puis remis dans la glace 1h ; il est ensuite additionné de 600 µl de milieu LB et incubé à 28°C pendant 1h.

#### 3 – Sélection des bactéries ayant intégré un plasmide .

Cette sélection se fait par l'antibiotique auquel la bactérie est rendue résistante par l'apport des gènes du plasmide.

Les 900 µl d'incubation sont étalés sur une boîte de milieu gélosé contenant 100 µg/ml de carbénicilline et incubés à 28°C à l'étuve jusqu'à apparition des colonies. Quelques colonies sont mises en conservation selon la technique décrite précédemment.

### B – INDUCTION

La veille, une préculture est démarrée à 28°C dans 10 ml de milieu LB contenant 100 µg/ml de carbénicilline.

Le jour même, la préculture est diluée au 1/100ème dans 20 ml de milieu LB contenant 100 µg/ml de carbénicilline. Lorsqu'il y a 1 à 2.10<sup>8</sup> bactéries/ml la culture est divisée en 2 lots de 10 ml. Le premier lot est mis à incuber à 28°C, le second à 42°C, sous forte agitation pendant 2 heures. Les cultures sont ensuite placées dans la glace et leur densité optique à 570 nm sont mesurées.

### C – EXTRACTION DES PROTEINES

Un ml de chaque culture est transféré dans un tube Eppendorff et centrifugé pendant 1 minute. Le surnageant est éliminé et le culot est repris dans 50 µl d'eau glacée. A ces 50 µl sont ajoutés 50 µl de la solution (TrisHCl pH 6.8, 50 ml-SDS : 1% - B mercapto-éthanol : 5% - glycérol : 10% - bleu de bromophénol : 0.05%). Les échantillons sont ensuite bouillis pendant 5 minutes puis centrifugés. Les surnageants sont collectés.

La quantité de lysat mise sur gel est normalisée par rapport aux concentrations en bactéries (*i.e.* par rapport aux densités optiques à 570 nm).

## D – COMPOSITION DES GELS

GEL DE SEPARATION	10 %	15 %
Acrylamide-Bisacrylamide 30 : 0.4	13.2 ml	29 ml
Tris 1 M-PH 8.8	15 ml	22.5 ml
H <sub>2</sub> O	11.2 ml	7.6 ml
SDS 10 %	400 µl	600 µl
Persulfate d'ammonium 10 %	200 µl	300 µl
TEMED (N,N,N',N', Tetramethyl- ethylendyamin)	40 µl	60 µl

## GEL DE CONCENTRATION

Acrylamide-Bisacrylamide 30 : 0.8	3 ml	3 ml
Tris 0.5 M-pH 6.8	2.5 ml	2.5 ml
H <sub>2</sub> O	14.2 ml	14.2 ml
SDS 10 %	200 µl	200 µl
Persulfate d'ammonium 10 %	200 µl	200 µl
TEMED	20 µl	20 µl

## E – ELECTROPHORESE

L'électrophorèse a lieu pendant une nuit sous une différence de potentiel de 60 Volts (voltage constant).  
Juste avant le démoulage, la migration est accélérée pendant 30 minutes à 20 milli ampères (ampérage constant).

Composition du tampon d'électrophorèse

Glycine = 28.8 g - Tris = 6.06 g - SDS = 0.10 % final - H<sub>2</sub>O qsp 2 l

## F – COLORATION DES GELS

Composition du mélange colorant

Bleu de Coomassie à 1 % dans un mélange H<sub>2</sub>O, Méthanol, Acide acétique glacial (5:5:1)

Composition du mélange décolorant

H<sub>2</sub>O, Méthanol, Acide Acétique glacial (5V/5V/1V)

Après démoulage le gel est incubé pendant 2 heures dans le mélange fixateur colorant. La coloration non spécifique est éliminée par incubation pendant plusieurs heures dans le mélange décolorant.

IV – PURIFICATION DES PROTEINES DE FUSION ET PREPARATION DES ANTISERA

## A – INDUCTION DE LA SYNTHÈSE DES PROTEINES EXOGENES

La veille, une préculture est démarrée à 28°C dans 15 ml de milieu LB contenant 100 µg/ml de carbénicilline.

Le jour même, la préculture est diluée au 1/100ème dans 500 ml de milieu LB contenant 100 µg/ml de carbénicilline. Lorsque la concentration atteint 1 à 2 10<sup>8</sup> bactéries/ml, la culture est transférée dans un bain thermostaté et maintenue à 42°C, sous forte agitation pendant 3 heures.

## B – PREPARATION DES LYSATS

Composition du TE : Tris HCl pH 7,1 50 mM-EDTA 1mM

La culture est centrifugée à 6000 rpm à 0°C pendant 10 minutes et reprise dans 50 ml de TE. Cette suspension maintenue à 0°C est soniquée quatre fois pendant 10 secondes avec des intervalles de 20 secondes (amplitude de sonication : 28 µm).

Après sonication la suspension est centrifugée à 8000 rpm pendant 10 minutes et le culot resuspendu dans 50 ml de TE contenant 0.5 % de NP40 (L'opération centrifugation-resuspension est réalisée deux fois).

Ensuite, le culot est soumis à deux resuspensions dans 50 ml de TE.

Finalement, la suspension est centrifugée une dernière fois à 8000 rpm et le culot repris dans 6 ml du

tampon suivant : Tris HCl pH 6.8 : 50 ml -SDS : 1 % - B mercaptoéthanol : 5 % -glycérol : 10 % -bleu de bromophénol : 0.05 %.

Après 30 minutes à température ambiante, l'échantillon est bouilli pendant 5 minutes, centrifugé à 6000 rpm pendant 5 minutes et le surnageant déposé sur gel d'acrylamide et soumis à une électrophorèse dans les conditions décrites précédemment.

### C – PURIFICATION DES PROTEINES PAR ELECTROELUTION

La technique suivie est celle de Mendel-Hartvig, *Analytical Biochemistry* 121, 215-217 (1982)

NB- La pureté de la protéine est vérifiée en déposant une aliquote sur un gel de polyacrylamide à 15 % où l'on dépose en même temps une gamme de BSA (Bovine Serum Albumine) ce qui permet une quantification approximative du matériel.

### D – LIAISON A L'ADN DES PROTEINES BACTERIENNES

La technique suivie est celle de Bown *et al.* (1980). Le plasmide utilisé est le recombinant pEK-AHM du gène myc humain présenté dans ce mémoire. L'ADN du recombinant pEK-AHM a été linéarisé par l'enzyme de restriction Xba1 et a été marqué avec du dCTP radioactif (<sup>32</sup>P). Pour le marquage, les extrémités cohésives de l'ADN générées par l'enzyme Xba1 ont été transformées en extrémités "franches" par action de l'enzyme klenow qui est un fragment de la polymérase I. Ainsi en présence de dCTP radioactif les deux extrémités du plasmide pEK-AHM sont marquées.

### E – TECHNIQUES DE PREPARATION DES SERA.

#### 1 – Méthodes d'immunisation

Primo-injection = 400 µg d'Ag en solution dans 1 ml de NaCl 0.9 % sont mélangés avec 1 ml d'adjuvant complet de Freund et une émulsion stable est réalisée. Le mélange est injecté par voie intradermique/sous cutanée en de nombreux points au long de la colonne vertébrale du lapin.

Rappels : 200 µg d'Ag émulsionnés dans de l'adjuvant de Freund incomplet sont injectés par voies sous cutanée/intradermique et intramusculaire.

#### 2 – Prélèvement du sang

Le sang est prélevé et incubé pendant 2 heures à température ambiante, puis le caillot décollé des parois du tube. La rétraction du caillot s'effectue à +4°C pendant 1 nuit. Le sérum est collecté par pipettage et centrifugé à 10.000 g pendant 10 minutes puis congelé et conservé à -20°C.

### V – MARQUAGE METABOLIQUE DES CELLULES

#### A – CELLULES UTILISEES

Les cultures primaires de cellules embryonnaires sont préparées à partir d'embryons de caille japonaise de 10 jours (QEC) ou à partir d'embryons de poulet Spafas de 10 jours (CEC). Les cellules humaines SCLC N417 proviennent d'un carcinome pulmonaire à petites cellules. Dans ces cellules le gène myc est amplifié (50 fois) (Little *et al.*, 1983).

#### B – CULTURE DE CELLULES

Les cellules aviaires sont cultivées à 39°C en atmosphère humide sous 5 % de CO<sub>2</sub> dans le milieu suivant : milieu DULBECCO, bactotryptone (Difco) 5 % (v/v), bicarbonate de sodium 2g/l, serum de veau foetal (Gibco) 10 % (v/v), glutamine (Merck) 1 % (v/v), antibiotiques : gentamycine. Les cellules humaines sont cultivées à 37°C en atmosphère humide sous 5 % de CO<sub>2</sub> dans le milieu RPMI supplémenté un sérum de veau foetal (Gibco) 10 % (v/v) (Moore *et al.*, 1967).

#### C – TRANSFECTION

Principe : Nous utilisons la technique de coprécipitation de l'ADN en présence de phosphate de calcium

décrite par Graham et Van der Eb (1973). Le phosphate de calcium entraîne, en précipitant, l'ADN et l'amène au contact des cellules. La précipitation se fait dans des tubes en propylène (Falcon 2053 : 5 ml). Les pipetmans sont passés à l'alcool et les cônes à l'autoclave.

Composition du milieu de transfection : (pour une boîte de 100). 340 µl d'eau - 30 µl d'ADN transfecté (à 1 mg/ml) - 50 µl d'ADN entraîneur (à 1 mg/ml) - 60 µl de CaCl<sub>2</sub> 2M (stérilisé sur filtre).

Composition du tampon HeBS2X :

(Pour 1 litre) : NaCl : 16 g ; KCl : 0,74 g ; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (12H<sub>2</sub>O) : 0,5 g ; HEPES : 10 g ; D glucose : 2 g ; H<sub>2</sub>O stérile qsp 1 litre. Ajuster à pH : 7,1. Filtrer et autoclaver.

Le milieu de transfection est préparé et laissé pendant 1 à 2 heures à température ambiante. Ensuite 480 µl de tampon HeBS 2X sont ajoutés et laissés en contact pendant 20 mn pour que la précipitation du phosphate de calcium se fasse et entraîne avec lui l'ADN (le précipité doit être très fin, aspect d'une contamination bactérienne, sinon les cellules ne peuvent pas absorber l'ADN).

Le milieu de culture des boîtes est éliminé et le précipité est transfecté sur les cellules. Le contact est réalisé pendant 1 heure à 37°C en agitant les boîtes toutes les 10 minutes. Au bout d'une heure, 10 ml de milieu DULBECCO sont ajoutés par boîte. Après 1 nuit d'incubation le milieu est renouvelé.

## D - MARQUAGE DES CELLULES ET IMMUNOPRECIPITATION

### 1 - Marquage

a - Composition du milieu de marquage (pour une boîte de 100)

3 ml de MEM sans méthionine - 0,15 ml de milieu normal (DULBECCO) - 0,15 ml de sérum de veau foetal dialysé - 150 µCi L-(35 S) méthionine (AS 1000 Ci/mmmole)

b - Tampons utilisés pour l'immunoprécipitation

Composition du TNE :

Tris pH7.4 : 10 mM - NaCl : 150 mM - EDTA : 1 mM

Composition RIPA 1X :

TNE 1X - Triton X 100 à 1 % - Désoxycholate de sodium à 0,5 % - SDS à 0,1 % - Trasylol 1 % (Aprotinin de Sigma)

Les boîtes sont rincées deux fois avec du milieu ne contenant pas de méthionine à raison de 5 ml pendant 1 mn à chaque fois. Le milieu radioactif est ajouté et laissé en contact 45 minutes. Le milieu radioactif est ensuite éliminé et le tapis cellulaire rincé deux fois par du TNE à 4°C. Les protéines cellulaires sont extraites après incubation du tapis cellulaire pendant 5 minutes dans du RIPA 1X. Le lysat est ensuite centrifugé à 100.000 g pendant 1 heure et le surnageant récupéré et conservé à - 70°C.

### 2 - Immunoprécipitation

4 µl de sérum sont ajoutés à 800 µl de surnageant (100.000 g) et laissés en contact pendant 2 heures à + 4°C. Ensuite, 30 µl de protéine A à 50% dans du RIPA 1X sont additionnés et le tout maintenu sous agitation continue pendant 30 mn. L'immunoabsorbant est ensuite lavé 4 fois par resuspensions successives dans du : RIPA 1X (3 fois) - RIPA 1X, TNE (v/v) - TNE.

Après la dernière centrifugation, le culot d'immunoabsorbant est repris dans 60 µl du tampon suivant : Tris HCL pH 6,8 : 50 mM - SDS : 5% - β-mercaptoethanol : 10% - glycérol : 10% - bleu de bromophénol : 0.05% puis bouilli pendant 5 mn, centrifugé et le surnageant déposé sur gel de polyacrylamide et les protéines séparées par électrophorèse.

Après l'électrophorèse, le gel est déposé pendant une heure dans un bain de fixateur suivi de deux bains de 30 minutes dans du DMSO puis d'un bain DMSO/PPO (226g de PPO pour 1 litre de DMSO) d'environ deux heures. L'excès de DMSO/PPO est éliminé sous courant d'eau pendant plusieurs heures. Enfin, le gel est séché puis autoradiographié.

**ANNEXE II**

*Article 1*

## Transformation of quail embryo fibroblasts by a retrovirus carrying a normal human *c-myc* gene

P.Martin, C.Henry<sup>1</sup>, F.Ferre, M.Duterque-Coquillaud<sup>1</sup>, C.Lagrou, J.Ghysdael, B.Debuire<sup>1</sup>, D.Stehelin and S.Saule

Inserm Unite 186/CNRS UA 04 1160, Institut Pasteur, 1 Rue Calmette, 59019 Lille Cédex, and <sup>1</sup>Inserm Unite 124, I.R.C.L., Place de Verdun, 59045 Lille Cédex, France

Communicated by D.Stehelin

We have constructed avian retroviruses expressing the human *c-myc* oncogene. These viruses morphologically transformed primary quail embryo fibroblasts upon transfection and infection. Transformed cells produced viruses harboring a spliced *c-myc* gene and contained high levels of p64-67<sup>c-myc</sup> protein. One of these infectious viruses, vSX-AHM, was molecularly cloned and the nucleotide sequence of the spliced *c-myc* insert determined. No mutation was found within the *c-myc* coding sequence of this transforming clone when compared to the normal genomic progenitor. Thus, we concluded that no mutation within the human *c-myc* gene is required to induce primary avian embryo fibroblast transformation.

**Key words:** human *c-myc* oncogene/quail embryo fibroblasts

### Introduction

Two types of mechanisms, not mutually exclusive, have been shown to be involved in activation of cellular oncogenes (*c-onc*). The first one refers to disorders inducing an overexpression of these genes by insertion of promoter/enhancer sequences (Hayward *et al.*, 1981; Cohen *et al.*, 1983; Fung *et al.*, 1983). The second one is characterized by the presence of mutations within the coding sequence of *c-onc* genes (Santos *et al.*, 1982; Capon *et al.*, 1983; Gambke *et al.*, 1985). These two types of activation are often found together in transforming retroviruses carrying *v-onc* (Santos *et al.*, 1982). The mechanism by which the *c-myc* oncogene is activated remains unclear since: (i) transcriptional activation of *c-myc* by viral promoters/enhancers (Hayward *et al.*, 1981; Payne *et al.*, 1982; Swift *et al.*, 1985) or cellular enhancers (Corcoran *et al.*, 1985) has been reported, but in several cases point mutations were also found within the activated *c-myc* gene (Rabbits *et al.*, 1983, 1984; Westaway *et al.*, 1984; Showe *et al.*, 1985; Battey *et al.*, 1983); (ii) in one case the translocated *c-myc* gene was free of mutations but a *ras* oncogene was activated precluding any conclusions about the transforming role of *v-myc* (Murray *et al.*, 1983; Wiman *et al.*, 1984); and (iii) the *c-myc* sequence from transforming avian retroviruses exhibits several mutations as compared to its normal cellular counterpart (Alitalo *et al.*, 1983; Watson *et al.*, 1983; Kan *et al.*, 1984). To gain some insight on the mode of oncogenic activation of *c-myc* we constructed several recombinant plasmids in which the normal human *c-myc* gene was linked to viral promoters or enhancers. We report here that these recombinants are able to transform primary quail embryo cells as efficiently as a molecular clone of an avian *v-myc* containing provirus and that

the nucleotide sequence of the activated *c-myc* insert was found free of mutations relative to the normal human *c-myc* gene. This suggests that an overexpression of the normal *c-myc* product is sufficient to induce transformation of primary avian embryo cells.

### Results

#### *Strategy of expression of the human c-myc gene in avian cells*

To express the normal human *c-myc* gene in avian cells we used two distinct strategies. First we introduced human *c-myc* into the genome of an avian retrovirus so that the expression of *c-myc* was under the control of, and initiated at, a viral promoter; second, we inserted enhancer sequences (by use of an inverted LTR) in the upstream part of the *c-myc* gene. In that case *c-myc* expression was initiated at *c-myc* promoters.

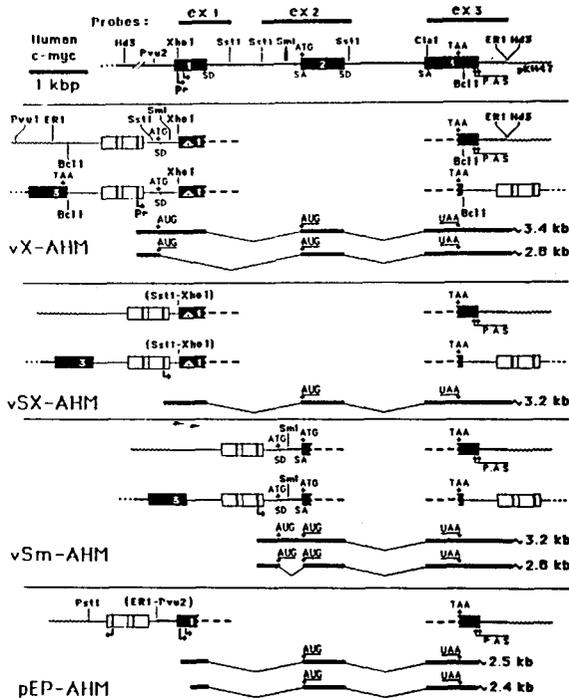
Using a pKH47 vector we constructed four recombinant plasmids containing human *c-myc* sequences linked to viral sequences derived from a molecularly cloned AEV provirus (Vennström *et al.*, 1981).

In three of these recombinants (pX-AHM, pSX-AHM and pSm-AHM) the human *c-myc* gene was under control of a viral promoter. Two of them (pX-AHM and pSX-AHM) contained the *XhoI*–*EcoRI* 7 kbp *c-myc* fragment (Figure 1). In pX-AHM this fragment was linked to the 2.3 kbp *EcoRI*–*XhoI* fragment of AEV proviral DNA which includes the LTRs together with the ATG and splice donor site of the *gag* gene (J.Samarut and J.H.Xhio, unpublished nucleotide sequence data). In pSX-AHM, the *gag* ATG and splice donor site were removed (see Figure 1). Therefore in this case the normal *c-myc* initiation codon was to be used. A third recombinant plasmid (pSm-AHM) was constructed by inserting the AEV-LTR in the first *c-myc* intron; this led to a complete deletion of the first *c-myc* exon (see Figure 1). Expression of the *c-myc* gene from its own promoters was obtained by construction of a fourth recombinant vector pEP-AHM which resulted from the insertion, in an inverted (3' 5') orientation of the AEV-LTR in the upstream part of the *c-myc* promoters (*PvuII* site).

The transforming activity of these recombinant plasmids was assayed by transfection on quail embryo cells (QEC) using the CaPO<sub>4</sub> coprecipitation method (these cells are known to be efficiently transformed upon infection by *v-myc* containing retroviruses or transfection with the corresponding proviral DNAs).

#### *Biological activity of the activated human c-myc gene*

The four *c-myc* recombinants were found to induce transformation of QEC at levels (0.2–0.5 transformants/μg of DNA) similar to those observed for molecular clones of wt MH2 (pMH2-Hd) (Coll *et al.*, 1983) and wt MC29 (pMC 38) (Vennström *et al.*, 1981). No foci were found in QEC transfected with the non-activated human *c-myc* gene. When the pX-AHM, pSX-AHM or pSm-AHM *c-myc* inserts were purified after *BclI* endonuclease digestion [to remove the two cellular polyadenylation sites of the *c-myc* gene (Gazin *et al.*, 1984) and allow the retroviral propagation of *c-myc* RNA] and transfected together

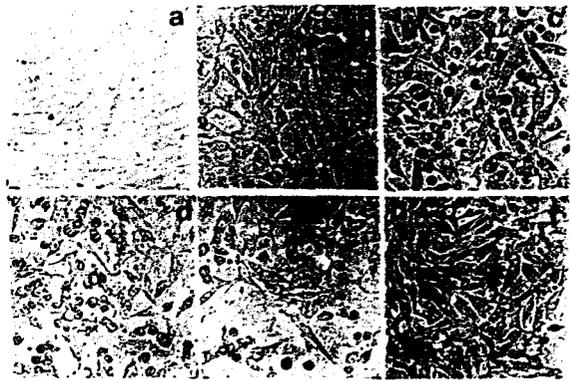


**Fig. 1.** Construction of human *c-myc* recombinants. The restriction map of the human *c-myc* genomic DNA used is depicted on top of the figure. For each human *c-myc* recombinant we successively depicted the structure of the construction (retroviral LTR as an open box) and the structure of the ligated *BclI* insert (except for pEP-AHM) transfected on quail cells and the expected mRNAs. The RNAs for vX-AHM, vSX-AHM and vSm-AHM recombinants (as illustrated by the prefix v) initiate at viral promoters present in the LTR sequences and correspond to spliced RNAs able to be virally propagated; pEP-AHM mRNAs initiate at the *c-myc* promoters. Pr, promoter sequence; —, transcriptional direction; SD, splice donor site; SA, splice acceptor site; P.A.S., polyadenylation site; ■, exon; □, intron; □, LTR, retroviral sequence; ~, pKH 47. ex1 delineates the extent of the probe corresponding to exon 1 (*XhoI*—*SstI*); ex2 (*SstI*—*SstI*) the probe corresponding to exon 2; ex3 (*ClaI*—*EcoRI*) the probe corresponding to the third exon; AUG, AUG in phase with the *c-myc* sequence. (Brackets) in *SstI*—*XhoI* and *EcoRI*—*PvuII* means that the restriction sites were filled-in with DNA polymerase I (Klenow fragment) prior to ligation.

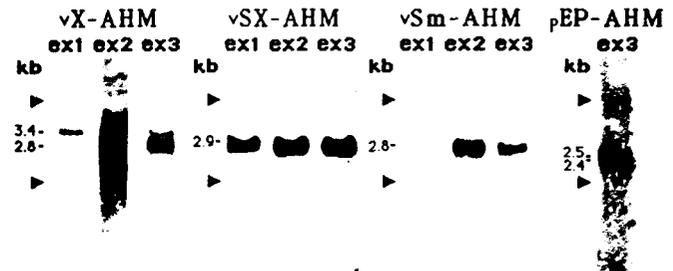
with pRAV1 DNA on QEC, fully transformed cell cultures producing transforming viruses were obtained (Figure 2). As shown in Figure 2C, the morphology of QEC transformed with pEP-AHM was indistinguishable from that of cells transformed with the other recombinants. We concluded from these experiments that primary quail embryo cells can be transformed when the human *c-myc* oncogene is overexpressed (see below).

#### Transcription pattern of the human *c-myc* recombinants

We next characterized the transformed cultures for *c-myc* expression at the RNA level. The QEC used were transformed upon cotransfection with pX-AHM, or pSX-AHM or pSm-AHM purified inserts and pRAV1 DNA. Each transformed cell culture produced a transforming virus named vX-AHM, vSX-AHM and vSm-AHM respectively. QEC transformed by pEP-AHM resulted from a pool of ten transformed foci, picked from transfected cultures and grown up together. Figure 3 represents the autoradiograms of Northern blots hybridized with probes specific for respectively the first, second and third *c-myc* exons. Our results clearly indicate that the spliced *myc* RNAs predicted in Figure 1 for each recombinant on the basis of nucleotide sequence data (Gazin *et al.*, 1984) are found in cells transformed by these recombinants. vX-AHM transformed cells synthesized a 3.4 kb



**Fig. 2.** Transforming ability of recombinant *c-myc* constructs. Quail embryo cell cultures were transformed as described in Materials and methods. a, normal QEC; b, QEC transformed upon cotransfection with pMC38 (*v-myc*) and pRAV1; c, d, e, QEC transformed upon cotransfection with pRAV1 and respectively X-AHM, SX-AHM and Sm-AHM *BclI* inserts; f, QEC transformed upon transfection with pEP-AHM DNA (magnification  $\times 200$ ).



**Fig. 3.** Size of *myc* transcripts in quail embryo cells transformed by human *c-myc* recombinants. Poly A<sup>+</sup> containing RNA was denatured, separated on agarose gel and transferred to nitrocellulose as described (Coll *et al.*, 1983). Blots were hybridized with the <sup>32</sup>P nick translated probes described in Figure 1 and indicated on top of each lane. The transforming viruses or DNA are indicated on top of the figure. ▶, Ribosomal RNA markers.

genomic RNA hybridizing with the three *myc* probes and a major subgenomic RNA (2.8 kb) lacking exon 1 and probably generated by the splicing events (described in Figure 1) joining the splice donor site of the *gag* sequence to the splice acceptor site of exon 2. In cells transformed by vSX-AHM, deletion of the splice donor site of the viral *gag* gene resulted in the synthesis of a single 2.9 kb genomic RNA hybridizing with the three *myc* probes. This RNA was smaller in size than the expected one (3.2 kb; see Figure 1). Nucleotide sequence analysis of the cloned SX-AHM proviral DNA showed that a deletion of 300 nucleotides occurred in the remaining AEV *env* sequence presumably during the transfection process (see Figure 5). In cells transformed by vSm-AHM we only detected a 2.8 kb RNA hybridizing with the *myc* exon 2 and exon 3 probes (Figure 3). This suggests that in these cells the propagated transforming RNA was the spliced transcript of the vSm-AHM predicted in Figure 1. The pool of cells transformed upon transfection with pEP-AHM DNA synthesized the expected doublet of 2.4–2.5 kb mRNAs starting at the *c-myc* promoters located in exon 1 and deduced from S1 mapping experiments (data not shown).

#### Proteins synthesized by the human *c-myc* recombinants

We determined whether cells transformed by our *c-myc* recombinants synthesized the previously described p64/67<sup>c-myc</sup> proteins (Hann and Eisenman, 1984). Extracts of [<sup>35</sup>S]methionine labelled cells were immunoprecipitated with a rabbit anti-*myc* serum.

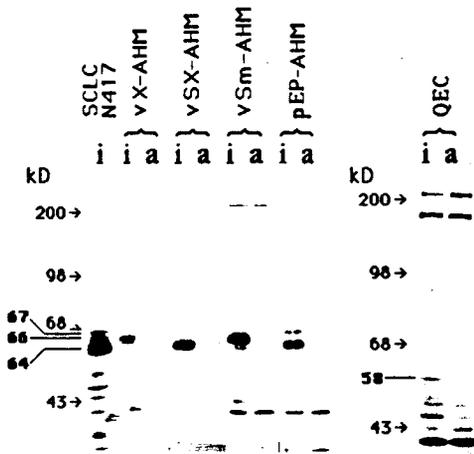


Fig. 4. Immunoprecipitation of human *myc* proteins in QEC transformed by *c-myc* recombinant. Labelling was performed on semi-confluent cultures seeded in 100-mm Petri dishes and described in Materials and methods. Transforming viruses or DNA are indicated on top of the figure. As a control the *c-myc* product in human cell line SCLC N-417 and in QEC were immunoprecipitated in similar conditions. —, Standard molecular weight markers from BRL Inc. are listed on left of the figure.

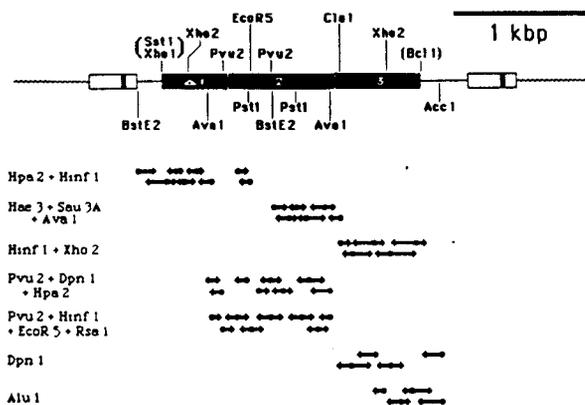


Fig. 5. Restriction map and strategy of sequencing of the *c-myc* insert of vSX-AHM provirus. The restriction sites relevant in the provirus are indicated. Gel purified restriction fragments used for DNA sequencing (restriction enzymes in the left-hand column) were labelled at their 5' termini using [ $^{32}$ P] $\gamma$  ATP and polynucleotide kinase and sequenced according to the Maxam and Gilbert procedure. Closed circles indicate the cleavage points inside of each insert and horizontal arrows the direction and length of the sequenced DNA strands.

As shown in Figure 4, vSX-AHM and pEP-AHM transformed cells synthesized a p64/67 doublet similar to that previously described in the control SCLC N 417 human cells (Hann and Eisenman, 1984). In vX-AHM and vSm-AHM transformed cells, a 66 kd protein was observed. This difference in size can be explained by the fact that these cells synthesize a *c-myc* containing mRNA which can promote translation of a p66 protein initiated at the *gag* AUG instead of the *c-myc* AUG (Figure 1). In addition, Figure 4 shows immunoprecipitation of the endogenous QEC *c-myc* protein in similar conditions. A single faint band of 58 kd previously described by Hann *et al.* (1983) is detected.

#### Nucleotide sequence analysis of the *c-myc* insert of SX-AHM provirus

We next examined whether mutations in the *c-myc* part of the provirus had been selected for during the selection procedure.

Southern blot experiments demonstrated that only one type of provirus was present in the vSX-AHM (RAV1) transformed QEC. We molecularly cloned this provirus and its transforming activity was confirmed by transfection on QEC and found similar to that of MC29 proviral DNA. Figure 5 shows the restriction map of the cloned provirus and the strategy used to determine its nucleotide sequence by the Maxam and Gilbert procedure (1980). Comparison of this sequence with that of the normal genomic *c-myc* gene (Gazin *et al.*, 1984) indicated that no mutation had occurred within the *c-myc* coding sequence during the propagation of this virus.

#### Discussion

The studies described above were aimed at determining whether mutations were required for the acquisition of oncogenic properties by the human *c-myc* gene. Among the *myc* alleles available, only *v-myc* genes in retroviral genomes exhibit a readily observed, single-step oncogenic effect in cell culture. This may be due either to the presence of mutations in the *v-myc* alleles (Papavas and Lautenberger, 1985) or to the overexpression of this gene by retroviral promoters or to the peculiar reaction of tested biological systems towards the *myc* product. For example, expression of *v-myc* in rat fibroblasts induces a subtle although detectable transformed phenotype measured by immortalization of these cells (Mougnéau *et al.*, 1984). However, introduction of *v-myc* into a murine retrovirus leads to a recombinant able to transform rodent fibroblasts and macrophages *in vitro* (Vennström *et al.*, 1984). In another system *v-myc* induces preneoplastic transformation of avian lymphocytes in a bursal transplantation assay (Neiman *et al.*, 1985) whereas it transforms fibroblasts and macrophages of the same origin (Graf and Stehelin, 1982). Thus, it appears difficult to appreciate the respective part of transcriptional activation, somatic mutation and the biological system used in the transforming potential of the *myc* product.

A biological assay described by Land *et al.* (1983) for *c-myc* oncogene transformation requires conditions in which a second oncogene is present. This type of assay allowed Lee *et al.* (1985) to show that augmented expression of the normal human *c-myc* gene was sufficient for cotransformation of rat embryo cells with an activated *ras* gene. Our results clearly support the idea that in appropriate biological systems an overexpression of the normal *c-myc* gene is sufficient to induce cellular transformation since we did not find any mutation in the *c-myc* coding sequence isolated from avian fibroblasts transformed by the vSm-AHM recombinant retrovirus described in this paper.

Two sets of proteins are synthesized by these recombinant retroviruses: the normal *myc* doublet p64-67 found in SX-AHM and pEP-AHM transformed cells probably initiates at the *c-myc* AUG because these recombinants do not contain any *gag* sequence. The second type of *myc* protein, the p66 protein found in vX-AHM and vSm-AHM transformed cells is probably translated from the *gag* AUG, first AUG codon in phase with the *myc* gene sequence in these viruses. As a result, the p66 protein probably has six *gag* derived amino acids at its amino terminus; this could explain the difference in molecular weight between the two species, p64 and p66. Therefore, as the p66 protein and the p64-67 doublet exhibit the same oncogenic properties, the six amino acids derived from the *gag* gene in p66 presumably do not play an important role in fibroblast transformation. Similar results have been obtained by Shaw *et al.*, (1985) with deletion mutants of MC29 confirming that *gag* sequences are not required for fibroblast transformation by *v-* or *c-myc*.

Tumorigenesis *in vivo* is a more complex process than transformation of a cultured cell *in vitro* and it is likely that diverse alterations of *c-myc* can confer a growth advantage to cells *in vivo*. Thus we injected vSX-AHM with RAV1 helper viruses into chick embryos. Preliminary data revealed that this virus induces endotheliomas and solid tumors in the chicken (F.Dieterlein, personal communication). In summary, our results demonstrate that an overexpression of the human *c-myc* gene product is sufficient to induce avian primary embryo cell transformation and tumor formation.

## Materials and methods

### Construction of human *c-myc* recombinants

The human genomic *c-myc* clone used was isolated from a normal human DNA library as described and sequenced by Gazin *et al.* (1984). Construction of human *c-myc* recombinants was made as follows. A 2.4 kbp *PvuI*-*XhoI* fragment, including the 3' part of the *Amp* gene of pKH 47 (Hayashi, 1980) the end of the *env* gene, two functional LTRs and the beginning of the *gag* gene (with the splice donor sequence) of a cloned AEV provirus (pAEV 11, Vennström *et al.*, 1980) was purified by agarose gel electrophoresis. This fragment was introduced into p *c-myc* (pKH47 containing the 12 kbp *EcoRI* *c-myc* fragment) by ligation in the *PvuI* (plasmidial)-*XhoI* (*c-myc*) sites of this plasmid. This generated the plasmid named pX-AHM. The nomenclature used to refer to the recombinant molecules is p for plasmid, v for virus, followed by the initial of the endonuclease used to generate the recombinant (when two enzymes are used, the first refers to the restriction site of the retroviral sequence, the second refers to the restriction sites of the *c-myc* sequence): AHM refers to activated human *myc*. The pSX-AHM DNA was derived from the pX-AHM DNA by removing the *SstI*-*XhoI* *gag*-*myc* junction fragment. The following procedure was used: the pX-AHM DNA was digested with *SstI* endonuclease and treated with DNA polymerase I, large fragment (Klenow polymerase). The same amount of this plasmid was digested with *XhoI* endonuclease and similarly treated with Klenow polymerase. These two DNAs were then digested with *HindIII* endonuclease (located in the plasmid) and the large *SstI*-*HindIII* fragment and the small *XhoI*-*HindIII* fragment were purified and ligated to generate pSX-AHM DNA. pSm-AHM was generated by deletion of the small *SmaI*-*SmaI* insert *gag*-*myc* exon 1 fragment of pX-AHM. pEP-AHM was obtained in four steps, and detailed strategy is available upon request. This recombinant plasmid contained an inverted (3' 5') AEV-LTR inserted in the *PvuII* site located upstream from *c-myc* exon 1.

### Transfection procedure

Primary cultures of quail embryo cells (QEC) were prepared from 10-day-old Japanese quail embryos; 2 days later the cells were passaged, and  $10^6$  cells were seeded onto 60-mm Petri dishes in Dulbecco's modified Eagles's medium (DMEM) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS). Transfections were carried out as described by Graham and Van der Eb (1973) using 30  $\mu$ g of purified *BclI* insert of *c-myc* recombinant and 5  $\mu$ g of pRAV1 plasmid DNA (a gift from J.M.Bishop). In experiments without helper pRAV1 DNA, we used 30  $\mu$ g of plasmid DNA. After 16 h, the transfected cells were seeded in two 100-mm Petri dishes and propagated until complete transformation. Transformed foci which appeared in transfection experiment without pRAV1 DNA were picked, pooled when necessary and grown up in DMEM 10% FCS.

### Nucleic acid analysis

Total cellular RNA was extracted and fractionated on oligo (dT)-cellulose. Polyadenylated fractions were denatured by glyoxal treatment, submitted to electrophoresis in 1% agarose gels and transferred to nitrocellulose. Blots were hybridized to [ $^{32}$ P]DNA, washed and subjected to autoradiography at  $-70^{\circ}\text{C}$  as previously described (Coll *et al.*, 1983).

### Cloned DNA probes

DNA fragments for the preparation of  $^{32}\text{P}$  probes were obtained from suitable recombinant plasmids by endonuclease digestion and agarose gel purification. Human *c-myc* probes corresponding to exon 1 (*XhoI*-*SstI* fragment), exon 2 (*SstI*-*SstI* fragment) and exon 3 (*Clal*-*EcoRI* fragment) are depicted on top of Figure 1.

### Cloning procedures

QEC infected with virus produced from QEC cotransfected with pSX-AHM and pRAV1 DNAs were used as source of DNA, and a partial *EcoRI* gene library was prepared in Charon 4A vector, as reported (Coll *et al.*, 1983). Subcloning of the SX-AHM provirus was performed in the *EcoRI* site of pKH 47 (Hayashi, 1980).

### Protein labelling and immunoprecipitation

Labelling was performed on semi-confluent cultures seeded in 100-mm Petri dishes

by incubation of the cells in 3 ml Modified Eagle Medium lacking methionine and 0.20 mCi [ $^{35}\text{S}$ ]methionine for 45 min. These cells were lysed in 3 ml of 0.1% SDS, 1% Triton, 0.5% deoxycholate and 1% trasytol, Tris-HCl 10 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM buffer (RIPA) and clarified at 100 000 g for 1 h. 0.25 ml of the supernatant was then incubated for 3 h at  $4^{\circ}\text{C}$  with 5  $\mu$ l rabbit antiserum prepared with a bacterially expressed polypeptide corresponding to the carboxy terminal part of the human *c-myc* protein (Martin *et al.*, 1986). 10 mg of protein A sepharose beads were added to each sample for 3 h at  $4^{\circ}\text{C}$ . Beads were washed in RIPA buffer, then in a buffer containing Tris-HCl 10 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM. Radioactivity was recovered from beads by boiling for 5 min in electrophoresis loading buffer (1% SDS, 5% mercaptoethanol, 10% glycerol, 50 mM Tris-HCl pH 6.8) and loaded onto 10% acrylamide gels, followed by fluorography of the dried gel (Martin *et al.*, 1986).

### Nucleotide sequencing of SX-AHM *c-myc* insert

Plasmid DNA containing the SX-AHM molecularly cloned provirus was digested with restriction endonuclease (see Figure 5). Fragments were recovered from a 1% agarose gel and subjected to nucleotide sequencing by the Maxam and Gilbert procedure (Maxam and Gilbert, 1980). The fragments were dephosphorylated and labelled with [ $^{32}\text{P}$ ]ATP and polynucleotide kinase as described (Herrisse *et al.*, 1980). To separate the two labelled strands, fragments were denatured at  $92^{\circ}\text{C}$  in 30% dimethylsulfoxide and fractionated in a polyacrylamide gel. 5' labelled single-stranded fragments were recovered from the gel and subjected to chemical degradation with reagents specific for G, AG, CT, C and AC.

## Acknowledgements

We thank A.Begue and M.Benaissa for excellent technical assistance, B.Vandenbunder for helpful discussions, N.Devassine for patient typing and M.B.Raes for help in the manuscript preparation. This work was supported by grants from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, C.R.L. 822020, Centre National de la Recherche Scientifique, Institut Pasteur de Lille, Institut de Recherches sur le Cancer de Lille and the Association pour la Recherche sur le Cancer and Fondation contre la Leucémie (Fondation de France). C.H. is a fellow of the Ligue Nationale Française contre le Cancer and P.M. is a fellow of Association de la Recherche contre le Cancer.

## References

- Alitalo, K., Bishop, J.M., Smith, D.H., Chen, E.Y., Colby, W.W. and Levinson, D. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 100-104.
- Batley, J., Moulding, C., Taub, R., Murphy, W., Stewart, T., Potter, H., Lenoir, G. and Leder, P. (1983) *Cell*, **34**, 779-787.
- Capon, D.J., Seeburg, P.H., McGroth, J.P., Hayplick, J.S., Edman, V., Levinson, A.D. and Goeddel, D.V. (1983) *Nature*, **304**, 507-513.
- Cohen, J.B., Unger, T., Recham, G., Canaani, E. and Givol, D. (1983) *Nature*, **306**, 797-799.
- Coll, J., Righi, M., de Taisne, C., Dissous, C., Gégonne, A. and Stehelin, D. (1983) *EMBO J.*, **2**, 2189-2194.
- Corcoran, L.M., Cary, S. and Adams, J.M. (1985) *Cell*, **40**, 71-79.
- Fung, Y.K.T., Lewis, W.G., Crittenden, L.B. and Kung, H.J. (1983) *Cell*, **33**, 357-368.
- Gambke, C., Hall, A. and Moroni, C. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **82**, 879-882.
- Gazin, C., Dupont de Dinechin, S., Hampe, A., Masson, J.M., Martin, P., Stehelin, D. and Galibert, F. (1984) *EMBO J.*, **3**, 383-387.
- Graf, T. and Stehelin, D. (1982) *Biochim. Biophys. Acta*, **651**, 245-271.
- Graham, F.L. and Van der Eb, J. (1973) *Virology*, **52**, 456-461.
- Hann, S.R., Abrams, H.D., Rohrschneider, L.R. and Eisenman, R.N. (1983) *Cell*, **34**, 789-798.
- Hann, S.R. and Eisenman, R.N. (1984) *Mol. Cell. Biol.*, **4**, 2486-2497.
- Hayashi, K. (1980) *Gene*, **11**, 109-115.
- Hayward, W.S., Neel, B.G. and Astrin, S.M. (1981) *Nature*, **290**, 475-480.
- Herrisse, J., Courtois, G. and Galibert, F. (1980) *Nucleic Acids Res.*, **8**, 2173-2191.
- Kan, N.C., Flordellis, C.S., Mark, G.E., Duesberg, P.H. and Papas, T.S. (1984) *Science*, **223**, 813-816.
- Land, H., Parada, L.F. and Weinberg, R.A. (1983) *Nature*, **304**, 596-601.
- Lee, W.M.F., Schwab, M., Westaway, D. and Varmus, H.E. (1985) *Mol. Cell. Biol.*, **5**, 3345-3356.
- Martin, P., Henry, C., Ferre, F., Bechade, C., Calothy, C., Debuire, B., Stehelin, D. and Saule, S. (1986) *J. Virol.*, **57**, 1191-1194.
- Maxam, A.M. and Gilbert, W. (1980) *Methods Enzymol.*, **65**, 499-560.
- Mougeon, E., Lemieux, M., Rassoulzadegan, M. and Cuzin, F. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 5758-5762.
- Murray, M.K., Cunningham, J.M., Parada, L.F., Dautry, F., Lebowitz, P. and Weinberg, R.A. (1983) *Cell*, **33**, 749-757.
- Neiman, P., Wolf, C., Enrietto, P.J. and Cooper, G.M. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 222-226.
- Papas, T.S. and Lautenberger, J.A. (1985) *Nature*, **318**, 237.

Transformation of quail embryo fibroblasts by normal human *c-myc*

- Payne, G.S., Bishop, J.M. and Varmus, H.E. (1982) *Nature*, **295**, 209–213.
- Rabbits, T.H., Hamlyn, P.H. and Baer, R. (1983) *Nature*, **306**, 760–765.
- Rabbits, T.H., Forster, A., Hamlyn, P. and Baer, R. (1984) *Nature*, **309**, 592–597.
- Santos, E., Tronick, S., Aaronson, S., Palciani, S. and Barbacid, M. (1982) *Nature*, **298**, 343–347.
- Shaw, J., Hayman, M.J. and Enrietto, P.J. (1985) *J. Virol.*, **56**, 943–950.
- Showe, L.C., Ballantine, M., Nishikura, K., Erikson, J., Kaji, H. and Croce, C.M. (1985) *Mol. Cell. Biol.*, **5**, 501–509.
- Swift, R.A., Shaller, E., Witter, R.L. and Kung, H.J. (1985) *J. Virol.*, **54**, 869–872.
- Vennstrom, B., Fanshier, L., Moscovici, C. and Bishop, J.M. (1980) *J. Virol.*, **36**, 575–585.
- Vennstrom, B., Moscovici, C., Goodman, H.M. and Bishop, J.M. (1981) *J. Virol.*, **39**, 625–631.
- Vennstrom, B., Kahn, P., Adkins, B., Enrietto, P., Hayman, J.M., Graf, T. and Luciw, P. (1984) *EMBO J.*, **3**, 3223–3229.
- Watson, D.K., Premkumar-Reddy, E., Duesberg, P.H. and Papas, T.S. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 2146–2150.
- Westaway, D., Payne, G. and Varmus, H.E. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 843–847.
- Wiman, G.K., Clarkson, B., Hayday, A.C., Saito, H., Tonegawa, S. and Hayward, W.S. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 6798–6802.

Received on 13 March 1986; revised on 29 April 1986

*Article 2*

(soumis au C.R.A.S.)

**BIOLOGIE MOLECULAIRE** : Préparation et caractérisation d'antisera spécifiques dirigés contre différents domaines polypeptidiques codés par l'oncogène c-myc humain pour étudier l'expression de ce gène introduit dans des cellules de caille ou de rat : François FERRE, Patrick MARTIN, Agnès BEGUE, Jacques GHYSDAEL, Simon SAULE et Dominique STEHELIN, note présentée par le professeur TUBIANA.

En utilisant des vecteurs d'expression bactériens, nous avons préparé des anticorps dirigés contre deux domaines polypeptidiques codés respectivement par des séquences de l'exon 2 et de l'exon 3 du protooncogène myc humain. Ces anticorps détectant de manière spécifique le doublet de protéines myc humaines p64/p67, nous avons pu analyser l'expression du gène c-myc humain activé par des séquences rétrovirales et introduit dans des cellules embryonnaires de caille (QEC) et/ou dans une lignée continue de fibroblastes embryonnaires de rat (208 F). Bien que des ARN myc humain soient exprimés dans les deux types de cellules, le doublet de protéines myc humaines p64/p67 n'est détecté que dans les QEC.

**MOLECULAR BIOLOGY** : preparation and characterization of specific antisera directed against different polypeptidic domains encoded by the human c-myc oncogene to analyse the expression of this gene introduced into quail or rat cells.

By using bacterial expression vectors, we have prepared antisera directed against two polypeptidic domains encoded by exons 2 and 3 of the human c-myc oncogene. these antisera which detect specifically the human c-myc proteins allow us to analyse the expression of human c-myc gene activated by retroviral sequences and introduced in quail embryo cells (QEC) or in established rat embryo fibroblastic cell line (208F). Although human myc mRNA are expressed in the two cell types, the p64/p67 human c-myc proteins are only detected in the QEC.

## INTRODUCTION

L'oncogène c-myc est l'équivalent cellulaire du gène v-myc des virus de la myélocytomatose aviaire (1). Le gène c-myc est constitué de trois exons dont seuls les deux derniers codent pour la protéine transformante. Le pouvoir transformant de l'oncogène c-myc a été étudié in vitro par transfection dans des cellules d'origine aviaire ou mammifère. Il ressort de ces études que le produit du gène myc humain normal, comme celui de l'oncogène v-myc, transforme les cellules embryonnaires de caille (QEC) mais non les fibroblastes embryonnaires normaux de rat (FER) (2,3). Par ailleurs, des travaux antérieurs ont montré que le virus MC29 contenant l'oncogène v-myc peut transformer des fibroblastes embryonnaires de rat établis en lignée (208F) (4). Nous avons donc testé si le gène c-myc humain normal placé sous le contrôle des séquences activatrices et promotrices du LTR d'un rétrovirus aviaire (AEV) était capable de transformer les cellules 208F. Dans ce but, l'ADN d'un plasmide recombinant contenant un gène myc humain activé, pP-AHM, a été transfecté dans les 208F. Nos résultats montrent que le clone pP-AHM ne transforme pas les 208F alors qu'il transforme les QEC. Aussi, nous nous sommes demandés s'il existait une différence d'expression du clone moléculaire pP-AHM introduit dans ces deux types de cellules. Pour sélectionner des cellules 208F contenant le plasmide recombinant pP-AHM, nous avons co-transfecté ce dernier avec de l'ADN d'un clone moléculaire de l'oncogène ras EJ (5) capables de transformer ces cellules. Nous avons analysé l'expression des produits du recombinant pP-AHM dans les QEC ou les 208F aux niveaux des ARN et des protéines. L'analyse des protéines a été réalisée à l'aide d'anticorps anti myc spécifiques. Ces anticorps ont été obtenus chez le lapin à partir de polypeptides codés respectivement par des séquences de l'exon 2 et l'exon 3 du gène c-myc humain et exprimés à l'aide d'un vecteur d'expression dans E.Coli. Les ARN myc humain codés par le recombinant pP-AHM sont exprimés qualitativement de manière différente dans les QEC et 208F. En outre, le doublet de protéines myc humaines p64/p67 n'a été mis en évidence que dans les QEC.

## MATERIELS ET METHODES

- Pour obtenir l'expression de fragments d'ADN de l'oncogène c-myc dans E.Coli, nous avons utilisé des vecteurs dérivés du vecteur d'expression pPLC24 décrit par Remaut et al. (6).
- Pour construire les plasmides recombinants pX-AHM et pP-AHM nous avons placé en 5' d'un gène c-myc normal, les séquences du LTR et du début du gène gag du virus AEV (l'aboutement se fait respectivement entre des sites de restriction XhoI ou PstI du gène gag et du gène myc).
- L'expression des protéines exogènes dans E.coli se fait à 42C car à cette température le répresseur thermosensible du promoteur du phage lambda est inactif (7). Les polypeptides sont purifiés et injectés dans un lapin pour obtenir des anticorps (7).
- Les cultures primaires de QEC préparées à partir d'embryons de 10 jours ainsi que les cellules 208F sont transfectées avec 30 µg d'ADN du recombinant pP-AHM selon des techniques déjà décrites (2). Les foyers de cellules transformées sont isolés et cultivés dans un milieu DMEM (Dulbecco modified Eagle medium) supplémenté par 10 % de serum de veau foetal (SVF).
- Pour le marquage des protéines, les cellules sont incubées pendant 30 minutes avec 250 µCi/ml de L(<sup>35</sup>S) cystéine dans un milieu minimum de Eagle (MEM) sans cystéine et complémenté par 5 % de serum de veau dialysé. Le protocole pour l'immunoprécipitation a été décrit précédemment (7).

## RESULTATS ET DISCUSSION

Afin d'obtenir des anticorps dirigés contre les protéines myc humaines, des lapins ont été immunisés avec des polypeptides codés par une partie de l'exon 2 (acides aminés 49 à 99) ou codés par les 50 derniers codons de l'exon 3 du gène c-myc (figure 1). La séquence codante de l'extrémité 3' de l'exon 3 a été insérée directement en phase dans la séquence codante de la polymérase du phage MS2 tandis que la séquence codante de l'exon 2 a été tout d'abord raboutée avec la séquence codante du gène gag du virus AEV, elles-même placée en phase avec celle du phage MS2 (figure 1). Les protéines chimériques MS2-ex3 et MS2-gag-ex2 sont exprimées dans E.Coli sous forme de polypeptides de fusion respectivement de 16 000 et 19 000 daltons (bP19MS2-gag-ex2 et bP16MS2-ex3, figure 2, canaux 2 et 3 (42)). Ces polypeptides purifiés (Figure 2, canaux 2 et 3 (42\*)) et injectés à des lapins ont permis l'obtention des sera anti myc exon 3 et anti myc exon 2. Nous avons étudié la spécificité de ces deux antisera en analysant les protéines myc synthétisées dans la lignée des cellules humaines SCLC N417 qui contiennent des

taux élevés de protéines c-myc (8). Dans ces cellules marquées à la cystéine  $^{35}\text{S}$ , les antisera anti myc exon 2 et anti myc exon 3 immunoprécipitent spécifiquement deux protéines de poids moléculaire 64 kd et 67 kd (Figure 3B, canaux 1 et 3) semblables à celles décrites par Hann et Eisenman (8) alors que ces antisera épuisés par incubation avec un excès de leurs antigènes bactériens respectifs ne reconnaissent plus ces deux protéines (Figure 3B, canaux 2 et 4). Ces résultats montrent que les deux antisera, anti-myc exon 2 et anti-myc exon 3, sont capables d'immunoprécipiter les protéines myc humaines. Disposant d'anticorps spécifiques, nous avons entrepris l'analyse de l'expression de protéines myc humaines dans des cellules aviaires (QEC) et des cellules de mammifères (208 F) dans lesquelles un recombinant du gène myc humain, pP-AHM, a été introduit par transfection. Les 208F n'étant pas transformées après transfection du plasmide pP-AHM seul, nous avons cotransfecté en excès (10 fois) ce recombinant avec l'ADN du clone moléculaire transformant EJ ras.

Nous avons analysé le contenu en ARN et en protéines codées par le recombinant pP-AHM dans les QEC et 208F transformées. Deux types d'ARN myc humain peuvent être exprimés par le recombinant pP-AHM intégré:

- Un ARN de 3.4 kb, initié dans le promoteur viral, qui hybride avec une sonde de l'exon 3 (figure 3A) ainsi qu'avec des sondes du LTR et des exons 1 et 2 (résultats non présentés). Cet ARN s'exprime dans les QEC et 208F.

- Deux ARN de 2.4-2.5 kb qui n'hybrident plus qu'avec les sondes d'exons (exon 3, figure 3A ; exons 1 et 2, résultats non présentés). Ces ARN s'expriment dans les QEC. Des expériences de cartographie à la nucléase S1 ont montré que ces deux ARN 2.4-2.5 kb s'initient sur les promoteurs normaux du gène c-myc humain (résultats non présentés). Par contre, des ARN initiés sur les promoteurs myc humain ne semblent pas s'exprimer dans les 208F. En effet, plusieurs données convergent pour indiquer que les ARN myc de 2.2-2.3 kb synthétisés dans les 208F sont les ARN myc endogènes de rat : (i) Ces ARN sont présents en quantités similaires dans les 208F, transformées par l'oncogène ras EJ, contenant ou ne contenant pas le recombinant pP-AHM (résultats non présentés). (ii) Les expériences de cartographie à la nucléase S1 visant à montrer l'initiation des ARN 2.2-2.3 kb sur les promoteurs humains ont donné des résultats négatifs. (iii) Enfin, les protéines myc humaines sont détectées dans les QEC mais pas dans les 208F (figure 3B).

Ces résultats amènent deux types de conclusions. Premièrement, les séquences activatrices du LTR aviaire stimulent les promoteurs du gène myc humain dans les QEC mais pas dans les 208F. Des expériences antérieures ont déjà montré la spécificité d'hôte de certaines séquences activatrices, comme celles du virus SV40 (9). Cependant, dans les 208F, il semblerait que les séquences activatrices du LTR restent capables de stimuler le promoteur viral proximal du LTR

pour donner l'ARN de 3.4 kb mais ne sont plus capables d'activer les promoteurs distaux du gène myc humains. Deuxièmement, dans les 208F, l'ARN de 3.4 kb initié dans le LTR ne permet pas la synthèse des protéines myc humaines. Une des explications possibles à ce résultat négatif serait que la machinerie ribosomale soit bloquée en amont des séquences codantes pour les protéines myc. Or, précisément, en 5' de l'AUG initiateur des protéines myc se trouve le cadre de lecture ouvert de l'exon 1 (10). Aussi il est possible que ce cadre de lecture bloque les ribosomes et empêche ainsi la synthèse des protéines myc. En outre, le fait que l'ARN de 3.4 kb ne permette pas la synthèse des protéines myc suggère que l'ARN myc de 3.2 kb qui s'initie en 5' de l'exon 1 dans différentes cellules humaines (11) pourrait également ne pas coder pour les protéines myc. Si cette dernière proposition se révèle être exacte, il sera intéressant d'étudier le rôle du cadre de lecture ouvert de l'exon 1.

## BIBLIOGRAPHIE

- O1 - T.Graf and D.Stehelin. *B.B.A* (1982) 651 : 245-271
- O2 - P.Martin, C.Henry, M.Duterque-Coquillaud, C.Lagrou, J.Ghysdael, B.Debuire, D.Stehelin and S.Saule. *EMBO J* (1986) in press
- O3 - W.M.F.Lee, M.Schwab, D.Westaway and H.Varmus. *Mol. Cel. Biol.* (1985) 5 : 3345-3356
- O4 - K.Quade, S.Saule, D.Stehelin, G.Kitchener and M.J.Hayman. *J.Gen. Virol.* (1983) 64 : 83-94
- O5 - C.Shih and R.A.Weinberg. *Cell* (1982) 29 : 161-169
- O6 - E.Remaut, H.Tsao and W.Fiers. *Gene* (1983) 22 : 103-113
- O7 - J.Ghysdael, A.Gegonne, P.Pognonec, D.Dernis, D.Leprince and D.Stehelin. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* (1986) 83 : 1714-1718
- O8 - S.R.Hann and R.N.Eisenman. *Mol. Cel. Biol.* (1984) 4 : 2486-2497
- O9 - Pour revue: G.Khoury and P.Gruss. *Cell* (1983) 33: 313-314
- O10 - C.Gazin, S.Dupont de Dinechin, A.Hampe, J.M.Masson, P.Martin, D.Stehelin and F.Galibert. *EMBO J.* (1984) 3 : 383-387
- O11 - D.L.Bentley and M.Groudine. *Nature* (1986) 321: 702-706

**Figure 1 :**

Schéma décrivant les constructions de vecteurs utilisés pour préparer deux antisera spécifiques de différents domaines du gène c-myc humain.

exon ; intron ; LTR et séquences retrovirales ; séquences codantes du gène gag ; pKH47 ; séquences de la polymérase MS2 ; promoteur du phage ; \* : site traité par la polymérase Klenow. Le vecteur pPLc24-ex3 n'exprime pas la protéine bP16 pour des raisons indéterminées. (Ba : BamHI ; Bc : Bcl1 ; Bg : Bgl2 ; E5 : EcoRV ; H : HaeIII ; Hp : Hpa1 ; P : Pvu2 ; S : Sac1 ; X : XhoI).

**Figure 2 :**

Expression des polypeptides c-myc dans E.Coli. Les polypeptides sont séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de 10 % de SDS et visualisés par coloration au Bleu de Coomassie : (1) pPLc24 parental (28 ou 42°C), (2) expression de bP19MS2-gag-ex2 (28 ou 42°C ; polypeptide purifié, 42\*), (3) expression de bP16MS2-gag-ex3 (28 ou 42°C ; polypeptide purifié, 42\*).

**Figure 3 :**

(A) Structure du recombinant pP-AHM et analyse des ARN myc synthétisés dans des QEC ou 208F transfectées avec l'ADN de la construction pP-AHM. Pr, séquence promotrice ; SD, site donneur d'épissure ; SA, site accepteur d'épissure. La sonde exon 3 utilisée correspond au fragment Cla1-EcoR1.

(B) Analyse des protéines myc par immunoprécipitation dans les différentes cellules. Les antisera utilisés sont les suivants : (1) anti myc ex2, (3) anti myc ex3, (2-4) sera anti myc ex2 et anti myc ex3 épuisés contre leurs polypeptides bactériens respectifs.

**Figure 1 :**

Schematic outline describing the constructions of vectors used to prepare two antisera to different domains of the human c-myc gene.

exon ; intron ; LTR and retroviral sequences ; coding séquences of the gag gene ; pKH47 ; MS2 polymerase sequences ; phage promoter ; \* : site processed by the Klenow polymerase. The pPLc24-ex3 vector do not express the bP16 protein for some undetermined reasons. (Ba : BamHI ; Bc : Bcl1 ; Bg : Bgl2 ; E5 : EcoRV ; H : HaeIII ; Hp : Hpa1 ; P : Pvu2 ; S : Sac1 ; X : XhoI).

**Figure 2 :**

Expression of c-myc polypeptides in E.Coli. The polypeptides are separated by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gel and visualized by staining with Coomassie brilliant blue : (1) pPLc24 (28 ou 42°C), (2) bP19MS2-gag-ex2 expression (28 ou 42°C ; purified polypeptide, 42\*), (3) bP16MS2-gag-ex3 expression (28 ou 42°C ; purified polypeptide, 42\*).

**Figure 3 :**

(A) Structure of the pP-AHM recombinant and analysis of myc mRNA synthesized in QEC or 208F transfected by pP-AHM recombinant. Pr, promotor ; SD, splice donor ; SA, splice acceptor. The exon 3 probe used is the Cla1-EcoR1 fragment.

(B) myc proteins analysis by immunoprecipitation in différent cells. The sera used are as followed : (1) anti myc ex2, (3) anti myc ex3, (2-4) anti myc ex2 et anti myc ex3 sera blocked by preincubation with an excess of their bacterially expressed polypeptides.

Toute correspondance doit être adressée à F.FERRE : Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, INSERM UNITE 186 - CNRS UA041160, INSTITUT PASTEUR - 1 RUE CALMETTE 59019 LILLE Cedex.

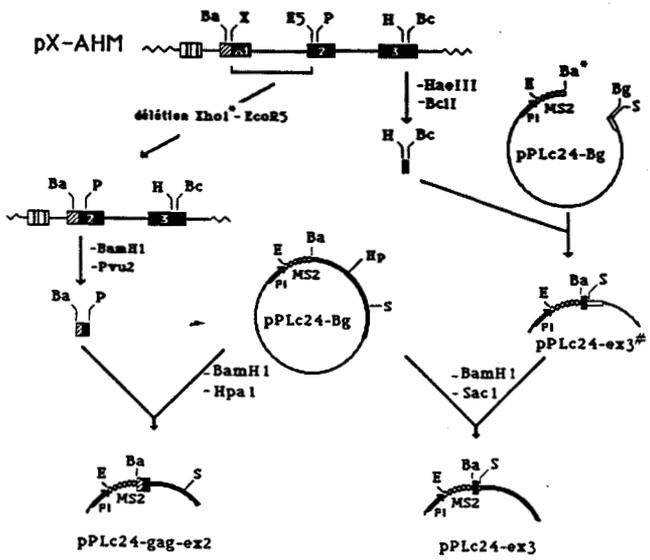


Figure 1

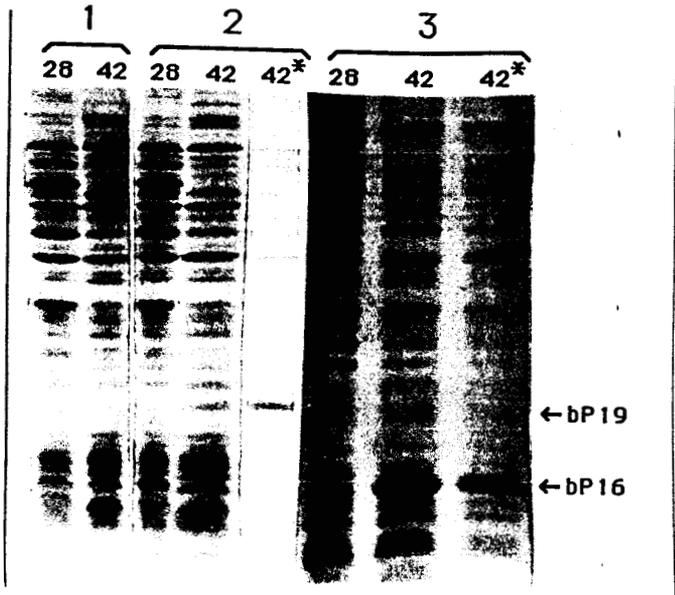


Figure 2

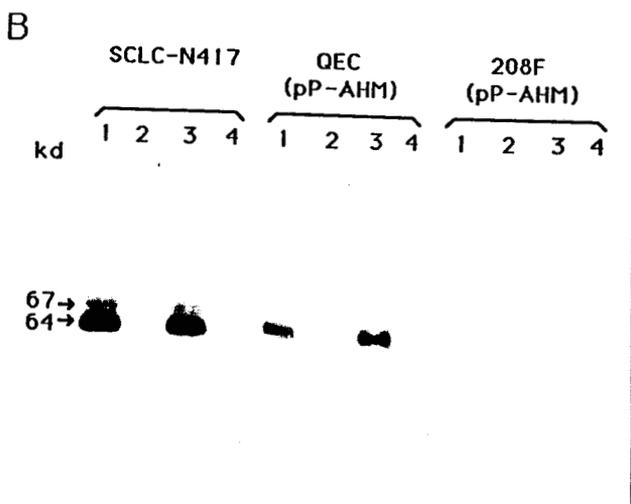
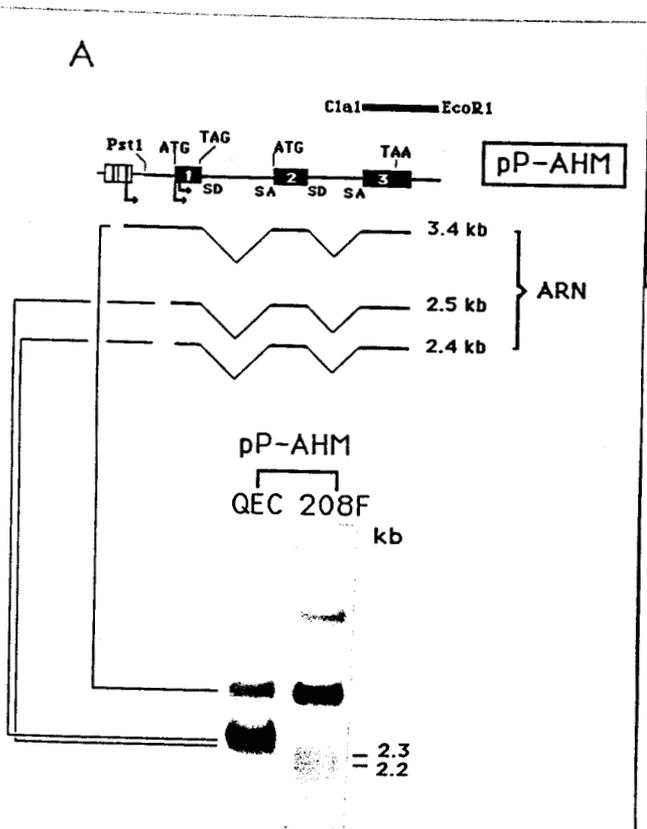


Figure 3



*Article 3*

(soumis à l'EMBO J.)

THE HUMAN c-myc EXON 1 PRODUCT : PREPARATION OF ANTISERA AND ANALYSES  
OF ITS EXPRESSION

F.FERRE, P.MARTIN, C.LAGROU, M.B.RAES, J.GHYSDAEL, S.SAULE and D.STEHELIN

INSERM UNITE 186/CNRS UA 04 1160 - INSTITUT PASTEUR - 1 Rue Calmette - 59019  
LILLE Cédex - FRANCE

## ABSTRACT

We investigated the coding capacity of the previously reported open reading frame (ORF) of the human c-myc exon 1. By *in vitro* translation assay, we found that exon 1 ORF was translated into a p20 protein. In order to obtain antisera raised against the p20 protein, we constructed a plasmid vector which expressed most of the exon 1 ORF as a P25 protein in *Escherichia coli*. This bacterially expressed exon 1 protein (P25) has the ability to bind DNA *in vitro*. Polyclonal antisera raised against this P25 protein specifically precipitated a chimeric protein which contains exon 1 related amino acid sequences. We used these antisera to test for the existence of an exon 1 product in human cells. In the human cell lines tested, these antisera failed to detect any exon 1 related proteins. However, an exon 1 protein was detected with the anti-p20 antisera in quail embryonic cells (QEC) transfected by human c-myc recombinants constructed to express such a protein, but it is expressed at low levels compared with the human c-myc protein also expressed in the transfected QEC. Our results suggest that secondary structure of the mRNA could be responsible for the low expression of the exon 1 product in QEC.

## INTRODUCTION

Altered expression of the c-myc gene appears to be an important event in malignant cell transformation. The c-myc gene can be activated by different mechanisms in a wide range of tumours (for review, see Varmus, 1984). It has also been suggested that the expression of the c-myc gene may regulate normal cell proliferation (Kelly *et al.*, 1983). Recent studies have revealed the complexity in the normal c-myc regulation. The chicken, murine and human c-myc genes contain three exons of which only exons 2 and 3 encode the c-myc protein (Dalla-Favera *et al.*, 1982). The coding sequences of the c-myc gene of these species are highly conserved.

In contrast, the sequence of the exon 1 is less conserved which could reflect important variations in the mechanism of normal c-myc regulation between species. Indeed, two promoter sites have been described in mammalian c-myc exon 1 sequences (Saito *et al.*, 1983) while only one promoter site seems to be present in the chicken exon 1 sequences (Linial and Groudine, 1985). Since the use of the two promoters could be different in normal and transformed cells (Taub *et al.*, 1984a), it has been suggested that the choice of the promoters could be an important event in normal c-myc gene regulation thereby adding to the complexity of regulation of mammalian c-myc gene. In addition, there is a 600 bp open reading frame (ORF) preceded upstream by all the required canonical sequences for its expression in the human c-myc exon 1 (Gazin *et al.*, 1984) which is not present in the c-myc locus of mouse or chicken. It is therefore tempting to hypothesize that the human exon 1 ORF product, if it exists, could play a specific role in the normal human c-myc regulation.

In order to test this hypothesis we analysed the coding capacity of the exon 1 ORF of human c-myc gene. In this paper, we report that this ORF can be translated into a 20kd protein in rabbit reticulocyte lysate translation system. To prepare antisera raised against the exon 1 product, we constructed a bacterial expression vector that allows the synthesis of a P25 fusion protein in *E.coli* between phage MS2 polymerase and the amino acid sequence of most of the exon 1 ORF. As it has been described for the myc protein (Watt *et al.*, 1985), this P25 protein is able to bind DNA *in vitro*. Although antisera against the bacterially expressed P25 protein recognized a chimeric protein containing p20 determinants, they failed to detect any exon 1 product in human cells. However, the exon 1 protein can be detected in QEC transfected by human c-myc clones but at low levels despite the presence of a large amounts of mRNA able to synthesize the exon 1 product. Our results seem to indicate that the secondary structure of the myc mRNA may be responsible for the low expression of the exon 1 product in avian cells.

## RESULTS

### *In vitro* expression of the product of human c-myc exon 1 ORF.

To demonstrate that the predicted open reading frame of human exon 1 c-myc gene (Gazin *et al.*, 1984) can encode a protein, we studied the *in vitro* translational ability of its mRNA. An expression vector, pSP64-ex1, was constructed by inserting a Sma1-EcoR1 fragment containing the entire exon 1 sequence of the Human c-myc gene into pSP64 vector (fig 1). As a control, we constructed an expression vector, pSP64-gag-ex1, in which the ATG of the exon 1 ORF was replaced by the ATG of the gag-p19 protein of the avian erythroblastosis virus, AEV (fig 1). Translation of the RNA derived from these vectors is expected to result in the synthesis of 20 kd and 22.5 kd proteins, respectively. After *in vitro* transcription, the capped transcripts derived from pSP64-ex1 and pSP64-gag-ex1 vectors were translated in rabbit reticulocyte lysates and the (<sup>35</sup>S) cysteine labelled translation products were analysed by SDS/PAGE gel electrophoresis. As shown in figure 1, translation of the pSP64-ex1 and pSP64-gag-ex1 resulted, as expected, in the synthesis of products of 20 kd and 22.5 kd, respectively (figure 1, lanes 1 and 3). However, the levels of synthesis of these proteins appear to be low since they represent only a small percentage compared with the synthesis by endogenous globin mRNA.

### Expression of human c-myc exon 1 sequence in bacteria.

In order to study the synthesis of putative exon 1 derived protein in human cells, antisera were produced against an exon 1 protein synthesized in bacteria. A Xho1-Sac1 fragment (nucleotides 2397-3267 of c-myc sequence (Gazin *et al.*, 1984)) containing most of the exon 1 coding sequence was inserted between the BamH1 and Sac1 sites of an expression vector derived from pPLc24-S (fig 2), which contains the thermoinducible P1 promoter from phage 1. In the resultant plasmid (pPLc24-ex1), the coding sequence for 158 amino acids from exon 1 are fused in frame with the coding sequence for 99 amino acids of the phage MS2 polymerase (figure 2-A). Upon temperature induction, bacterial cells synthesize large amounts of a protein with an apparent molecular weight of 25 kd (bP25<sup>MS2-ex1</sup>) (figure 2-B, lane 2).

### DNA-binding properties of bP25MS2-ex1 protein.

The large amount of protein synthesized in *E.coli* allowed us to test if the exon 1 product, as reported for c-myc protein (Watt *et al.*, 1985), could bind to DNA *in vitro*. We used the method of Bowen *et al.* (1980) to examine the ability of the bP25<sup>MS2-ex1</sup> protein to bind DNA. Total cell lysates from bacteria carrying pPlc24-ex1 was resolved by SDS/PAGE and transferred onto nitrocellulose sheet. Incubation of this western blot with 32P end labelled DNA fragments demonstrates that the bP25<sup>MS2-ex1</sup> protein binds to DNA (fig 2B, lane 6). Furthermore, the fact that another *E.coli* expressed protein, which contains the 99 amino acids of the MS2 sequences, does not bind DNA (fig2B, lane 8) suggests that the DNA-binding property of the bP25<sup>MS2-ex1</sup> is carried by the exon 1 encoded amino acids.

### Characterization of anti-p20 antisera

Antisera directed against the exon 1 encoded protein were obtained by immunizing rabbits with SDS/PAGE purified bP25<sup>MS2-ex1</sup> (anti-ex1 sera). To test the reactivity and the specificity of these antisera, we constructed a recombinant p-gag-EX1-myc-src which can express a gag-Ex1-myc chimeric protein with a calculated molecular weight of about 60 kd. In this recombinant, most of the exon 2 and 3 coding sequences of a human c-myc cDNA clone were inserted in-frame in a previously described gag-ex1 sequence (fig3). To select avian cells transfected by this recombinant, the src gene was added because of its ability to transform avian cells. We therefore placed the src gene in 3' of the gag-Ex1-myc sequences so that it was expressed from a subgenomic mRNA (figure 3). Avian cells transfected by this recombinant were selected by their transformed phenotype and grown up in mass culture. Extracts of <sup>35</sup>S cysteine labelled cells were precipitated with anti-ex1 serum, an anti-myc-ex3 serum (Ferre F., in preparation) and an anti-p19-gag serum (a generous gift of Claude Dissous). As shown in Figure 3, these three antisera are able to immunoprecipitate similar amounts of the gag-Ex1-myc chimeric proteins of 75 kd. The chimeric protein migrates on SDS-polyacrylamide gels with a much larger molecular weight than predicted by its coding capacity (60 kd), as do myc proteins (Hann and Eisenman, 1984).

### Detection of P20 related proteins in human cells

We looked for the synthesis of the exon 1 product in various human cell lines such as HL60 promyelocytic cells and K562 erythroid cells which express myc mRNA initiated upstream of the

exon 1 ORF (Bentley and Groudine, 1986) and which may synthesize the p20 protein. We also analysed Burkitt lymphoma JBL2 cells in which transcription of a duplicated c-myc exon 1 has been reported to give a 6.6 kb c-myc mRNA (Taub *et al.*, 1984b). In this mRNA, the second exon 1 could be translated while the first exon 1 may be used as a leader sequence. Cells were labelled 30 minutes with <sup>35</sup>S cysteine and extracts precipitated with rabbit anti-p20 and anti-myc sera. While the *bona fide* c-myc proteins were detected by the anti-myc serum (data not shown), no exon 1 related proteins were detected by the anti p20 sera in these cells. Furthermore, the anti p20 sera failed to detect any p20 protein in these human cells by immunoblotting experiments (data not shown).

#### Expression of human c-myc exon 1 sequence in quail embryonic cells

We investigated the expression of the exon 1 ORF associated with other c-myc exons in a cellular context. We have previously reported (Martin *et al.*, 1986) that different human c-myc recombinants are able to transform primary QEC. We used this property to select transformed cells containing c-myc recombinants constructed to express the exon 1 as well as the c-myc p64-67 products. In order to analyse the expression of the exon 1 ORF in QEC, three human c-myc recombinants were constructed.

Using recombinant, pEK-AHM, we studied if the potential promoter located upstream from the exon 1 ATG (Gazin *et al.*, 1984) could be enhanced thereby initiating the synthesis of a mRNA able to code for the p20 protein. For this purpose, we used LTR sequences which were previously shown to be able to enhance the normal c-myc promoters (Martin *et al.*, 1986). In pEK-AHM, the LTR sequences of the AEV virus were inserted in an inverted 5' " 3' orientation at the Kpn1 site of the human c-myc gene (Figure 4-A). In QEC cells transfected and transformed by this recombinant, normal c-myc 2.4-2.5 kb mRNAs are synthesized (figure 4-A, lane a). However, we failed to detect any mRNA (3.0 kb) expected to be initiated upstream the exon 1 ATG. Thus it appears that the potential promoter or the promoter described by Bentley and Groudine (1986) which were located upstream of the exon 1 ATG cannot be enhanced by LTR sequences.

Using a second recombinant, pEP-PS-AHM, we analysed whether the expression of the exon 1 ORF could be obtained when inserted downstream from the functional promoter and leader sequences of the human c-myc gene. The pEP-PS-AHM recombinant was obtained by a duplication of the first exon in a previously described construction pEP-AHM (Martin *et al.*, 1986) (Figure 4-B ). In this construct, the splice donor site of the first exon 1 was removed to allow expression of mRNA containing a duplication of exon 1 sequences (figure 4-B). Two sets of myc mRNA are expected to be synthesized in cells transfected in such a construct : the first set of c-myc

mRNA (2.9-3.0 kb) could be translated into the p20 protein while the second set of c-myc mRNA (2.4-2.5 kb) could be translated into the c-myc proteins. QEC transfected by pEP-PS-AHM gave rise to transformed foci which were picked and grown up into mass culture. In these cells, two sets of mRNAs were detected by northern analysis after hybridization to c-myc exon 3 probe (Figure 4-B, lane b) or exon 1 (data not shown). Lysates analyses of cells labelled for 30 minutes in the presence of  $^{35}\text{S}$  cysteine resulted in the detection of the p64/p67 myc protein but failed to detect the p20 protein. To exclude the possibility that this result is due to an instability of the exon 1 product, we investigated the existence of the p20 protein in short-time labelling experiments. Extracts of 5 min ( $^{35}\text{S}$ ) cysteine labelled cells were immunoprecipitated with rabbit anti-myc and anti-p20 antisera. pEP-PS-AHM transformed cells synthesized the p64/67 doublet of human c-myc proteins similar to that previously described (Martin *et al.*, 1986) and a 20 kd protein specifically precipitated with rabbit anti p20 serums (figure 4-B, lanes 4 and 1, respectively) while the same serum adsorbed against the bP25<sup>MS2-ex1</sup> protein failed to detect this protein (figure 4-B, lane 2). Furthermore, in pEK-AHM transformed QEC in which exon 1 coding mRNA was not detected, the 20 kd protein is absent (Figure 4-A, lane 1) while the myc proteins were detected (figure 4-A, lane 4). These results show that the exon 1 ORF in expression vector synthesizes a 20 kd protein at a very low level in QEC. The fact that in 30 min labelling experiments the exon 1 product cannot be detected and in extracts of 5 min labelled cells the p20 antisera specifically precipitate a 12 kd polypeptide which could therefore represent a product of degradation of the p20 protein (figure 4-B, lane 1) suggests that the p20 protein is very labile and this could explain its low level in QEC.

Using the third recombinant, pBX-AHM, we studied the expression of the exon 1 ORF sequence placed downstream of promoter and leader sequences and ATG of viral origin. In this recombinant, the gag-ex1 ORF previously described is placed 3' of the AEV LTR in order to obtain the normal leader sequence of the gag gene. This construction can also express the c-myc protein in QEC transformed upon transfection. A genomic mRNA of 3.2 kb which could synthesize the P22.5 gag-exon 1 fusion protein was transcribed in these cells at a ratio similar to the 2.4 kb mRNA which could synthesize the myc proteins (figure 4-C, lane c). The genomic mRNA was detected with exon 3 probe (figure 4-C, lane c) or exon 1 probe (data not shown). Extracts of 5 min ( $^{35}\text{S}$ ) cysteine labelled pBX-AHM transformed cells were immunoprecipitated with anti p20 and anti p19 antisera. As shown in Figure 4-C, lanes 1 and 3, pBX-AHM transformed cells synthesized the expected 22.5 kd protein specifically immunoprecipitated with these two sera. The p64/p67 proteins are detected at higher levels than the p22.5 protein. Thus the comparison between the mRNA and protein data for the c-myc and p22.5 proteins indicate that the p22.5 protein is expressed at low levels. We also compared the half-life of the p22.5 and p64/p67 myc proteins. pBX-AHM transformed cells were 5 min ( $^{35}\text{S}$ ) cysteine pulse labelled and then chased with cold

cysteine. At the indicated times, lysates were immunoprecipitated with anti-p20 or anti-myc serum. The data show that the half life of the P22.5 and c-myc proteins are both less than 20 minutes (figure 5). These results indicate that the difference between gag-exon 1 and c-myc protein levels was not the result of a difference in their stability. Furthermore, since the ratio of gag-ex1 to c-myc mRNA did not explain the low amount of gag-ex1 product, this suggests that the genomic mRNA is translated with a very low efficiency.

In parallel experiments, we looked for the presence of the exon 1 product in 5 min (<sup>35</sup>S) cysteine labelled human cells. Under these new conditions, again the p20 protein was not detected in these cells.

## DISCUSSION

In this paper, we show that the exon 1 ORF is translated *in vitro* into a 20 kd protein. This result confirms the sequence data of Gazin *et al* (1984). To determine whether the p20 exon 1 product can be detected in human cells, we prepared antisera against a bacterially expressed exon 1 product. These antisera have been tested for their specificity and reactivity on a chimeric protein containing 50 amino acids of the AEV virus p19 gag protein, 158 amino acids of the p20 protein and 341 amino acids of the human c-myc protein. In experimental conditions, the p20 antiserum precipitates the chimeric protein as well as anti-p19 or anti -myc antisera.

Using the anti-p20 sera, we tested the existence of the exon 1 product in human promyelocytic cells (HL60) and in human erythroid cells (K562) in which the presence of myc mRNA of 3.2 kb able to synthesize the exon 1 product has been reported (Bentley and Groudine, 1986). We also looked for the existence of this p20 protein in a Burkitt lymphoma cell line, JBL2, which expresses high levels of myc mRNA (Taub *et al.*, 1984b), one of these - the 6.6 kb mRNA - could be responsible for the synthesis of the exon 1 product. The p20 antisera failed to detect the exon 1 product in all human cell lines tested by immunoprecipitation or immunoblotting experiments.

Two major reasons, not mutually exclusive, could explain the absence of detection of the exon 1 product : first, the p20 protein is highly degraded in these cells ; second, the mRNAs are untranslated or translated with a very low efficiency. It is likely that the 6.6 kb mRNA described in the JBL2 cells cannot be translated into p20 protein because of its large leader sequence of 2.3 kb. In addition, analyses of expression of the exon 1 product in QEC allow us to propose that the absence of detection of the p20 protein in HL60 or K562 cells could be the result of low translational efficiency of the 3.2 kb myc mRNA. Indeed QEC transformed by the pBX-AHM recombinant does encode a gag-ex1 protein, p22.5, but this protein is present at low level. The gag-ex1 protein has a similar half-life to the human c-myc protein also expressed in these transformed QEC. Therefore, the fact that the rates of mRNA able to synthesize the two kind of proteins (p22.5 and myc proteins) are similar suggests that the difference between these protein rates is the result of a lower translational efficiency of the mRNA (genomic mRNA) which codes for the p22.5 protein. Since, it is difficult to incriminate the leader sequence and AUG of the gag gene for the low translational efficiency of the genomic mRNA and because different r-loop structures in myc mRNA could be formed into the exon 1 sequences or between exon 1 and 2 sequences (Battey *et al.*, 1983 ; Saito *et al.*, 1983), it is possible that a peculiar secondary structure of the genomic

mRNA could be involved in its reduced translational efficiency. It appears therefore possible that the expression of the p20 protein in human cells could require the presence of specific factors involved in the translation of the 3.2 kb myc mRNA to give the exon 1 product. These factors could be either tissue or development specific.

## MATERIALS AND METHODS

### Construction of human c-myc recombinants

In the following constructions, we used previously described human genomic c-myc clone and  $\Delta$ EV provirus sequences (Martin *et al.*, 1986). The pEK-AHM was obtained in five steps while the pEP-PS-AHM plasmid was obtained in seven steps, and detailed strategy is available upon request. The pBX-AHM plasmid derived from the previously reported pX-AHM recombinant (Martin *et al.*, 1986) and was obtained as follows : the pX-AHM DNA was cleaved with BamHI and blunt-ends was formed by the klenow fragment of the polymerase I then digested by SphI. The BamHI-SphI fragment which contains the LTRs and gag gene sequences was purified and ligated with the Xho1-SphI purified fragment of pX-AHM DNA which contains the three myc exons and which has been obtained by Xho1 digestion followed by klenow blunt-ending and SphI digestion (Figure 1). Subcloning SX-AHM provirus previously described (Martin *et al.*, 1986), SRA clone of the Rous Sarcoma Virus (DeLorbe *et al.*, 1980) and pBX-AHM DNA were used to construct pgagEX1myc-src plasmid (Figure 3). The detail of the p-gag-EX1-myc-src construction is available upon request.

### Construction of SP6 expression vectors

The plasmid pSP64 (Melton *et al.*, 1984) was obtained from Promega Biotec. A subclone of pBX-AHM in pSP64 was prepared in which the gag-ex1 sequences were placed under control of the SP6 promoter. The PstI-XbaI gag-ex1 fragment was inserted in the pSP64 plasmid digested by PstI and XbaI to generate the pSP64-gag-ex1 vector. A subclone of the human c-myc gene pHX-ex1 (fig 1) was derived from previously described pEP-AHM recombinant (Martin *et al.*, 1986). The SmaI-EcoRI exon 1 fragment was inserted in the pSP64 plasmid digested by SmaI-EcoRI to give the pSP64-ex1 vector. *In vitro* transcription of Sant (Martin *et al.*, 1986) has been also used (Figure 1). The SmaI-EcoRI exon 1 fragment was inserted in the pSP64 plasmid digested by SmaI-EcoRI to give the pSP64-ex1 vector.

### *In vitro* transcription of SP6 expression vectors

*In vitro* transcription assay using EcoRI linearized DNA templates was carried out essentially

as described by Melton *et al.*(1984) except (5-6-<sup>3</sup>H) UTP (33.7 Ci/mmol) was used and phenol-chloroform extraction was directly followed by ethanol precipitation. The specific activities of mRNAs obtained were  $0.9 \times 10^6$  cpm/ug for (<sup>3</sup>H) mRNA.

#### *In vitro* translation of SP6 expression vectors

*In vitro* translation assay were performed with 35 ml of Rabbit reticulocyte lysate (Amersham). Potassium ions (KAc), (<sup>35</sup>S) cysteine (600 Ci/mmol) and amino acids minus cysteine were added at final concentrations 123 mM, 1 mCi/ml and 50 mM respectively. 1 mg of (<sup>3</sup>H) UTP labelled capped transcripts were added to give the final reaction mixture of 50 ml. Incubation of the reaction mixture was carried out for 60 min at 30°C. The reaction was stopped with EDTA (20 mM final) and RNase A. Incorporation of (<sup>35</sup>S) cysteine into acid precipitable products was determined by precipitation of 1 ml aliquots in 5 % trichloroacetic acid with 0.1 % cold cysteine followed by incubation at 80°C for 20 min then placed at 4°C. Precipitation was passed through Whatman filter paper discs, washed in ethanol, dried, and assayed for radioactivity in toluene scintillation fluid. For gel analysis of translation products, aliquots from translation mixtures were mixed with NaDodSO<sub>4</sub>/sample buffer, boiled for 5 minutes, and applied on 15 % NaDodSO<sub>4</sub>/polyacrylamide gels (Laemli, 1980). Gels were fixed in 5/5/1 methanol-water-acetic acid in volume, treated with PPO-DMSO, and exposed against XAR-5 Kodak film at -70°C.

#### Construction of a human c-myc exon1 bacterial expression vector

We used the human c-myc clone pEP-AHM which has been previously described (Martin *et al.*, 1986). Briefly, a fragment which contains the exon 1 was inserted into a bacterial expression vector pLc24-S derived from the pLc24 vector (Remaut *et al.*, 1981) (Figure 2A). The pLc24-S plasmid was cleaved by BamHI, blunt-ended by the klenow fragment of the polymerase I, then digested by SacI. The BamHI-SacI fragment which contains polymerase MS2 sequences was purified and ligated with the XhoI-SacI purified fragment of pEP-AHM DNA which contains exon 1 sequences and which has been obtained by XhoI digestion followed by klenow blunt-ended and SacI digestion (Figure 2A). The obtained expression vector was called pLc24-ex1.

#### Expression and purification of the bacterial protein and preparation of antisera

The expression and purification of the bp25<sup>MS2-ex1</sup> protein and the preparation of antisera were performed as described (Ghysdael *et al.*, 1986). The anti bp25<sup>MS2-ex1</sup> serum has been

called anti-p20 serum.

### DNA binding

Protein blotting and binding of ( $^{32}\text{P}$ ) DNA were performed as described by Bowen *et al* (1980). The plasmid utilized in the DNA binding studies was the pEK-AHM human c-myc recombinant described in this paper. The pEK-AHM plasmid linearized by the Xba1 enzyme was labelled with dCTP in a blunt-ending assay in which the klenow fragment of the polymerase I was used.

### Cells and transfection procedure

Primary cultures of quail embryo cells (QEC) prepared from 10 day old japanese quail embryos were transfected with the pEP-PS-AHM and pBXk-AHM plasmids as previously described (Martin *et al.*, 1986). The same transfection procedure was used to transfect the p-gag-EX1-myc-src plasmid onto chick embryo cells (SPAFAS). In all cultures, transformed foci were picked, pooled when necessary and grown up in DMEM 10 % FCS. The Burkitt lymphoma cells JBL2 were kindly provided by G.Lenoir.

### Cell labelling and immunoprecipitation

Cells were labelled for 30 min (or 5 min) with 250 uCi/ml of L ( $^{35}\text{S}$ ) cysteine (NEN, 600 Ci/mmol) in cysteine free synthetic medium (MEM, Gibco). After removal of the isotope, cells were lysed in TNE containing 0.6 % Na-dodecyl sulfate and 1% aprotinin (Sigma). Lysates were boiled for 5 min, sonicated (2x100) to break DNA, and vol/vol solution of TNE containing 3% triton and 1% aprotinin was added. Protein immunoprecipitations were carried out for 4-6 h at 0°C with the different antisera. Rabbit anti-serum prepared with a bacterially expressed polypeptide corresponding to the carboxy-terminal part of the human c-myc protein is described elsewhere (Ferre F., in preparation). Anti-p19-gag serum has been obtained by immunizing rabbits with purified P19 protein (Dissous C., personal communication). 10 mg of protein A sepharose beads were added to each sample for 3 h à 4°C. Beads were washed in TNE, 0.3% SDS, 1.5% Triton and 1% aprotinin buffer, then in TNE buffer. Radioactivity was recovered from beads by 5 min boiling in electrophoresis loading buffer and applied onto 10%-15% acrylamide gels, followed by fluorography of the dried gel as previously described (Ghysdael *et al.*, 1979 ; Ghysdael *et al.*, 1981).

### Nucleic acid analysis

Total cellular RNA was extracted and fractionated on oligo(dT)-cellulose. Polyadenylated fractions were denatured by glyoxal treatment, submitted to electrophoresis in 1% agarose gels and transferred to nitrocellulose. Blots were hybridized to  $^{32}\text{P}$ -labelled DNA, washed and subjected to autoradiography at  $-70^{\circ}\text{C}$  as previously described (Coll *et al.*, 1983).



### ACKNOWLEDGMENTS

We thank A.Begue for excellent technical assistance, C.Dissous and B.Vandenbunder and K.Boulukos for helpful discussions, N.Devassine for patient typing and A.Gegonne for help in the manuscript preparation. This work was supported by grants from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, C.R.L. 822020, Centre Nationale de la Recherche Médicale, Institut Pasteur de Lille, Association pour la Recherche sur le Cancer and Fondation contre la leucémie (Fondation de France). CH is a fellow of the Ligue National Française contre le Cancer and PM is a fellow of Association de la Recherche contre le Cancer.

FIGURE 1 : Expression of the product of human c-myc exon 1 ORF *in vitro*

(A) Subcloning strategy of the exon 1 sequences into pSP64. Subcloning of the SmaI and EcoRI fragments generated from pHX-ex1, a subclone of the previously described pEP-AHM recombinant (Martin *et al.*, 1986), was done in the pSP64 plasmid to give the pSP64-ex1 vector. The strategy used to obtain the pBX-AHM recombinant from the previously described pX-AHM recombinant (Martin *et al.*, 1986) is also depicted. Subcloning of the PstI and XbaI fragments generated from pBX-AHM into the pSP64 plasmid gave the pSP64-gag-ex1 vector. The exon 1 ORF was depicted as an open box, the gag coding sequence as a hatched box. Restriction enzymes are as follows (B : BamHI ; E : EcoRI ; H : HpaI ; P : PstI ; Sm : SmaI ; Sp : SphI ; Xh : XhoI ; Xa : XbaI)

(B) *In vitro* translation products of pSP64-ex1 and pSP64-gag-ex1 transcripts. Capped transcripts (1 ug of each) were translated for 60 min in 35 ml of micrococcal nuclear treated rabbit reticulocyte lysate. 10 ml aliquots were mixed with NaDodSO<sub>4</sub>/sample buffer and analysed by electrophoresis on a 15 % NaDodSO<sub>4</sub>/polyacrylamide gel followed by fluorography. Lane 1, pSP64-ex1; lane 2, 9S mRNA globin (0.2 ug) ; lane 3, pSP64-gag-ex1.

FIGURE 2 : Expression of most of the exon 1 ORF in bacteria and DNA-binding property of the bacterially expressed exon 1 product.

(A) Subcloning strategy of the exon 1 ORF into a pPLc24 derived vector. The purified XhoI\*-SacI fragment (of the pHX-ex1 construction) which contains the exon 1 ORF was inserted between the BamHI\*-SacI sites of a pPLc24 derived vector (\* : site filled by the klenow polymerase). This expression vector contains the Pl promoter of bacteriophage, the ribosome binding site, and sequences for the first 99 amino acids of the polymerase of phage MS2. The subcloning results in the in-frame fusion of the sequence for 158 exon 1 encoded amino acids to the MS2 polymerase sequences. This vector was named pPLc24-ex1. For expression, plasmids were transferred into an E.Coli host which has a temperature-sensitive repressor of the PL promoter. In this host, repression occurs at 28°C and full induction is obtained at 42°C. (restriction enzymes : B : BamHI ; E : EcoRI ; S : SacI ; Xh : XhoI).

(B) Expression of an exon 1 polypeptide (bp25<sup>MS2-ex1</sup>) in *E.coli*. Cultures of exponentially growing bacteria carrying pPLc24-ex1 were incubated at 28°C or 42°C for 3 h. Aliquots containing bacterial cells were mixed with NaDodSO<sub>4</sub>/sample buffer, boiled and electrophoresed in a 15% NaDodSO<sub>4</sub>/polyacrylamide gel. Proteins were visualized by staining with Coomassie brilliant blue.

Lane 1, pPLc24-ex1 (28°C) ; lane 2, pPLc24-ex1 (42°).

(5 - 8) DNA-binding to the bp25MS2-ex1 protein. After electrophoresis of the bacterial proteins on a 15% NaDodSO<sub>4</sub>/polyacrylamide gel (described in (B)), blotting then binding of <sup>32</sup>P pEK-AHM DNA were performed. Nitrocellulose filters were washed in 0.2 M NaCl buffer, dried and autoradiographed. The corresponding channel for the gel to the filter are as follows : 1-5, 2-6, 3-7, 4-8. Lanes (1,5) pPLc24-ex1, 28°C ; lanes (2,6) pPLc24-ex1, 42°C ; lanes (3,7) pPLc24-X which express a fusion protein of 22 kd (MS2 (98 amino acids) - X (116 amino acids)), 28°C ; lanes (4,8) pPLc24-X, 42°C.

FIGURE 3 : Analysis of immunoprecipitates from p-gag-EX1-myc-src transformed quail cells.

The immunocomplexes from 10<sup>6</sup> labelled cells were SDS-PAGE fractionated, fluorographed and a 24 h exposure of the dried gel is shown. Lane 1, anti-p20 serum blocked by preincubation with an excess of bp25<sup>MS2-ex1</sup> ; lane 2, anti-p20 serum ; lane 3, anti-p19-gag serum ; lane 4, anti-myc-ex3 serum blocked by preincubation with an excess of myc-ex3 antigen ; lane 5, anti-myc-ex3 serum.

FIGURE 4 : Analysis of myc transcripts and exon 1 and myc proteins from pEK-AHM, pEP-PS-AHM and pBX-AHM transformed quail cells.

The structure of the three recombinants are depicted on the top of the figure : (A) pEK-AHM, (B) pEP-PS-AHM, (C) pBX-AHM. Lanes a,b,c: Analysis of myc mRNAs. Blots were hybridized with a <sup>32</sup>P nick translated probe of exon 3 (ClaI fragment containing exon 3). Lanes 1 5 : Immunoprecipitation of exon 1 and myc proteins synthesized in QEC transformed by each recombinant. Extracts of cells labelled with <sup>35</sup>S cysteine were used and all the samples were adjusted to contain equal amounts of incorporated radioactivity. The immunocomplexes were fractionned by SDS/PAGE. Lane 1, anti-p20 serum (30 d exposure for pEK-AHM and pEP-PS-AHM, 4 d exposure for pBX-AHM) ; lane 2, anti-p20 serum blocked by preincubation with an excess of bp25<sup>MS2-ex1</sup> ; lane 3, anti-p19-gag serum (4 d exposure) ; lane 4, anti-myc-ex3 serum (1 d exposure) ; lane 5, anti-myc-ex3 serum blocked by preincubation with an excess of myc-ex3 antigen.

Figure 5 : Stability of gag exon 1 and c-myc proteins

pBX-AHM transformed cells were pulse-labelled with ( $^{35}\text{S}$ ) cysteine for 5 min (0) followed by a chase in medium containing an excess of cold cysteine. Cell extracts were prepared and the samples to be analysed were adjusted to contain equal amounts of incorporated radioactivity. Immunoprecipitates were analyzed by SDS-PAGE followed by fluorography. (A) anti-p20 serum (4 d exposure) (B) anti-myc serum (1 d exposure).

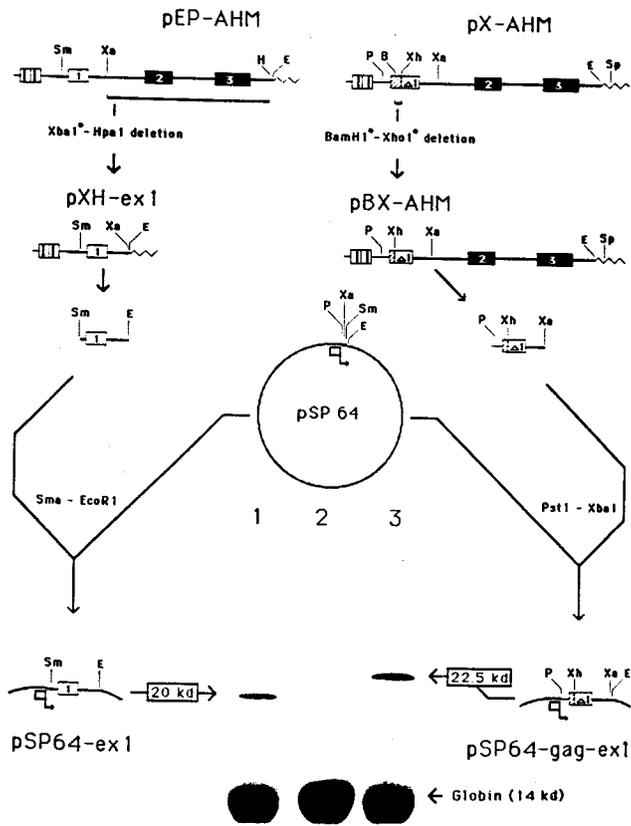


Figure 1

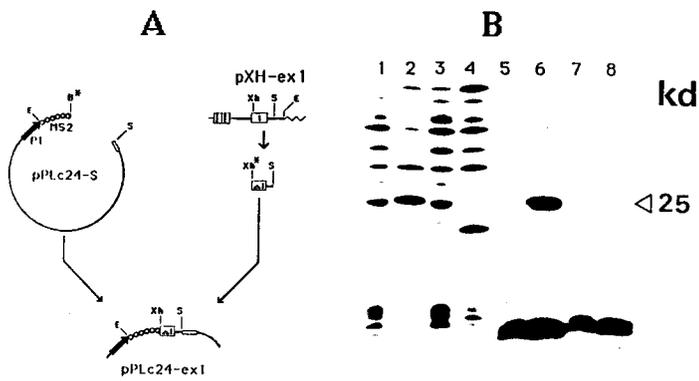


Figure 2



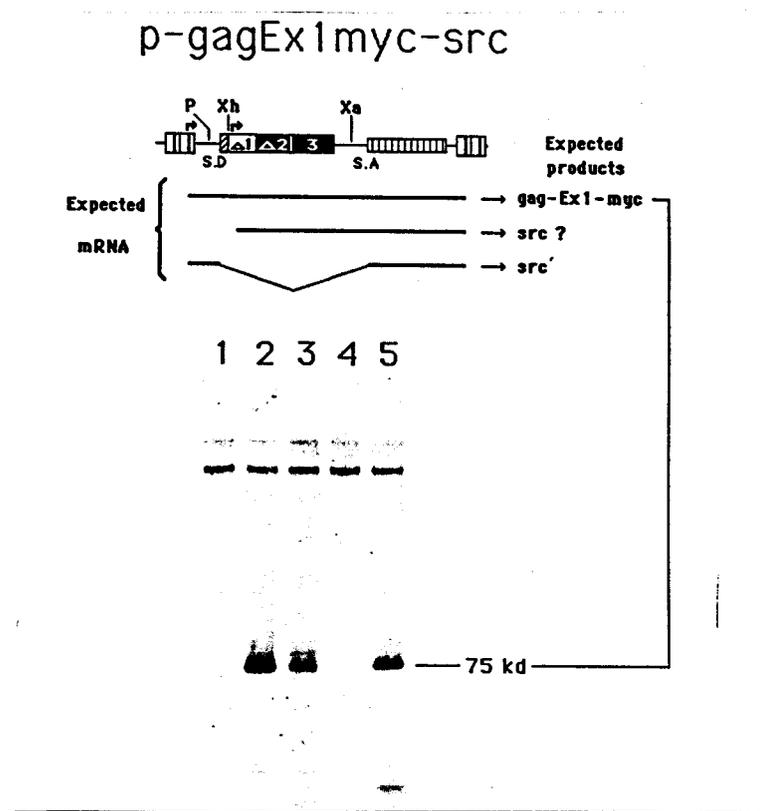


Figure 3

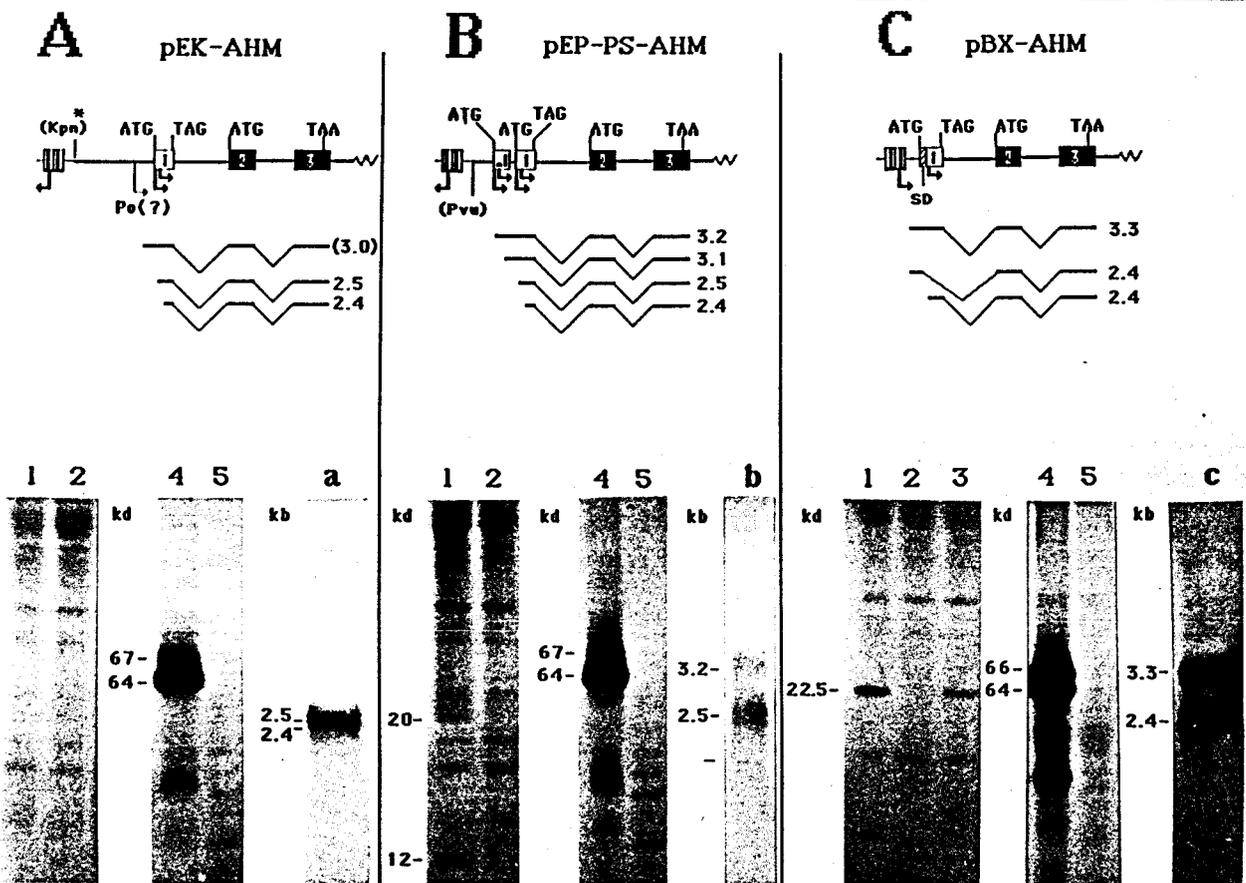


Figure 4

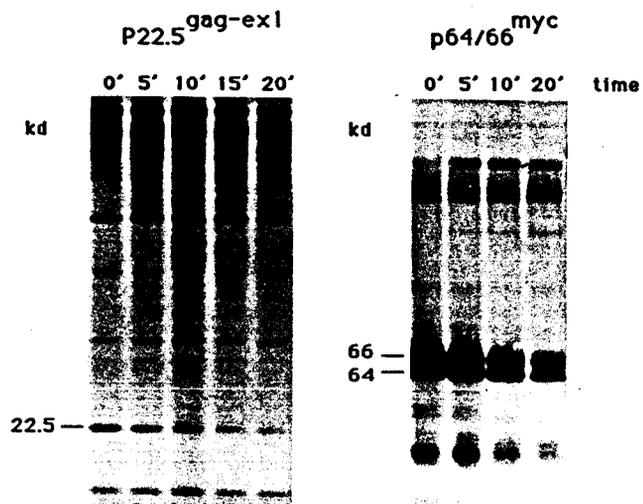


Figure 5



## REFERENCES

Batley,J., Moulding,C., Taub,R., Murphy,W., Stewart,T., Potter,H., Lenoir,G. and Leder,P. (1983) *Cell*, 34,779-787.

Bentley,D.L. and Groudine,M. (1986) *Nature*, 321, 702-706.

Bowen,B., Steinberg,J., Laemmli,U.K. and Weintraub,H. (1980) *Nucleic Acids Res.*, 8, 1-20.

Coll,J., Righi,M., de Taisne,C., Dissous,C., Gegonne,A. and Stehelin,D. (1983) *EMBO J.*, 2, 2189-2194.

Dalla-Favera,R., Gelmann,E.P., Martinotti,S., Franchini,G., Papas,T.S., Gallo,R.C. and Wong-Staal,F. (1982) *Proc.Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 6497-6501.

DeLorbe,W.J., Luciw,P.A., Goodman,H.M., Varmus,H.E. and Bishop,J.M. (1980) *J.Virol.*, 36, 50-61.

Gazin,C., Dupont de Dinechin,S., Hampe,A., Masson,J.M., Martin,P., Stehelin,D. and Galibert,F. (1984) *EMBO J.*, 3, 383-387.

Ghysdael,J., Kettmann,R. and Burny,A. (1979) *J.Virol.*, 29, 1087-1098.

Ghysdael,J., Neil,J.C., Wallbank,A.M. and Vogt,P.K. (1981) *Virology*, 111, 386-400.

Ghysdael,J., Gegonne,A., Pognonec,P., Dernis,D., Leprince,D. and Stehelin,D. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 1714-1718.

Hann,S.R. and Eisenman,R.N. (1984) *Mol.Cell.Biol.*, 4, 2486-2497.

Kelly,K., Cochran,B.H., Stiles,C.D. and Leder,P. (1983) *Cell*, 35, 603-610.

Laemmli,U.D. (1970) *Nature (London)*, 227, 680-685.

Linial,M. and Groudine,M. (1985). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 53-57.

Martin,P., Henry,C., Ferre,F., Duterque-Coquillaud,M., Lagrou,C., Ghysdael,J., Debuire,B., Stehelin,D. and Saule,S. (1986) EMBO J., 5, 1529-1533.

Melton,D.A., Krieg,P.A., Rebagliati,M.R., Maniatis,T., Zinn,K. and Green,M.R. (1984) Nucleic Acids Res., 12, 7035-7056.

Remaut,E., Stanssens,P. and Fiers,W. (1981) Gene, 15, 81-93.

Saito,H., Hayday,A.C., Wiman,K., Hayward,W.S. and Tonegawa,S. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 7476-7480.

Taub,R., Moulding,C., Battey,J., Murphy,W., Vasicek,T., Lenoir,G.M. and Leder,P. (1984a) Cell, 36, 339-348.

Taub,R., Kelly,K., Battey,J., Latt,S., Lenoir,G.M., Tantravahi,U., Tu,Z. and Leder,P. (1984b) Cell 37, 511-520.

Varmus,H. (1984) A. Rev.Genet., 18, 553-612.

Watt,R.A., Shatzman,A.R. and Rosenberg,M. (1985) Mol. Cell. Biol., 5, 448-456.

*Article 4*

## Characterization of a *myc*-Containing Retrovirus Generated by Propagation of an MH2 Viral Subgenomic RNA

P. MARTIN,<sup>1</sup> C. HENRY,<sup>2</sup> F. FERRE,<sup>1</sup> C. BECHADE,<sup>3</sup> A. BEGUE,<sup>1</sup> C. CALOTHY,<sup>3</sup> B. DEBUIRE,<sup>2\*</sup> D. STEHELIN,<sup>1</sup> AND S. SAULE<sup>1</sup>

Inserm Unité 186, Institut Pasteur de Lille, 59019 Lille Cedex,<sup>1</sup> I.R.C.L. Inserm Unité 124, 59045 Lille Cedex,<sup>2</sup> and Institut Curie, 91405 Orsay,<sup>3</sup> France

Received 8 July 1985/Accepted 22 November 1985

We have previously isolated, from wild-type MH2 virus that contains the two oncogenes *mil* and *myc*, mutants defective in one or the other oncogene product. We report here the molecular cloning and extensive characterization of MH2 CL25 provirus lacking the *v-mil* oncogene. Our results indicate that this virus corresponds to the propagation of the 2.8-kilobase subgenomic RNA of MH2I.

The avian retrovirus Mill-Hill 2 (MH2) is a replication-defective retrovirus that induces liver and kidney carcinomas in fowl and transforms fibroblasts, macrophages, chondroblasts, and neuroretina cells in culture (1, 2, 7). The genome of MH2 contains two cell-derived oncogenes: *v-myc*, also found in three other retroviruses (MC29, CMII, OK10) (19, 21), and *v-mil* (4, 12), related to the *src* gene of Rous sarcoma virus (RSV) (6, 13). In MH2-transformed cells *v-mil* is expressed as a 100-kilodalton polypeptide resulting from the fusion of *gag* and *mil* sequences (11, 17, 19). *v-myc* is expressed as a 61- to 63-kilodalton nuclear protein encoded by a 2.8-kilobase subgenomic mRNA (9, 17, 22).

We defined distinct effects of the *mil* and *myc* oncogenes by studying the properties of MH2-infected neuroretina cells. Chicken embryo neuroretina cells which normally do not multiply in vitro are induced to proliferate upon infection with MH2 but not with MC29, CMII, and OK10 (2, 3). From two distinct viral stocks of wild-type (wt) MH2 we isolated two mutants, MH2 CL16 and MH2 CL25, lacking the *v-mil* oncogene. These mutants failed to transform neuroretina cells or to induce their proliferation but retained the ability to transform avian embryo cells. To precisely define the genetic organization of these *v-mil*-defective mutants, we molecularly cloned a *v-myc*-containing provirus from MH2 CL25-transformed quail embryo cells. We present here data indicating that this mutant corresponds to the propagation of a retroviral particle containing subgenomic MH2 RNA species.

**Molecular cloning of MH2 CL25 provirus.** A transformed quail embryo cell clone containing MH2 CL25 provirus was isolated in soft agar and used as a source of DNA to construct a gene library. High-molecular-weight DNA was partially digested with *EcoRI* restriction endonuclease and ligated with purified lambda Charon 4A arms, packaged, and amplified as reported previously (22). Several probes were prepared: a long terminal repeat (LTR) probe was derived from a provirus of RSV, strain Schmidt-Ruppin A (RSV-SRA) (5). Fragments of the retroviral *gag* gene were derived from Prague strain (RSV-PrA) as previously described (22). Two *myc* probes were used: a 5' *v-myc* probe (*HpaI-PstI* fragment derived from pMH2Hd [4]) and a 3' *c-myc* probe representing the 3' half of chicken exon 3 and described in reference 23. Agarose gel-purified fragments were labeled

through nick translation reactions (20) (Amersham nick translation kit) in the presence of [<sup>32</sup>P]dCTP according to the supplier's instructions. By use of LTR and *myc* probes, two lambda phages were isolated, purified, and amplified. From one of these phages, lambda MH2 CL25, we subcloned a 10-kilobase-pair (kbp) *EcoRI* fragment containing the complete provirus into the *EcoRI* site of pKH47 plasmid DNA (10), yielding plasmid pMH2-CL25. A detailed restriction map of the provirus is shown in Fig. 1.

The hybridization pattern obtained allowed the following observations. (i) The subcloned MH2 CL25 provirus contained a *KpnI* restriction site within its LTRs as attested by the 2.2-kbp band hybridizing with LTR, *gag*, and *myc* probes. Such a band was also observed with the DNA of quail embryo cells transformed by the original isolate of MH2 CL25 pseudotyped by Rous-associated virus 1 (RAV-1) (Fig. 2). (ii) By *SacI* digestion of the provirus, an internal 0.30-kbp restriction fragment was found that hybridized with both *gag* and 5' *myc* probes (Fig. 1). This 0.30-kbp fragment replaced a 3.2-kbp fragment observed previously in the provirus of wt MH2 analyzed similarly, which in addition hybridized to a *mil* probe (4), indicating that in the MH2 CL25 mutant the *gag* and *myc* sequences had become proximal. Such a *gag-myc* junction could be explained by an extensive deletion of the *mil* sequences, or it could have resulted from the integration of a reverse-transcribed spliced subgenomic viral RNA. We thus analyzed the precise boundary between the *gag* and *myc* portions within the 0.30-kbp *SacI* fragment. The fragment was purified on agarose gel, cleaved by *HinfI* restriction endonuclease, and subjected to nucleotide sequencing by the Maxam and Gilbert procedure (15). Figure 1 presents our results, compared with the nucleotide sequence of the *gag* gene of RSV-SRA (24) (since the similar region in wt MH2 has not been sequenced before) and with the nucleotide sequence of the *myc* gene of wt MH2 (6, 13).

It appears that the *gag-myc* junction in MH2 CL25 occurred precisely between the splice donor site of the *gag* sequence and the splice acceptor site of the *myc* gene, bringing the open reading frames together in the correct phase. Therefore, the MH2 CL25 *myc* protein may initiate at the AUG of *gag* located 18 nucleotides upstream from the splice donor site (Fig. 1).

The *myc* gene of molecularly cloned MH2 CL25 is biologically active. We next examined whether our pMH2-CL25 was biologically active. Supercoiled pMH2-CL25 was used

\* Corresponding author.

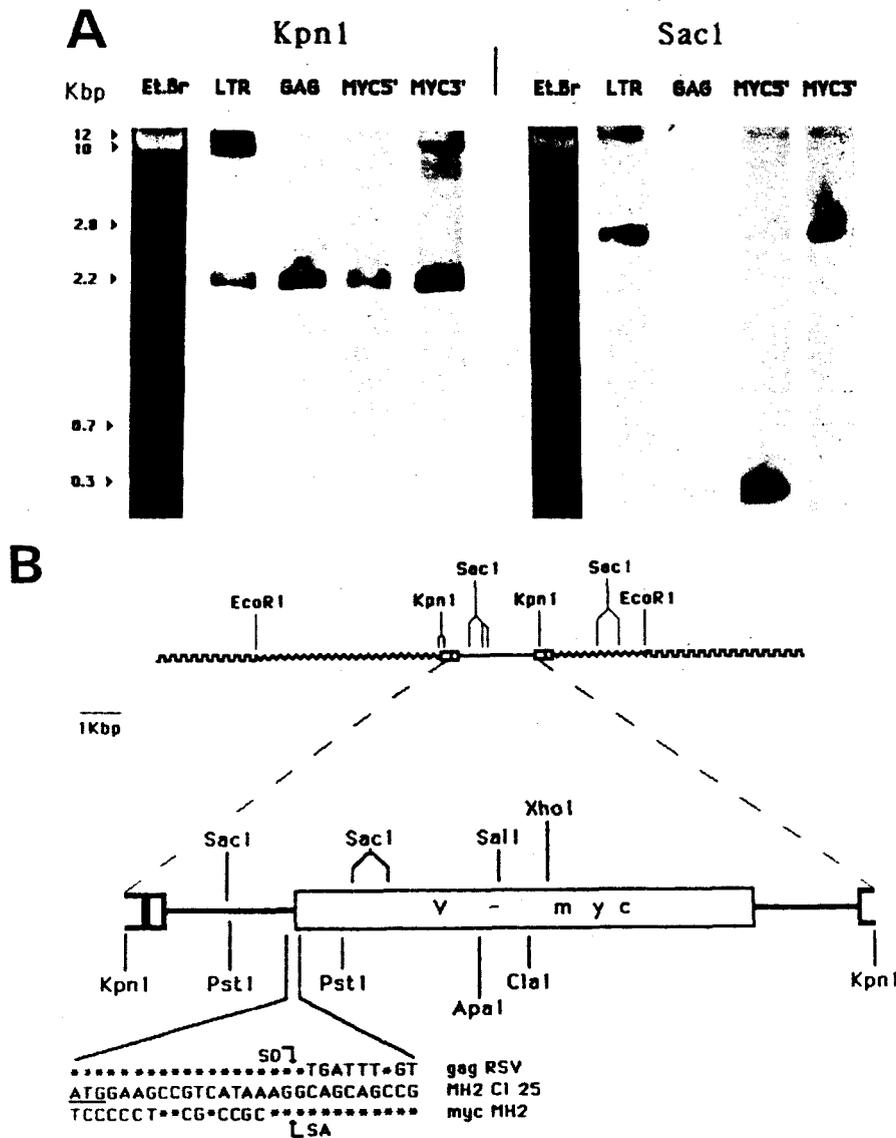


FIG. 1. Restriction map of pMH2-CL25 DNA. The restriction map of MH2 CL25 phages and plasmids was established with several endonucleases. The viral domains were located by Southern blot analyses with specific  $^{32}\text{P}$ -labeled probes corresponding to LTR sequences from RSV-SRA, the *gag* gene from Pr-RSV-A, a 5' *v-myc* probe derived from wt MH2, and a 3' *c-myc* probe. (A) *KpnI* or *SacI* digestions were performed on pMH2-CL25 DNA. Fragments were separated on 1% agarose gels, visualized by ethidium bromide (EtBr) staining, and then transferred to nitrocellulose and hybridized with the probes quoted above. (B) Organization deduced from Southern blot analysis of MH2 CL25 DNA and nucleotide sequence of the *gag-myc* junction. A 162-nucleotide *HinfI* fragment was sequenced by the Maxam and Gilbert procedure (15). The determined sequence was compared with the *gag* sequence of RSV (24) and with the *v-myc* sequence of wt MH2 (6, 13). Asterisks denote common nucleotides; SD, splice donor site of the *gag* gene; SA, splice acceptor site of the *myc* gene. Symbols: —, MH2 CL25 proviral DNA,  $\square$ , plasmid DNA;  $\square$ , cellular DNA;  $\square$ , LTR.

to transfect quail embryo cells. DNA (30  $\mu\text{g}$ ) was precipitated by the calcium phosphate method on  $10^6$  quail embryo cells (8). After overnight exposure, cultures were reseeded in 100-mm dishes and maintained in low-serum medium (Dulbecco modified Eagle medium supplemented with 5% fetal calf serum). Ten days later distinct foci had appeared (about 1 focus per  $\mu\text{g}$  of DNA). Groups of morphologically transformed cells were picked, pooled, and grown up in Dulbecco modified Eagle medium supplemented with 10% fetal calf serum. These cells were checked for the presence of MH2 CL25 proviral DNA and *v-myc* protein. Figure 2 shows the Southern blot analyses of DNA from quail embryo cells transformed by wt MH2 (RAV-1), MH2 CL16 (RAV-1),

and MH2 CL25 (RAV-1) and cells transfected with pMH2-CL25. After *KpnI* restriction endonuclease digestion, known to cut within the proviral LTRs, a 2.2-kbp *myc*-hybridizing band was detected in MH2 CL16- and MH2 CL25-transformed cell DNAs (in addition to the 5.5-kbp band corresponding to the endogenous *c-myc* gene seen in normal quail embryo cells [data not shown]). After *EcoRI* digestion of the same DNAs, a similar 2.2-kbp *myc*-hybridizing band appeared in MH2 CL16 DNA but not in MH2 CL25 DNA (in addition to the 16-kbp endogenous *c-myc* gene band [23]). This was expected for MH2 CL16 since this clone was derived from wt MH2 QB2 cells in which both restriction sites were found previously in the proviral LTRs (4). The

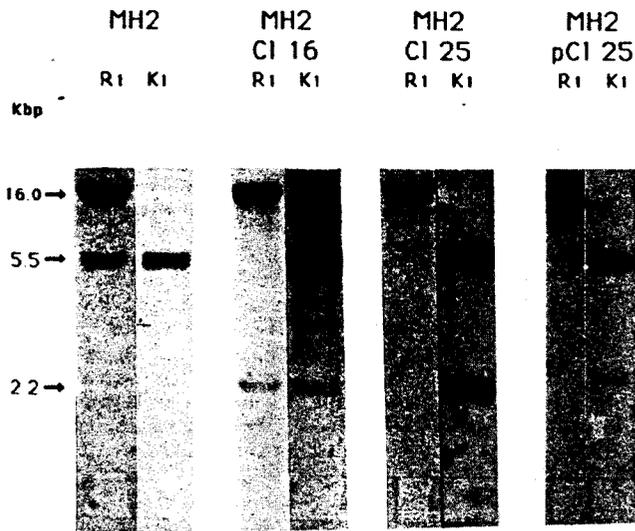


FIG. 2. Southern blot analysis of DNA from quail embryo cells transformed by wt MH2 and mutants. High-molecular-weight DNA from infected cells was digested with *Eco*RI (RI) and *Kpn*I (K). Size-separated cellular DNA fragments were transferred to nitrocellulose and hybridized with the 3' *c-myc* probe. The transforming viruses used (RAV-1 helper pseudotypes) are indicated on top of the figure. pMH2-CL25 corresponds to quail cells transformed by the plasmid containing the molecularly cloned MH2 CL25.

progenitor of MH2 CL25 would be in this respect more related to the one described by Jansen et al. (12) that similarly lacks the LTR *Eco*RI site.

Finally, to determine whether the transformed cells produced the expected p61-63 *myc* doublet protein (9), [<sup>35</sup>S]methionine-labeled total cellular extracts were challenged with rabbit anti-*myc* serum prepared by immunization with a bacterially expressed polypeptide corresponding to the product of the 5' part of exon 3 from the human *myc* gene (F. Ferre, manuscript in preparation). Immunoprecipitation was performed as previously described (2). Immunoprecipitated proteins, characterized by their apparent molecular weight in polyacrylamide gel, are shown in Fig. 3. As can be seen, the p61-63 doublet was detected in cells transformed by wt MH2 or the mutants studied (lanes 1); such bands were not seen with preabsorbed serum (lanes 2).

We concluded from these experiments that the molecularly cloned provirus pMH2 CL25 was biologically active and apparently indistinguishable from the starting mutant isolate.

We then addressed whether pMH2-CL25 could produce recovered infectious virus. Transformed quail embryo cells obtained upon transfection with pMH2-CL25 DNA were superinfected with RAV-1 helper virus. Supernatant medium collected 2 weeks later was titrated for transforming activity by a focus assay on quail embryo cells (29) and contained  $0.6 \times 10^3$  focus-forming units per ml. This titer was roughly similar to those obtained in similar conditions with cultures infected with wt MH2 ( $1.5 \times 10^3$  focus-forming units per ml), MH2 CL16 ( $0.7 \times 10^3$  focus-forming units per ml), and MH2 CL25 ( $0.9 \times 10^3$  focus-forming units per ml), all pseudotyped with RAV-1 helper virus. We concluded from these results that the virus rescued from pMH2-CL25 provirus was not defective in packaging.

Our results show that the MH2 CL25 and MH2 CL16 mutants derive from wt MH2 and appear to correspond to

the encapsidation of subgenomic RNA in viral particles that can propagate as RAV pseudotypes.

The conserved infectious titers show that encapsidation signals are present in these types of molecules. Three kinds of encapsidation signals have been characterized in avian retroviruses. (i) Nishizawa et al. (16) reported packaging sequences (Ni-PS) in the 5' leader of a temperature-sensitive mutant of RSV. These sequences reside between nucleotides 109 and 356, i.e., between the primer-binding site of the tRNA and the initiation codon of the *gag* gene. A mutant virus, TK15, deleted in this region is defective in packaging. Previous work by Shank and Linial (25) reported sequences that may serve similar functions in the first 600 nucleotides at the 5' end of the RSV-Pr genome. (ii) Pugatsch and Stacey (18) mapped packaging sequences (Pu-PS) at the *Sst*II restriction site (545 nucleotides from the 5' end) in the *gag* gene of RSV-SRA. These sequences map 3' of the splice donor signal and are lost in *env* (and *src*) subgenomic mRNAs that splice out the intronic *gag-pol* (*env*) sequences from the viral genome. Sequences serving similar functions have also been reported for spleen necrosis virus (30). (iii) Sorge et al. (26) reported packaging sequences (So-PS) in the direct repeat unit 3' to the *src* gene of RSV, slightly upstream from the U3 sequences.

Although no direct evidence is yet available, wt MH2 is likely to contain all three packaging signals described, since the leader and *gag* sequences are well conserved among most avian retroviruses and since the direct repeat unit that may encompass the So-PS signal was found in wt MH2 by Kan et al. (13), although the U3 sequences appeared quite distantly related to RSV. In contrast, the mutant MH2 CL25 (and MH2 CL16) corresponds to subgenomic RNA that should lack the putative Pu-PS signal lost during the splicing process. This is also true for the *env* subgenomic mRNA described by Stacey (27). Since the titers of our mutants MH2 CL25 and MH2 CL16 are still about half of the wt MH2 titer, we conclude that the Pu-PS signal, if present, does not

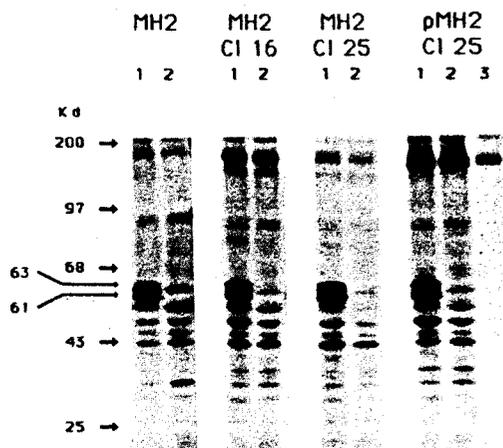


FIG. 3. Immunoprecipitation of v-*myc* proteins in quail embryo cells transformed by wt MH2 and mutants. Cells were labeled for 45 min with [<sup>35</sup>S]methionine, lysed, and incubated with rabbit anti-human *c-myc* serum prepared with a bacterially expressed polypeptide (lane 1) or the same antiserum preincubated with the corresponding polypeptide (lane 2). Lane 3 corresponds to rabbit preimmune serum. Standard molecular size markers from Bethesda Research Laboratories, Inc. (Gaithersburg, Md.) are listed on the left of the figure (Kd, kilodaltons).

play a decisive role in the packaging process of wt MH2 or the mutants.

The titers measured separately for wt MH2 and the mutants in similar conditions would predict a ratio of ca. 60 to 40% of the corresponding particles present in routinely passaged stocks of MH2 virus. Instead, we never detected more than 10% mutant particles in such stocks. Clearly, when promiscuously mixed in such stocks, wt MH2 appears to exhibit a selective advantage over the mutant particles, an observation for which we have as yet no clear explanation.

The isolation and characterization of the MH2 CL25 mutant represents the first demonstration of transmissible pseudotype particles containing an oncogene embedded in a subgenomic mRNA. An analogous situation may have been encountered with *src*-containing deleted proviruses in Syrian hamster tumor cell lines such as H-19 (28) or deletion mutants described by Koyama et al. (14). Such experiments might help in finding the minimum structural genetic elements required to allow the propagation of a retrovirus, and our results may be used for the construction of vectors for the introduction of foreign genes into host cells. Finally, the tumorigenic potential of our mutants is currently being investigated.

We thank C. Lagrou and M. Benaissa for excellent technical assistance, J. Ghysdael and B. Vandebunder for helpful discussion, N. Devassine for patient typing, and M. B. Raes for help in the manuscript preparation.

This work was supported by funds from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Centre National de la Recherche Scientifique, Institut Pasteur de Lille, and Association pour la Recherche sur le Cancer. C. H. is a fellow of Ligue Nationale Française contre le Cancer.

#### LITERATURE CITED

1. Alema, S., F. Tato, and D. Boettiger. 1985. *myc* and *src* oncogenes have complementary effects on cell proliferation and expression of specific extracellular matrix compounds in definitive chondroblasts. *Mol. Cell. Biol.* 5:538-544.
2. Bechade, C., B. Pessac, G. Calothy, P. Martin, J. Coll, F. Denhez, S. Saule, J. Ghysdael, and D. Stehelin. 1985. Proliferation and transformation of chicken embryo neuroretina cells by retrovirus Mill Hill no. 2 (MH2) depends on the expression of the *v-mil* oncogene. *Nature (London)* 316:559-562.
3. Calothy, G., F. Poirier, G. Dambrine, P. Mignatti, P. Combes, and B. Pessac. 1979. Expression of viral oncogenes in differentiating chick embryo neuroretinal cells infected with avian tumor viruses. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 44:983-990.
4. Coll, J., C. de Taisne, C. Dissous, A. Gegonne, and D. Stehelin. 1983. Molecular cloning of the avian acute transforming retrovirus MH2 reveals a novel cell-derived sequence (*v-mil*) in addition to the *myc* oncogene. *EMBO J.* 2:2189-2194.
5. de Lorbe, W. J., P. A. Luciew, H. M. Goodman, H. E. Varmus, and J. M. Bishop. 1980. Molecular cloning and characterization of avian sarcoma virus circular DNA molecules. *J. Virol.* 36:50-61.
6. Galibert, F., S. Dupont De Dinechin, M. Righi, and D. Stehelin. 1984. The second oncogene *mil* of avian retrovirus MH2 is related to the *src* gene family. *EMBO J.* 3:1333-1338.
7. Graf, T., and D. Stehelin. 1982. Avian leukemia viruses: oncogenes and genome structure. *Biochim. Biophys. Acta* 651:245-271.
8. Graham, F. L., and J. van der Eb. 1973. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52:456-461.
9. Hann, S. R., H. D. Abrams, L. R. Rohrschneider, and R. N. Eisenman. 1983. Proteins encoded by *v-myc* and *c-myc* oncogenes: identification and localization in acute leukemia virus transformants and bursal lymphoma cell lines. *Cell* 34:789-798.
10. Hayashi, K. 1980. A cloning vehicle suitable for strand separation. *Gene* 11:109-115.
11. Hu, S. S. F., C. Moscovici, and P. K. Vogt. 1978. The defectiveness of Mill Hill 2, a carcinoma-inducing avian oncovirus. *Virology* 89:162-178.
12. Jansen, H. W., B. Ruckert, R. Lurz, and K. Bister. 1983. Two unrelated cell-derived sequences in the genome of avian leukemia and carcinoma inducing retrovirus MH2. *EMBO J.* 2:1969-1975.
13. Kan, N. C., C. S. Flordellis, G. E. Mark, P. H. Duesberg, and T. S. Papas. 1984. Nucleotide sequence of avian carcinoma virus MH2: two potential onc genes, one related to avian virus MC29 and the other related to murine sarcoma virus 3611. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3000-3004.
14. Koyama, T., F. Harada, and S. Kawai. 1984. Characterization of a Rous sarcoma virus mutant defective in packaging its own genomic RNA: biochemical properties of mutant TK15 and mutant-induced transformant. *J. Virol.* 51:154-162.
15. Maxam, A. M., and W. Gilbert. 1980. Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods Enzymol.* 65:499-560.
16. Nishizawa, M., T. Koyama, and S. Kawai. 1985. Unusual features of the leader sequence of Rous sarcoma virus packaging mutant TK15. *J. Virol.* 55:881-885.
17. Pacht, C., B. Biegalka, and M. Linial. 1983. RNA and protein encoded by MH2 virus: evidence for subgenomic expression of *v-myc*. *J. Virol.* 45:133-139.
18. Pugatsch, T., and D. W. Stacey. 1983. Identification of a sequence likely to be required for avian retroviral packaging. *Virology* 128:505-511.
19. Ramsay, G., M. J. Hayman, and K. Bister. 1982. Phosphorylation of specific sites in the *gag-myc* polyproteins encoded by MC29-type viruses correlates with their transforming ability. *EMBO J.* 1:1111-1116.
20. Rigby, P. W. J., M. Dieckmann, C. Rhodes, and P. Berg. 1977. Labeling deoxyribonucleic acid at high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* 113:237-251.
21. Roussel, M., S. Saule, C. Lagrou, C. Rommens, H. Beug, T. Graf, and D. Stehelin. 1979. Three new types of viral oncogene of cellular origin specific for haematopoietic cell transformation. *Nature (London)* 281:492-495.
22. Saule, S., J. Coll, M. Righi, C. Lagrou, M. B. Raes, and D. Stehelin. 1983. Two different types of transcription for the myelocytomatosis viruses MH2 and CMII. *EMBO J.* 2:805-809.
23. Saule, S., P. Martin, A. Gegonne, A. Begue, C. Lagrou, and D. Stehelin. 1984. Increased transcription of the *c-myc* oncogene in two methylcholanthrene-induced quail fibroblastic cell lines. *Exp. Cell Res.* 155:496-506.
24. Schwartz, D. E., R. Tizard, and W. Gilbert. 1983. Nucleotide sequence of Rous sarcoma virus. *Cell* 32:853-869.
25. Shank, P. R., and M. Linial. 1980. Avian oncovirus mutant (SE21Q1b) deficient in genomic RNA: characterization of a deletion in the provirus. *J. Virol.* 36:450-456.
26. Sorge, J., W. Ricci, and S. H. Hughes. 1983. *cis*-acting RNA packaging locus in the 115-nucleotide direct repeat of Rous sarcoma virus. *J. Virol.* 48:667-675.
27. Stacey, D. W. 1980. Expression of a subgenomic retroviral messenger RNA. *Cell* 21:811-820.
28. Svoboda, J., V. Lhotak, J. Geryk, S. Saule, M. B. Raes, and D. Stehelin. 1983. Characterization of exogenous proviral sequences in hamster tumor cell lines transformed by Rous sarcoma virus rescued from XC cells. *Virology* 128:195-209.
29. Vogt, P. K. 1979. Focus assay of Rous sarcoma virus, p. 198-211. In K. Habel and N. P. Salzman (ed.), *Fundamental techniques in virology*, Academic Press, Inc., New York.
30. Watanabe, S., and H. M. Temin. 1982. Encapsidation sequences for spleen necrosis virus, an avian retrovirus, are between the 5' long terminal repeat and the start of the *gag* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:5986-5990.

## RESUME

Le gène c-myc est l'équivalent cellulaire de l'oncogène viral v-myc, gène transformant des virus de la myélocytomatose aviaire. Le gène c-myc, phylogénétiquement conservé, est exprimé dans les cellules normales. Cependant, des altérations de l'expression de ce gène semblent impliquées dans l'émergence de certains cancers à la fois chez le poulet, la souris et l'homme. Le gène c-myc est un gène mosaïque composé de trois exons. Chez l'homme, ces trois exons pourraient permettre la synthèse de deux types de produits :

- Les exons 2 et 3 qui codent pour les protéines myc sensus stricto et qui seraient responsables du pouvoir oncogène du gène c-myc.

- L'exon 1 qui possède la capacité de coder pour une protéine de 20 kd. Le fait que des altérations des séquences codantes de l'exon 1 accompagnent fréquemment l'activation de l'oncogène c-myc dans certains cancers humains (les lymphomes de Burkitt) suggère que le produit de l'exon 1 pourrait, s'il existe, être impliqué dans la régulation de ce gène.

A l'aide de sera dirigés contre ces différentes protéines, nous avons, d'une part, essayé de caractériser le(s) mode(s) d'activation qui confère(nt) aux protéines c-myc un pouvoir transformant, d'autre part, testé l'existence dans les cellules humaines d'un produit codé par l'exon 1.

Nous avons montré que la seule surexpression des protéines c-myc humaines normales permet la transformation des cellules embryonnaires de caille (QEC) *in vitro*. Ceci suggère que le gène c-myc humain est susceptible de jouer un rôle dans l'apparition des tumeurs où il a été activé par une dérégulation de son expression sans que les protéines myc soient modifiées.

En ce qui concerne le produit de l'exon 1, nous avons montré que ce dernier est effectivement codé sous forme d'une protéine de 20 kd dans un système acellulaire et dans des QEC transfectées par un recombinant du gène c-myc humain. Cependant, nous n'avons pas pu mettre en évidence une telle protéine dans les cellules humaines analysées.