$H \lambda$  université des sciences et techniques de lille

Nº D'ordre: 38

50376

1986

## THÈSE

## présentée pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

option: BIOLOGIE CELLULAIRE et MOLÉCULAIRE

par Patrick MARTIN



50376

1986

41

## COOPÉRATION DES GÈNES ACTIVÉS mil ET myc DANS LA TRANSFORMATION CELLULAIRE

soutenue le 2 Mai 1986 devant la commission d'examen

Président	:	J.MONTREUIL
Rapporteurs	:	J.M.BLANCHARD
	:	B.DEBUIRE
	:	J.KREMBEL
Examinateur	:	D.STÉHELIN

#### 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, GONTIER, 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**

Μ.	CONSTANT Eugène	Electronique
Μ.	FOURET René	Physique du Solide
Μ.	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 - lère CLASSE

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

M. BOUGHON Pierre M. BOURIQUET Robert M. BREZINSKI Claude M. CELET Paul M. CHAMLEY Hervé M. COEURE Gérard M. CORDONNIER Vincent M. DEBOURSE Jean Pierre M. DYMENT Arthur M. ESCAIG Bertrand M. FAURE Robert M. FOCT Jacques M. GRANELLE Jean Jacques M. GRUSON Laurent M. GUILLAUME Jean M. HECTOR Joseph M. LABLACHE-COMBIER Alain M. LACOSTE Louis M. LAVEINE Jean-Pierre M. LEHMANN Daniel Mme LENOBLE Jacqueline M. LHOMME Jean M. LOMBARD Jacques M. LOUCHEUX Claude M. LUCQUIN Michel M. MAILLET Pierre M. MIGNOT Fulbert M. PAQUET Jacques M. PROUVOST Jean M. ROUSSEAU Jean-Paul M. SALMER Georges M. SEGUIER Guy M. SIMON Michel M. STANKIEWICZ François M. TILLIEU Jacques M. VIDAL Pierre M. ZEYTOUNIAN Radyadour

Algèbre Biologie Végétale Analyse numérique Géologie générale Géotechnique Analyse Informatique Gestion des entreprises Mécanique Physique du solide Mécanique Métallurgie Sciences Economiques Algèbre Microbiologie Géométrie Chimie organique Biologie végétale Paléontologie Géométrie Physique atomique et moléculaire Chimie organique biologique Sociologie Chimie physique Chimie physique Sciences économiques Analyse numérique Géologie générale Minéralogie Physiologie animale Electronique Electrotechnique Sociologie Sciences économiques Physique théorique Automatique

#### PROFESSEURS - 2ème Classe

Mécanique

M. ANTOINE Philippe
M. BART André
Mme BATTIAU Yvonne
M. BEGUIN Paul
M. BELLET Jean
M. BERZIN Robert
M. BKOUCHE Rudolphe
M. BODARD Marcel
M. BOSCQ Denis
M. BRASSELET Jean-Paul

Analyse Biologie animale Géographie Mécanique Physique atomique et moléculaire Analyse Algèbre Biologie végétale Probabilités Géométrie et topologie M. BRUYELLE Pierre M. CAPURON Alfred M. CARREZ Christian M. CAYATTE Jean-Louis M. CHAPOTON Alain M. COQUERY Jean-Marie Mme CORSIN Paule M. CORTOIS Jean M. COUTURIER Daniel M. CROSNIER Yves M. CURGY Jean-Jacques Mle DACHARRY Monique M. DAUCHET Max M. DEBRABANT Pierre M. DEGAUQUE Pierre M. DELORME Pierre M. DELORME Robert M. DE MASSON D'AUTUME Antoine M. DEMUNTER Paul M. DENEL Jacques M. DE PARIS Jean-Claude M11e DESSAUX Odile M. DEVRAINNE Pierre M. DHAINAUT André Mme DHAINAUT Nicole M. DORMARD Serge M. DOUKHAN Jean-Claude M. DUBOIS Henri M. DUBRULLE Alain M. DUBUS Jean-Paul M. DUPONT Christophe M. FAKIR Sabah M. FONTAINE Hubert M. FOUQUART Yves M. FRONTIER Serge M. GAMBLIN André M. GLORIEUX Pierre M. GOBLOT Rémi M. GOSSELIN Gabriel M. GOUDMAND Pierre M. GREGORY Pierre M. GREMY Jean-Paul M. GREVET Patrick M. GUILBAULT Pierre M. HENRY Jean-Pierre M. HERMAN Maurice M. JACOB Gérard M. JACOB Pierre M. JACQUILLAT Bertrand M. JEAN Raymond M. JOFFRE Patrick M. JOURNEL Gérard

Géographie Biologie animale Informatique Sciences économiques Electronique Psychophysiologie Paléontologie Physique nucléaire et corpusculaire Chimie organique Electronique Biologie Géographie Informatique Géologie appliquée Electronique Physiologie animale Sciences économiques Sciences économiques Sociologie Informatique Analyse Spectroscopie de la réactivité chimique Chimie minérale Biologie animale Biologie animale Sciences économiques Physique du solide Spectroscopie hertzienne Spectroscopie hertzienne Spectrométrie des solides Vie de la firme (I.P.A.) Algèbre Dynamique des cristaux Optique atmosphérique Ecologie numérique Géographie urbaine, industrielle et démographi Physique moléculaire et rayonnements atmosphérique: Algèbre Sociologie Chimie physique I.P.A. Sociologie Sciences économiques Physiologie animale Génie mécanique Physique spatiale Informatique Probabilités et statistiques Gestion Biologie des populations végétales Vie de la firme (I.P.A.) Spectroscopie hertzienne

M. KREMBEL Jean M. LANGRAND Claude M. LATTEUX Michel Mme LECLERCO Ginette M. LEFEVRE Christian Mlle LEGRAND Denise Mile LEGRAND Solange Mme LEHMANN Josiane M. LEMAIRE Jean M. LE MAROIS Henri M. LHENAFF René M. LOCQUENEUX Robert M. LOSFELD Joseph M. LOUAGE Francis M. MACKE Bruno M. MAIZIERES Christian M. MESSELYN Jean M. MESSERLIN Patrick M. MONTEL Marc Mme MOUNIER Yvonne Mme N'GUYEN VAN CHI Régine M. PARSY Fernand M. PASZKOWSKI Stéphan Mlle PAUPARDIN Colette M. PERROT Pierre M. PERTUZON Emile M. PONSOLLE Louis M. PORCHET Maurice M. POVY Lucien M. RACZY Ladislas M. RAOULT Jean-François M. RICHARD Alain M. RIETSCH François M. ROBINET Jean-Claude M. ROGALSKI Marc M. ROY Jean-Claude M. SCHAMPS Joël Mme SCHWARZBACH Yvette M. SLIWA Henri M. SOMME Jean Mlle SPIK Geneviève M. STAROSWIECKI Marcel M. STERBOUL François M. TAILLIEZ Roger Mme TJOTTA Jacqueline M. TOULOTTE Jean-Marc M. TURREL Georges M. VANDORPE Bernard M. VAST Pierre M. VERBERT André M. VERNET Philippe M. WALLART Francis M. WARTEL Michel M. WATERLOT Michel Mme ZINN Justin Nicole

Biochimie Probabilités et statistiques Informatique Catalyse Pétrologie Algèbre Algèbre Analyse Spectroscopie hertzienne Vie de la firme (I.P.A.) Géographie Physique théorique Informatique Electronique Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques Automatique Physique atomique et moléculaire Sciences économiques Physique du solide Physiologie des structures contractiles Géographie Mécanique Analyse numérique Biologie physiologie végétales Chimie appliquée Physiologie animale Chimie physique Biologie animale Automatique Electronique Géologie structurale Biologie animale Physique des polymères E.U.D.I.L. Analyse Psychophysiologie Spectroscopie moléculaire Géométrie Chimie organique Géographie Biochimie Informatique Informatique Génie alimentaire Mathématiques Automatique Spectrochimie infrarouge et Raman Chimie minérale Chimie inorganique Biochimie Génétique Spectrochimie infrarouge et Raman Chimie inorganique Géologie générale Algèbre

Je remercie Dominique STEHELIN non seulement de m'avoir accueilli (et surtout gardé) dans son laboratoire, mais également pour ses conseils et sa participation à cette thèse (merci, chef).

Pour Simon SAULE, je serai bref (je ne voudrais pas te faire ricaner). Simon, merci de tout coeur.

Ce mémoire relate un travail de groupe et je remercie Brigitte DEBUIRE et son équipe pour leur collaboration fructueuse et amicale, ainsi que G.CALOTHY et son équipe.

Je remercie Monsieur le Professeur J.MONTREUIL d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse et Monsieur le Professeur J.KREMBEL d'en être le rapporteur.

Je remercie Monsieur le Docteur J.M BLANCHARD d'avoir bien voulu juger ce travail.

Je remercie Agnès BEGUE, la dompteuse de phages et Christian LAGROU qui, thèse après thèse, reste le maître inconstesté de la culture cellulaire.

Je remercie Nicole DEVASSINE, CHOPIN de l'Exxon, qui ne s'est pas laissé impressionner par cette partition et notamment par le dernier mouvement (la bibliographie).

Je remercie l'équipage de l'U186 avec qui je rame sur la grande mer de l'Oncologie Moléculaire dans une ambiance de croisière.

Je remercie Monsieur P.SICARD et Monsieur J.SAMAILLE ainsi que l'Association pour la Recherche contre le Cancer à qui je dois l'aide financière qui m'a été apportée pendant la préparation de cette thèse.

#### PUBLICATIONS

```
(* Travaux présentés dans ce mémoire)
```

- 1\* BECHADE,C., CALOTHY,G., and PESSAC,B. MARTIN,P., COLL,J., DENHEZ,F., SAULE,S., GHYSDAEL,J. and STEHELIN,D. (1985). Induction of proliferation or transformation of neuroretina cells by the mil and myc viral oncogènes Nature 316 : 559-562
- 2\* MARTIN,P., HENRY,C., FERRE,F., BECHADE,C., BEGUE,A., CALOTHY,G., DEBUIRE,B., STEHELIN,D. and SAULE,S. (1986). Characterization of a myc-containing retrovirus generated by propagation of an MH2 viral subgenomic RNA J. Virol. 57 : 1191-1194
- 3. COLL,J., SAULE,S., MARTIN,P., RAES,M.B., LAGROU,C., GRAF,T., BEUG,H., SIMON,I.E. and STEHELIN,D. (1983). The Cellular Oncogenes c-myc, c-myb and c-erb Are Transcribed in Defined Types of Avian Hematopietic Cells Exp. Cell Res. 149: 151-162
- 4. GAZIN,C., DUPONT de DINECHIN,S., HAMPE,A., MASSON,J.M., MARTIN,P., STEHELIN,D. and GALIBERT,F. (1984). Nucleotide sequence of the human c-myc locus: provocative open reading frame within the first exon EMBO Journal 32 : 383-387
- 5. DEBUIRE,B., HENRY,C., BENAISSA,M., BISERTE,G. D.CLAVERIE,J.M. SAULE,S., MARTIN,P., and STEHELIN. (1984). Sequencing the erbA Gene of Avian Erythroblastosis Virus Reveals a New Type of Oncogene Science 224: 1456-1459

- 6. SAULE,S., MARTIN,P., GEGONNE,A., BEGUE,A., LAGROU,C. and STEHELIN,D. (1984). Increased Transcription of the c-myc Oncogene in Two Methylcholanthrene-induced Quail Fibroblastic Cell Lines Exp. Cell Res. 155: 496-506
- 7. TATOSYAN,A.G., GALETZKI,S.A., KISSELJOVA,N.P., ASANOVA,A.A, ZBOROVSKAYA,I.B., SPITKOVSKY,D.D., REVASOVA,E.S., MARTIN,P., and KISSELJOV,F.L. (1985). Oncogene expression in human tumors Int. J. Cancer 35 : 731-736

#### Articles sous presse:

- \* MARTIN,P., HENRY,C., DENHEZ,F., AMOUYEL,P., BECHADE,C., CALOTHY,G., DEBUIRE,B., STEHELIN,D. and SAULE,S. Characterization of a MH2 mutant lacking the v-myc oncogene Accepté à Virology
- \* MARTIN, P., HENRY, C, FERRE, F., DUTERQUE-COQUILLAUD, M., LAGROU, C., GHYSDAEL, J., DEBUIRE, B., STEHELIN, D. and SAULE, S. Transformation of quail embryo fibroblasts by a retrovirus carrying a normal human c-myc gene Accepté à l'EMBO Journal

#### Jargon et abréviations usuelles

- A.A : Acide Aminé.

- Activation : modification entrainant le déréglement d'un gène.

- ALV : "Associated Leukosis Viruses", rétrovirus compétents pour la réplication et dépourvus de gène oncogène.

- BL : "Burkitt Lymphoma", Lymphome de Burkitt.

- CNR : Cellules de NeuroRétine d'embryon de poulet de 7 jours.

- <u>c-onc</u> : séquence cellulaire homologue à un oncogène viral (<u>v-onc</u>). Par extension, gène cellulaire susceptible d'être impliqué dans la transformation.

- "core" : capside nucléoprotéique du virion.

- DLV : "Defective Leukemia Viruses", rétrovirus oncogène défectif pour la réplication.

- "enhancer" : séquences activatrices de la transcription.

- env : gène de structure viral codant pour des protéines de l'enveloppe.

- FEC : Fibroblastes Embryonnaires de Caille.

- FEP : Fibroblastes Embryonnaires de Poulet.

- gag : gène de structure viral codant pour des protéines formant le "core".

- "helper" : virus compétent pour la réplication (ALV) nécessaire à la propagation des DLV.

- IgH : gènes des chaines Lourdes des Immunoglobulines.

- IgK : gènes des chaines légères Kappa des Immunoglobulines.

- IgL : gènes des chaines légères Lambda des Immunoglobulines.

- kb : "kilobases", millier de bases (unité de taille de l'ARN)

- kbp : "kilobases-pairs", millier de paires de bases (unité de taille de l'ADN).

- kd : kilodalton.

- LTR : Long Terminal Repeat", séquence d'ADN spécifique, présente à chaque extrémité du génome du provirus, ayant un rôle capital dans la transcription et la réplication des rétrovirus.

- "LTR activation" : activation d'un gène cellulaire (par augmentation de sa transcription) due à l'insertion d'un "LTR" dans le locus de ce gène.

- <u>pol</u> : gène viral codant pour la rétropolymérase, enzyme spécifique des rétrovirus et capable de synthétiser un ADN double brin à partir d'un ARN servant de matrice.

- RAV-1 : un des membres des ALV, utilisé comme "helper" pour propager des mutants défectifs pour la réplication.

- transduction : mécanisme (encore mal connu) grâce auquel les rétrovirus s'approprient des séquences d'origine cellulaire.

### TABLE des MATIERES

INTRODUCTION
I) LES RETROVIRUS
A) Morphologie
B) Cycle infectieux et contenu génétique
C) Les différents modes d'expression des v-onc
D) Origine des v-onc
E) Nomenclature des v-onc, des c-onc et de leurs produits
F) Pathologie des virus oncogènes
-,
II) LES <u>c-onc</u> P.11
III) DIFFERENCES ENTRE <u>c-onc</u> ET <u>v-onc</u> P.12
IV) MODES DE TRANSFORMATION PAR LES v-onc
A) Protéine oncogène homologue à un facteur de croissance
B) Protéines oncogènes homologues à des récepteurs de facteur
de croissance
C) Protéines oncogènes tyrosine kinases, localisées sur la face
interne de la membrane plasmique
D) Protéines oncogènes de la famille <u>ras</u>
E) Protéines oncogènes sérine/thréonine kinases
F) Protéines oncogènes à localisation nucléaire
V) ACTIVATION DES <u>c-onc</u> ET CANCERSP.18
A) Gènes activés détectés par le test NIH <sub>3T3</sub>
1) Modes d'activation des gènes cellulaires <u>ras</u>
2) Efficacité du test NIH <sub>3T3</sub>
B) Gènes activés par des remaniements
1) Le gène cellulaire <u>myc</u> ( <u>c-myc</u> )
a) Structure et propriétés du gène <u>c-myc</u>
b) Fonction du gène <u>c-myc</u>
2) Activation du gène <u>c-myc</u> par "LTR activation"

<ul> <li>3) Activation du gène <u>c-myc</u> par translocation chromosomique</li> <li>a) Modifications struturales du gène <u>c-myc</u> dans les lymphomes de Burkitt</li> <li>b) Quels sont les effets de ces translocations sur le gène <u>c-myc</u>?</li> </ul>
<ul> <li>4) Activation du gène <u>c-myc</u> par amplification génique</li> <li>C) Coopération de gènes et tumorigénèse</li> </ul>
PRESENTATION DU TRAVAIL
RESULTATS ET DISCUSSION
I) PROPRIETES BIOLOGIQUES DES DEUX GENES <u>v-myc</u> ET <u>v-mil</u> DE MH2P.37
II) DISCUSSION
A) Proprietes du gene $\underline{v-myc}$ de MH2 B) Célection des mutants biologiques a must
B) Selection des mutants biologiques <u>v-myc</u>
C) proprietes du gene $\sqrt{-m11}$ de MHZ
b) Activite kindse de la proteine $v$ -mil et protifieration
E) Le gene $\underline{v-mil}$ de MH2 est-11 oncogene?
F) Selection des mutants biologiques $v-mil$
G) Cooperation des genes <u>v-myc</u> et <u>v-mil</u>
III) POUVOIR TRANSFORMANT DU GENE HUMAIN mycP.44
IV) DISCUSSIONP.45
CONCLUSIONS
BIBLIOGRAPHIE
ARTICLE N° 1
ARTICLE N° 2P.77
ARTICLE N° 3 Accepté à VirologyP.82
ARTICLE N° 4 Accepté à l'EMBO JournalP.101

### INTRODUCTION

Dans l'introduction de ce mémoire nous avons tenté de résumer les résultats des recherches menées sur les rétrovirus oncogènes pour étudier au niveau moléculaire les processus complexes impliqués dans la cancérogénèse. C'est surtout depuis les années soixante-dix, grâce aux progrès de la biologie moléculaire, que l'étude des rétrovirus oncogènes a permis de focaliser les recherches sur un sous-ensemble de gènes probablement impliqués dans ces processus. En effet, les rétrovirus doivent leur pouvoir oncogène à des séquences spécifiques (v-onc) qu'ils ont intégrées dans leur génome (transduction) à partir de séquences cellulaires (c-onc) qui ont probablement un rôle important à jouer dans la cellule normale. L'étude des v-onc et des c-onc a conduit d'une part à l'élaboration d'hypothèses sur le mode d'action des v-onc pour la transformation cellulaire et d'autre part à l'implication de la dérégulation (activation) de certains c-onc dans l'apparition des cancers spontanés par des mutations ou des remaniements chromosomiques affectant ces c-onc. De plus, dans certaines tumeurs sont activés deux oncogènes pour lesquels une coopération est nécessaire dans la transformation in vitro de fibroblastes embryonnaires. Il semble donc que la connaissance du mode d'activation des c-onc et la mise en évidence de différents exemples de leur coopération pourrait permettre d'établir des modèles pour l'étude in vitro des étapes successives de déréglements observées dans l'apparition des cancers non viro-induits.

La première partie des travaux présentés dans ce mémoire décrit d'une part un tel modèle de coopération pour la transformation cellulaire entre deux <u>v-onc</u>, <u>v-mil</u> et <u>v-myc</u> présents dans le génome d'un même rétrovirus, MH2, d'autre part la caractérisation des mutants de MH2 qui ont été nécessaires à la mise en évidence de cette coopération.

La seconde partie décrit un mode d'activation du gène <u>c-myc</u> suffisant pour conférer à ce gène des propriétés biologiques semblables à son homologue viral. Nous envisageons en effet d'étudier si la coopération des gènes <u>v-mil</u> et <u>v-myc</u> peut être étendue à leurs homologues cellulaires activés afin d'établir un modèle qui pourrait servir d'approche pour l'étude de cancers où ces deux gènes cellulaires seraient activés ensembles.



Schéma 1: Morphologie d'une particule virale

#### I) LES RETROVIRUS: (revue: RNA Tumor Viruses, 1982; 1985)

Les rétrovirus sont des virus à ARN qui ont comme hôtes des cellules eucaryotes et dont la réplication du génome passe par la formation d'un ADN double brin. Cet intermédiaire à ADN est synthétisé, à partir de l'ARN viral servant de matrice, par une enzyme spécifique des rétrovirus, la rétrotranscriptase (ou rétropolymérase).

Trois sous-familles de virus répondent à cette définition:

. <u>les spumavirus</u> qui produisent des infections chroniques dans de nombreuses espèces, mais ne semblent pas causer de maladies (Ruckle 1958a; Jonhston, 1971; Stiles et al. 1964).

. <u>les lentivirus</u> qui induisent, après une longue période d'incubation, des pneumonies chroniques et une dégénérescence du système nerveux, particulièrement chez les ovins (Weinholb et Triemer, 1978).

. <u>les oncovirus</u> qui seront les seuls décrits dans ce mémoire et qui sont les plus étudiés. En effet, en dépit de la simplicité de leur génome ils induisent toute une variété de cancers chez l'animal en des délais souvent très courts. Ces rétrovirus oncogènes fournissent un modèle expérimental de choix qui, grâce aux progrès de la biologie moléculaire, a permis d'entreprendre l'étude au niveau moléculaire des mécanismes qui peuvent amener une cellule à se transformer et à échapper aux contrôles de l'organisme.

Depuis 1911 (date à laquelle Rous isola, chez le poulet, le premier rétrovirus sarcomatogène) des rétrovirus ont été isolés chez de nombreux vertébrés. Les plus étudiés des oncovirus ont comme hôtes le poulet, la souris, le chat, le singe et l'homme. Bien que généralement ces virus soient spécifiques de l'espèce qu'ils infectent, leur structure et leur mode de réplication sont très semblables.

Pour décrire la structure et le cycle infectieux de ces rétrovirus, nous prendrons comme modèle les oncovirus aviaires qui sont les rétrovirus particulièrement étudiés dans notre laboratoire.

#### A) Morphologie (schéma 1)

Au microscope électronique, le virion se présente sous forme d'une particule sphérique d'environ 100 nm de diamètre (Sharp et Bernhard, 1952; Bernhard, 1958). Cette particule est entourée du fragment de membrane cytoplasmique emprunté à la cellule lors de son extrusion par bourgeonnement. Cette enveloppe est parsemée de spicules qui sont des

- 3 -



Schéma 2: Génome des rétrovirus et compétence pour la réplication

glycoprotéines dont la séquence protéique (<u>env</u>) est codée par le virus lui-même (Rifkin et Compans, 1971). Ces glycoprotéines interviennent dans la reconnaissance virus-cellule par l'intermédiaire de récepteurs cellulaires non encore identifiés (Vogt, 1977). Le "core" ou nucléocapside, un icosaèdre formé à partir des protéines <u>gag</u> codées par le virus, renferme un dimère d'ARN (Mangel et al., 1974; Weissman et al., 1975) et quelques molécules de rétrotranscriptase (Baltimore, 1970; Temin et Mizutami, 1970; Panet et al., 1975a; Krakower et al., 1977).

#### B) Cycle infectieux et contenu génétique:

On peut distinguer deux sortes d'oncovirus suivant leur pouvoir oncogène: les ALV ("Associated Leucosis Viruses") peu ou non oncogènes in vivo et non transformants in vitro et les DLV ("Defective Leukemia Viruses") induisant rapidement des cancers in vivo et capables de transformer des cellules en culture.

Ces différences dans les propriétés biologiques se retrouvent au niveau du contenu génétique des deux sortes d'oncovirus. Le génome des ALV est représenté par un ARN qui ne contient que les séquences nécessaires au cycle infectieux. Le génome des DLV est représenté par un ARN défectif pour la propagation à cause de l'absence de séquences virales remplacées par des séquences spécifiques (<u>v-onc</u>) d'origine cellulaire. Les DLV ont donc besoin pour se propager d'un ALV, appelé dans ce cas "helper". Le virus de sarcome de Rous (RSV) constitue la seule exception: il est hautement oncogène mais il n'est pas défectif pour la réplication, l'acquisition de ses séquence spécifiques s'étant faite sans perte de séquences virales nécessaires au cycle infectieux (schéma 2).

Le nom des virus oncogènes est en général une abbréviation rappelant le type de cancer qu'il induit et/ou le nom de la personne qui l'a isolé et/ou le lieu où il a été isolé, par exemple RSV pour Rous Sarcoma Virus (Rous, 1911), MH2 pour Mill-Hill (Centre de recherche Anglais) isolat N° 2 (Begg, 1927).

La propagation de ces virus peut se décomposer en 3 étapes:

<u>l'infection</u> qui commence par une association cellule/virus grâce à des récepteurs membranaires s'associant aux spicules du virus (adsorption) et se termine avec l'intrusion du "core" viral dans le cytoplasme cellulaire (pénétration) par un mécanisme encore inconnu.

<u>la réplication</u>, où l'acteur principal est la rétrotranscriptase virale qui assure la rétrotranscription de l'ARN en ADN double brin, lequel est intégré sous forme de provirus dans le génome de la cellule hôte. Ce provirus, alors considéré par la cellule comme faisant partie de son génome au même titre qu'un gène cellulaire normal, est pris en charge

- 4 -

ARN génomique



ARN sous-génomique Cap. env 3' 5' GPPP บ่3 S.D/S.A Ŕ Ú5 Pr 57<sup>env</sup> glycosylation gPr92 env clivage (상) gp85 qp37

BU

<u>Schéma 3</u>: -Structure des ARN génomique et sous-génomique d'un ALV

> Les protéines virales et leurs maturations

par la machinerie cellulaire qui assure:

<u>l'expression</u> des ARN viraux, la <u>maturation</u> des protéines virales, l'<u>assemblage</u> du core permettant l'<u>encapsidation</u> des ARN, l'<u>acquisition</u> de l'enveloppe par bourgeonnement et l'<u>extrusion</u> des particules virales matures.

Pour mener à bien ces différentes étapes, le rétrovirus possède dans son génome, outre les séquences codant pour les protéines virales, divers signaux de régulation. L'ARN du "helper" est capuchonné (Cap) en 5' et est terminé en 3' par une queue d'environ 200 résidus Adénosines (poly A ou  $A_n$ ), comme la plupart des ARN messagers eucaryotes. La séquence primaire de cet ARN d'environ 8.000 nucléotides peut être décrite comme la suite de régions fonctionnelles dont les tailles varient sensiblement selon les virus considérés:

5' Cap-R-U5-L-gag-pol-env-C-U3-R-(A)<sub>n</sub> 3' (schéma 3)

-La région R (16 nucléotides), répétée aux deux extrémités, joue un rôle dans la rétrotranscription de l'ARN en ADN (Haseltine et al., 1977; Coffin et al., 1978; Swanstrom et al., 1981a).

-La région U5 (80 nucléotides) n'a pas de fonction connue.

-La région L (300 nucléotides) contient:

une séquence complémentaire de l'extrémité 3' d'un tARN, qui en s'hybridant à cette région, sert d'amorce pour la synthèse du premier brin d'ADN, ADN (-), lors de la rétrotranscription (Dahlberg et al., 1974; Peters et al., 1977; Peters et Dahlberg, 1979).

. une séquence qui serait le site de fixation des ribosomes (Petersen et Hackett, 1985).

. des séquences impliquées dans l'encapsidation des ARN viraux (Shank et Linial, 1980, Nishizawa et al., 1985).

-Le gène gag (2.100 nucléotides) dont l'AUG initiateur est situé juste en 3' de la séquence L, code pour un précurseur de 76 kilodaltons (kd), Pr76<sup>gag</sup> qui est phosphorylé (Eisenman et Vogt, 1978). Ce précurseur donne naissance par clivage à cinq protéines p19, p10, p27, p12, p15 (de 19, 10, 27, 12 et 15 kd respectivement), qui formeront le "core" protéique des virions. Le clivage de Pr76<sup>gag</sup> est probablement réalisé dans la cellule par la p15 qui est capable de le réaliser in vitro (Von der Helm, 1977).

Un site donneur d'épissure (S.D), situé 18 nucléotides en 3' de l'AUG de gag (Schwartz et al., 1983), est essentiel pour produire l'ARN sous-génomique utilisé pour la synthèse des protéines <u>env</u>. Ce mécanisme d'épissure apporte au gène <u>env</u> les séquences nécessaires à sa traduction, dont l'AUG initiateur du gène gag. Dans certains rétrovirus oncogènes, l'ARN messager nécessaire à la traduction du gène <u>v-onc</u> est obtenu par ce même mécanisme faisant intervenir le site donneur d'èpissure du gène <u>gag</u> et un site accepteur d'épissure généralement apporté par le v-onc.

Le gène <u>gag</u> est supposé contenir, en 3' du site donneur d'épissure, des séquences d'encapsidation (Pugatsch et Stacey, 1983). Ces séquences, éliminées par le mécanisme d'épissage, seraient donc absentes des ARN sous-génomiques.

Des séquences du gène <u>gag</u> pourraient être traduites, à partir d'un autre cadre de lecture, en une protéine de 123 Acides Aminés qui serait un activateur de la transcription (Broome et Gilbert, 1985).

-Le gène pol (2.600 nucléotides) code pour la rétrotranscriptase, protéine remarquable par ses propriétés: synthèse du brin d'ADN (-) complémentaire de l'ARN utilisé comme matrice (Temin et Baltimore, 1972; Haseltine et al., 1976), activité RNAse-H qui dégrade spécifiquement l'ARN de l'hybride ARN-ADN (Verma, 1977), synthèse du brin d'ADN (+) (Varmus et al., 1979b), activité endonucléasique qui pourrait participer à l'intégration de l'ADN proviral dans le génome de la cellule infectée (Grandgenett et al., 1978; Grandgenett et Ajaykumar, 1985).

La rétrotranscriptase mature est formée de deux sous-unités, A (58 kd) et B (92 kd), A étant la partie NH2 terminale de B. La sous-unité B est elle-même obtenue par clivage d'un précurseur de 180 kd, Pr1809ag-pol (Opperman et al., 1977; Witte et Baltimore, 1978). La synthèse, en un seul produit, des gènes <u>gag</u> et <u>pol</u> dont les cadres de lecture ouverts sont dans une phase différente, semble être rendue possible par un comportement inhabituel des ribosomes: changement de phase de lecture en cours de traduction (Jacks et Varmus, 1985).

-<u>Le gène env</u> (1.800 nucléotides) contient le site accepteur d'épissure (S.A) qui, à partir de l'ARN génomique, se raboute au site d'épissure donneur du gène <u>gag</u> pour former l'ARN sous-génomique (ARN S.G.) (Lee et al., 1979; Hayward, 1977; Weiss et al., 1977) de structure:

5' Cap-R-U5-L-
$$2$$
gag-env-C-U3-R-(A)<sub>n</sub> 3' (schéma 3)

( ఏ gag désignant les 18 nucléotides du gène <u>gag</u> situés en amont du S.D). Cet ARN S.G est traduit en un précurseur de 57 kd (Pr57<sup>env</sup>), qui est alors glycosylé (gPr92<sup>env</sup>) (Hayman, 1978b) et clivé en une gp85 et une gp37. Ces deux protéines sont ensuite réunies par des ponts disulfures et fixées à la surface externe de la membrane cytoplasmique (Leamnson et Halpern, 1976). Ces protéines d'enveloppe formeront les spicules virales lorsque le core protéique s'entourera d'un fragment de la membrane cytoplasmique par bourgeonnement.

- 6 -



<u>Schéma 4</u>: Rétrotranscription de l'ARN viral et Intégration de l'ADN double brin (d'après Gilboa et al., 1979)

Gilboa et al.,

-<u>La région C</u> (250 nucléotides) contient probablement des séquences d'encapsidation (Sorge et al., 1983) et se termine par une séquence de 11 nucléotides où s'initierait le brin d'ADN (+) lors de la rétrotranscription (Resnick et al., 1984).

-La région U3 (260 nucléotides) se termine par le signal de polyadénylation AAUAAA (Proudfoot et Brownlee, 1976), mais bien loin de ne servir qu'à signaler la fin de la transcription, cette région U3 est en fait le chef d'orchestre de la transcription virale assurée par la RNA polymerase II de la cellule hôte (Dinowitz 1975). En effet, une des astuces des rétrovirus consiste, lors de la rétrotranscription, à dupliquer cette séquence U3 de telle sorte que dans l'ADN proviral elle se retrouve juste à l'extrémité 5' du provirus où elle va pouvoir pleinement jouer son rôle. La région U5 est elle aussi dupliquée, à l'extrémité 3' de l'ADN viral qui a en fin de rétrotranscription la structure linéaire suivante:

5' U3-R-U5-L-gag-pol-env-C-U3-R-U5 3' (schéma 4)

les régions U3-R-U5, répétées aux deux extrémités de l'ADN, sont désignées sous le terme de LTR ("Long Terminal Repeat"). L'ADN viral est ensuite circularisé (Shank et Varmus, 1978) et c'est sous cette forme qu'il migre dans le noyau de la cellule hôte pour s'intégrer dans le génome de celle-ci (c'est alors un provirus), avec la polarité :

#### ADN cellulaire-LTR-L-gag-pol-env-C-LTR-ADN cellulaire (schéma 4)

(Hughes et al., 1978; Sabran et al., 1979). C'est dans le provirus que la région U3 dirige la transcription des ARN viraux grâce aux séquences qu'elle renferme. La séquence initiatrice ou "TATA box" commune à de nombreux gènes cellulaires (Yamamoto et al., 1980a), et une séquence promotrice de 70 nucléotides situés en 5' de la "TATA box", sont capables d'assurer à elles seules la transcription virale à un taux comparable à celui de la transcription d'ARN cellulaires. Ce taux est multiplié par 15 fois (Cullen et al., 1985b) sous l'effet de la séquence activatrice de transcription ("enhancer"), longue de 80 bases et située en 5' dans U3 (Cullen et al., 1985a,b). Ce type de séquence "enhancer" stimule la transcription de gènes adjacents (en cis), indépendemment de leur orientation et à des distances relativement grandes (1 à 20 kbp) (Koury et Gruss; 1983). Des séquences similaires existent dans la cellule et certaines, tissu-spécifiques, contrôlent la transcription de gènes particuliers, ceux des chaînes d'immunoglobulines par exemple, induisant une forte expression de ces gènes dans les lymphocytes B (Banerji et al.,

- 7 -









<u>Schéma 5</u>: Différents modes d'expression d'un v-onc

A

1983; Gillies et al., 1983). Les "enhancers" viraux semblent régulés en trans par des facteurs non encore identifiés qui nécessitent la synthèse protéique cellulaire (Dyson et al., 1982; Linial et al., 1985).

L'intégration et l'expression des rétrovirus contenant un <u>v-onc</u> s'effectuent par les mêmes mécanismes décrits plus haut, et ne semblent pas nécessiter la synthèse de novo de protéines virales, les molécules de rétrotranscriptase présentes dans le virion étant suffisantes pour assurer la phase d'intégration.

#### C) Les différents modes d'expression des v-onc

Les mécanismes, qui sont mal connus, de la transduction de séquences cellulaires par un rétrovirus ont pour résultat final l'insertion d'un <u>v-onc</u> dans le génome de ce rétrovirus. Une des premières modifications que subissent les séquences cellulaires lors de leur transduction est la perte de la plupart de leurs séquences introniques. Le <u>v-onc</u> est alors une forme compactée proche de l'ARN messager du <u>c-onc</u>. Le point d'insertion de ce <u>v-onc</u> dans le génome du rétrovirus a une influence sur la structure du produit de ce <u>v-onc</u>: le schéma 5 résume les différents cas observés.

1) le <u>v-onc</u> est inséré à la suite et dans la même phase de lecture que des gènes de structure, le produit spécifique du virus est une polyprotéine de fusion (généralement gag-onc) (schéma 5A).

2) le <u>v-onc</u> est exprimé à partir d'un ARN sous-génomique résultant du raboutage du site donneur d'épissure du gène <u>gag</u> avec un site accepteur apporté par le <u>v-onc</u>. La protéine <u>v-onc</u> est cette fois encore un produit de fusion, elle contient les 6 premiers Acides Aminés du gène <u>gag</u> (<u>5 gag</u>). Cependant, par convention, elle n'est pas désignée comme étant une polyprotéine de fusion (schéma 5B).

3) les codons d'initiation et de terminaison de la traduction sont apportés par le <u>v-onc</u>, la protéine <u>v-onc</u> n'est fusionnée à aucun peptide d'origine virale (schéma 5C).

#### D) Origine des v-onc

Les rétrovirus oncogènes sont le produit d'une recombinaison entre un virus et des séquences cellulaires et certains de ces rétrovirus ont pu être obtenus après passages successifs d'un virus "helper" dans des animaux de laboratoire (Harvey, 1964; Moloney, 1966; Stavnezer et al., 1981; Yamamoto et al., 1983a; Neil et al., 1984). Les mécanismes de la transduction sont inconnus, néanmoins des modèles ont été proposés (Graf et Stéhelin, 1982; Bishop, 1983) impliquant des recombinaisons soit au niveau de l'ADN entre le provirus intégré et un gène cellulaire, soit au niveau de l'ARN faisant intervenir des sauts de la rétrotranscriptase entre l'ARN du

	ISOLAT d'ORIGINE	ESPECE HOTE	PROTEINE	LOCALISATION	PROPRIETE
sis	virus sarcomatogène simien	singe	p28 <sup>sis</sup>	cytoplasme, excrétée	?
erbB	virus de l'érythroblastose aviaire, souche ES4	poulet	gp68erbB	membranes	tyrosine phosphokinase
fms	virus sarcomatogène félin, souche Mac-Donough	chat gl	2180gag-fms	membranes	tyrosine phosphokinase
ros	virus de sarcome aviaire UR2	poulet	P68gag-ros	membranes	tyrosine phosphokinase
src	virus du sarcome de Rous	poulet caille	pp60 <sup>src</sup>	membranes	tyrosine phosphokinase
yes	virus du sarcome aviaire Y73	poulet	p90gag-yes	?	tyrosine phosphokinase
fps/fes	virus sarcomatogène de Fujinami	poulet	P1409ag-fps	membranes	tyrosine phosphokinase
abl	virus de la leucémie murine d'Abelson	souris	P120gag-abl	membranes	tyrosine phosphokinase
fgr	virus de sarcome félin souche Gardner-Rasheed	chat	<sub>P70</sub> gag-fgr	membranes	tyrosine phosphokinase
kit	virus de sarcome félin souche HZ4	chat	P80gag-kit	?	?

Tableau I: Les v-onc, leur isolat et espèce d'origine, la nomenclature, la localisation et les propriétés de leur produit (suite page suivante) "helper" et un ARN cellulaire encapsidés dans un même virion.

Chez l'homme, des rétrovirus ont été isolés associés à des leucémies de type T ("Human T-Lymphocytes Viruses"): HTLV-I (Poiesz et al., 1980b; Miyoshi et al., 1981) et HTLV-II (Kalyanaraman et al., 1982b). Les rétrovirus associés au Syndrôme d'ImmunoDéficience Acquise (SIDA), appelés LAV ("Lymphotropic Associated Virus") (Barré-Sinoussi et al., 1983) ou HTLV-III (Gallo et al., 1984) sont apparentés aux lentivirus (Chiu et al., 1985). Ces rétrovirus ne contiennent pas de séquences oncogènes d'origine cellulaire, mais ils ont en plus des gènes de structures <u>gag</u>, <u>pol</u>, <u>env</u>, des séquences appelées X ou LOR ("Long Open Reading frame") supposées coder pour des protéines activatrices. Le serum de patients infectés par certains de ces virus précipite des protéines probablement codées par ces séquences (Lee et al., 1984c). Ces protéines ont un effet activateur sur la transcription virale, et pourraient être responsables du pouvoir oncogène des virus qui les expriment en activant également la transcription de gènes cellulaires (Sodroski et al., 1984b; Chen et al., 1985).

#### E) Nomenclature des v-onc, des c-onc, et de leurs produits:

Depuis la découverte du premier rétrovirus oncogène, une cinquantaine de ces rétrovirus ont été isolés à partir de tumeurs d'animaux de différentes espèces (principalement le poulet, la souris, le chat et le singe) et quelques 25 v-onc ont été répertoriés (tableau I). Certains v-onc ont été trouvés dans plusieurs virus différents: par exemple, v-fps et v-fes trouvés dans des isolats distincts, à la fois chez le poulet et le chat, ont été probablement transduits à partir du même gène cellulaire, commun aux deux espèces (Shibuya et al., 1980). Le second v-onc de MH2, v-mil (Coll et al., 1983a; Jansen et al., 1983a), est homologue à un v-onc murin, v-raf (Rapp et al., 1983b; Kan et al., 1984). La dénomination des v-onc par trois lettres, proposée par Coffin et al., (1981) selon les critères déja définis plus haut pour les rétrovirus, souffre quelques exceptions: les deux v-onc du virus de l'érythroblastose aviaire (AEV) (Lai et al., 1980; Vennstrom et al., 1982) sont désignés par v-erb-A et v-erb-B; les v-onc des deux virus de sarcome murin Ha-MSV et Ki-MSV, sont nommés v-Ha-Ras et v-Ki-ras respectivement, car bien qu'homologues, ils ont été transduits à partir de deux gènes cellulaires distincts (Ellis et al., 1981).

La nomenclature des produits des <u>v-onc</u> suit les mêmes règles que la dénomination des protéines de structure virales proposée par August et al., (1974): poids moléculaire en milliers de daltons, précédé de p (proteine), P (polyprotéine), Pr (précurseur), eux-mêmes précédés de g (glycosylation) p (phosphorylation) et en exposant, le nom des séquences codantes

- 9 -

	ISOLAT d'ORIGINE	ESPECE HOTE	PROTEINE	LOCALISATIO	N PROPRIETE	
Ha-ras	virus sarcomatogène murin de Harvey	rat	p21 <sup>Ha</sup> -ras	membrane plasmique	) fixent et hydro- ) lysent le GTP ) sérine/thréonine	
Ki-ras	virus sarcomatogène murin de Kirsten	rat	p21 <sup>Ki-</sup> ras	membrane plasmique	) phosphokinase )	
mil/raf	virus de la myélocytomatose aviaire, souche MH2	poulet	P100gag-mil	cytoplasme	sérine/thréonine phosphokinase	
mos	virus du sarcome murin de Moloney	souris	P37env-mos	cytoplasme	sérine/thréonine phosphokinase	
тус	virus de la myélocytomatose aviare, souche MC29	poulet	P1109ag-myc	noyau	affinité pour l'ADN	
myb	virus de la myéloblastose aviaire, souche BAI-A	poulet	p48myb	noyau	affinité pour l'ADN	
fos	virus d'ostéosarcome murin, souche FBJ	rat	p55fos	noyau	?	
ski	virus sarcomatogène aviaire, souche SKV770	poulet	P110gag-ski-po]	noyau	?	
ets	virus érythroblastosant aviaire, souche E26	poulet	P135gag-myb-ets	5 noyau	affinité pour l'ADN	
erbA	virus de l'érythroblastose aviaire, souche ES4	poulet	<sub>P75</sub> gag-erbA	cytoplasme	?	
rel	virus de la réticulo- endothéliose, souche T	dinde	P64env-rel	cytoplasme	?	
<u>Tableau I</u> (suite): Les <u>v-onc</u> , leur isolat et espèce d'origine, la nomenclature, la localisation et						

les propriétés de leur produit

(tableau I). Les séquences cellulaires homologues aux <u>v-onc</u> sont désignées sous le terme générique de <u>c-onc</u> et le nom de chaque <u>c-onc</u> est composé des trois lettres du v-onc correspondant, précédées de la lettre <u>c</u>.

#### F) Pathologie des virus oncogènes:

Ces rétrovirus se propagent difficilement et ont été maintenus en laboratoire. L'utilisation de virus portant des mutations thermosensibles dans les séquences oncogènes a permis de montrer que les <u>v-onc</u> sont responsables du pouvoir oncogène des rétrovirus. L'étude des maladies causées par ces rétrovirus est complexe, chacun d'eux induisant plusieurs types de cancers à des fréquences qui peuvent varier suivant le mode expérimental (fond génétique et age de l'animal, lieu d'inoculation du virus, nombre de particules virales injectées). De plus, les virus "helper" qui accompagnent les virus défectifs peuvent induire des anémies ou des hyperplasies et même certains néoplasmes (chez le poulet: des lymphomes de type B (Cooper et al., 1968; Neiman et al., 1980b), des ostéopétroses et des néphroblastomes (Ogura et al., 1974)).

Les rétrovirus ont des cellules cibles dont le type semble être corrélé avec les séquences oncogènes v-onc. Par exemple, les virus défectifs des leucémies aviaires (DLV) ont pour principales cibles des cellules hématopoïétiques. Ils ont été classés en virus érythroblastosants (AEV-ES4, AEV-H, E26), myéloblastosants (AMV, E26), et myélocytomatosants (MC29, MH2, CMII, OK10) (Graf et Stéhelin, 1982), et les membres de chaque groupe contiennent des séquences de même origine: erb-B, myb et myc respectivement (Roussel et al., 1979). Le virus E26 entame quelque peu la corrélation existant entre la nature de la maladie induite et le type de v-onc car s'il possède également un tropisme érythroblastosant (Radke et al., 1982)il ne contient pas de séquences erb-B. Les cellules de la möelle osseuse que ces virus transforment in vitro appartiennent à la même lignée que les cellules transformées in vivo (Beug et al., 1979; Gazzolo et al., 1979). Cette spécificité de cible n'est pas due à une restriction de propagation des DLV à certaines cellules puisqu'ils peuvent se répliquer dans des cellules appartenant à d'autres lignées hématopoïétiques (Graf et Stéhelin, 1982). La plupart des DLV sont capables également de transformer des fibroblastes en culture. La transformation des différents types cellulaires pourrait être sous le contrôle de différents domaines contenus dans un même v-onc. Des mutants des virus AEV et MC29 ont gardé la propriété de transformer les fibroblastes en culture et ont perdu celle de transformer leurs cibles hématopoïétiques (Royer-Pokora et al., 1979; Ramsay et al., 1980).

#### II) LES c-onc

En 1976 Stéhelin et al. ont montré l'existence de séquences homologues au gène <u>v-src</u> dans le génome de poulets indemnes de toute infection virale. Depuis, des séquences cellulaires homologues à chacun des <u>v-onc</u> ont été détectées chez tous les vertébrés testés. La conservation phylogénétique est remarquable pour certains d'entre eux, par exemple on retrouve même chez la levure des gènes homologues à <u>v-ras</u> (DeFeo-Jones et al., 1983; Gallwitz et al., 1983) dont les produits réagissent avec un anti-serum dirigé contre la  $p21^{ras}$  murine (Papageorge et al., 1984).

Leur stabilité phylogénétique ainsi que leur transduction dans des virus devenus ainsi oncogènes suggèrent que ces <u>c-onc</u> ont un rôle important à jouer dans la vie cellulaire normale. Cette proposition est aujourd'hui vérifiée pour certains d'entre eux: <u>c-sis</u> est le précurseur de la chaine B du "Platelet-Derived Growth Factor" (PDGF) (Johnsson et al., 1984), <u>c-erbB</u> et <u>c-fms</u> sont supposés être des versions tronquées respectivement du récepteur de l'"Epidermal Growth Factor" (EGF) (Downward et al., 1984) et du récepteur d'un facteur de croissance spécifique des macrophages (M-CSF ou CSF-1) (Sherr et al., 1985), les gènes RAS de la levure semblent indispensables pour la reprise de la vie végétative après la sporulation (Kataoka et al., 1984; Tatchell et al., 1984). Le rôle des autres <u>c-onc</u> est mal connu, mais certaines observations laissent supposer qu'ils pourraient intervenir dans les mécanismes induisant la division cellulaire:

1) les produits de huit <u>v-onc</u> ont une activité tyrosine kinase, l'attribution de cette fonction aux <u>c-onc</u> correspondant est bien étayée pour quatre d'entre eux: <u>c-src</u> (Collet et al., 1979b, 1980; Opperman et al., 1979; Rohrschneider et al., 1979; Hunter et Sefton, 1980; Levinson et al., 1981), <u>c-erb-B</u> (Carpenter, 1984), <u>c-fps</u> (Mathey-Prévot et al., 1982), <u>c-fms</u> (Rettenmier et al., 1985a). La phosphorylation sur des tyrosines est un événement rare dans une cellule normale (0.1% des phosphorylations de protéines cellulaires) et semble important puisqu'il intervient dans la réponse précoce de certains récepteurs de facteurs de croissance à un signal mitotique. De plus cette réponse précoce a lieu dans la membrane plasmique, localisation qui est celle de la majorité des protéines oncogènes virales phosphotyrosines kinases et de leurs homologues cellulaires (pour revue: Hunter et Cooper, 1985).

2) La stimulation de la division de cellules quiescentes par un facteur de croissance (PDGF) induit l'accumulation des transcrits de <u>c-fos</u> dans les minutes qui suivent (Greenberg et Ziff, 1984) et ensuite de <u>c-myc</u> (Kelly et al., 1983) avant la synthèse de l'ADN et la division cellulaire. L'accumulation des transcrits du gène <u>c-myb</u> apparait pendant la phase de croissance exponentielle et subit des variations suivant les différentes



<u>Schéma 6</u>: Les deux hypothèses pour l'acquisition du pouvoir transformant des rétrovirus phases du cycle cellulaire (Thompson et al., 1986).

#### III) DIFFERENCES ENTRE c-onc ET v-onc:

Quelles-sont les différences entre <u>c-onc</u> et <u>v-onc</u> pouvant permettre de rendre compte du pouvoir oncogène de ces derniers? Il n'y a probablement pas une réponse unique pour tous les oncogènes. Néanmoins, deux différences majeures entre <u>c-onc</u> et <u>v-onc</u> ont permis d'avancer deux hypothèses non mutuellement exclusives (schéma 6):

-La première hypothèse dite quantitative ou à effet de dose est liée au mode d'expression différent des v-onc et des c-onc. En effet dans un animal infecté, les rétrovirus sont capables d'exprimer à haut taux. (environ 500 copies par cellules infectées) et dans de nombreux tissus, les v-onc qu'ils contiennent. Au contraire les c-onc ont généralement un taux d'expression relativement faible (de l'ordre de 20 copies par cellules) et ce dans un petit nombre de cellules. Par exemple certains c-onc sont exprimés préférentiellement dans certains tissus (Gonda et al., 1982; Westin et al., 1982, a, b; Coll et al., 1983b; Eva et al., 1982; Muller et al., 1982, 1983a,b) quelquefois à un stade de différenciation particulier (Westin et al., 1982b; Gonda et Metcalf, 1984) ou différentiellement suivant l'embryogénèse (Muller et al., 1982, 1983a,b; Lev et al., 1984; Pfeifer-Ohlson et al., 1984, Goustin et al., 1985) ou lors de la réparation de certains tissus (Goyette et al., 1983, 1984). Un effet de dose responsable du pouvoir transformant semble être vérifié pour quelques c-onc qui deviennent capables de transformer des cellules si leur expression est mise sous le contrôle d'un promoteur de transcription viral: c-mos (Blair et al., 1981), c-Ha-ras1 (Chang et al., 1982a), c-fos (Miller et al., 1984) c-sis (Clarke et al., 1984; Gazzit et al., 1984) et c-myc (Lee et al., 1985; les travaux présentés dans ce mémoire).

-La seconde hypothèse dite qualitative suppose que le pouvoir transformant acquis par le <u>v-onc</u> lui est apporté par des modifications de structure primaire que la protéine <u>c-onc</u> a subie à partir du moment où le rétrovirus à transduit ce <u>c-onc</u>. En effet, dans la plupart des rétrovirus oncogènes les séquences codantes du <u>v-onc</u> diffèrent de celles du <u>c-onc</u> par des additions, des délétions, des mutations ou une combinaison de ces trois sortes d'altérations. L'exemple-type pour lequel l'hypothèse qualitative est vérifiée est celui du gène cellulaire <u>ras</u> qui acquiert un pouvoir transformant, même s'il n'est pas sous contrôle d'un promoteur de transcription viral, par une seule mutation ponctuelle modifiant le 12<sup>ème</sup> ou le 61<sup>ème</sup> Acide Aminé de la p21<sup>c-ras</sup> (Tabin et al., 1982; Taparowsky et al., 1982; Capon et al., 1983; Reddy et al., 1982). De nombreux v-onc sont



Schéma 7: Hypothèses sur le mode d'action des oncogènes viraux

exprimés sous forme d'une protéine de fusion avec des déterminants de gènes de structure viraux, généralement <u>gag</u>, et dans certains cas cette addition n'est pas anodine. En effet, l'expression à partir d'un rétrovirus, d'une protéine de fusion entre les déterminants <u>c-fps</u> et des déterminants du gène de structure <u>gag</u> est suffisante pour la transformation alors que dans les mêmes conditions l'expression des seuls déterminants <u>c-fps</u> ne l'est pas (Foster et al., 1985). Entr'autres modifications, une séquence de 11 codons du gène cellulaire <u>c-src</u> est remplacée dans la protéine <u>v-src</u> par 19 autres codons, l'introduction de cette seule modification dans un rétrovirus contenant les séquences cellulaires codant pour la protéine <u>c-src</u> est suffisante pour conférer à ce rétrovirus un pouvoir transformant (Takeya et Hanafusa, 1983; Takeya, communication personnelle).

#### IV) MODES DE TRANSFORMATION PAR LES v-onc:

Une classification provisoire à été établie sur des critères d'homologie de séquences et de propriétés communes entre les produits des <u>v-onc</u>. Cette classification comprend 4 familles, la quatrième regroupant les <u>v-onc</u> non classifiables dans les 3 familles qui sont (Tableau 1) la famille des gènes dont le produit a une activité tyrosine kinase, la famille des gènes <u>ras</u> et la famille des gènes dont le produit est localisé dans le noyau de la cellule (Bishop, 1983). Des données récentes ont permis d'affiner cette classification et les <u>v-onc</u> sont regroupés cette fois en fonction de leur interaction possible avec les mécanismes de la prolifération cellulaire (pour revue: Bishop, 1985).

Le comportement le plus remarquable de la cellule tumorale est une capacité fortement accrue à proliférer (pouvant conduire à l'immortalisation), en même temps qu'une dépendance réduite vis à vis des facteurs de croissance pour assurer cette prolifération. Les produits des  $\underline{v-onc}$  pourraient induire ce comportement d'une part en induisant la production de facteurs de croissance auxquels la cellule infectée est sensible (hypothèse autocrine), d'autre part en dérégulant des relais de la chaine d'événements qui va du signal mitotique à la synthèse de l'ADN cellulaire (schéma 7).

#### A) Protéine oncogène homologue à un facteur de croissance:

L'hypothèse autocrine semble pouvoir s'appliquer à plusieurs oncogènes viraux, mais le cas le plus remarquable est celui du gène <u>v-sis</u> isolé du virus du sarcome de singe (SSV), qui code lui-même pour un produit analogue à un facteur de croissance, le PDGF (Doolittle et al., 1983; Waterfield et al., 1983; Chiu et al., 1984; Johnsson et al., 1984). Le PDGF est nécessaire à la croissance de divers types cellulaires et il est composé de deux sous-unités A et B homologues (Heldin et al., 1979; Antoniades, 1981; Deuel et al., 1981; Raines et Ross, 1982). Le produit mature de v-sis est formé de deux sous unité B (Robbins et al., 1983) et son activité ressemble à celle du PDGF (Huang et al., 1984; Owen et al., 1984; Johnsson et al., 1985). Dans la mojorité des cas, la transformation par v-sis pourrait être due à une stimulation constitutive des propres récepteurs de la cellule infectée, par sécrétion du produit de v-sis. En effet de nombreuses cellules transformées par le virus SSV possèdent les récepteurs du PDGF (Bowen-Pope et al., 1984; Owen et al., 1984; Huang et al., 1984) et la prolifération de certaines d'entre elles semble nécessiter la sécrétion du produit de v-sis (Huang et al., 1984). La situation est pourtant plus complexe puisque le maintien du phénotype transformé de certaines cellules infectées par le virus SSV ne semble pas nécessiter la sécrétion du produit de v-sis (Betsholtz et al., 1984). Le mode d'action du produit de v-sis pourrait donc être multiple et également induire des déréglements de la prolifération cellulaire par interaction avec des relais du signal mitotique, comme cela semble être le cas dans les exemples suivants.

# B) Protéines oncogènes homologues à des récepteurs de facteur de croissance:

Le premier relai du signal mitotique est le récepteur du facteur de croissance. Certains de ces récepteurs sont identifiés et ont une structure transmembranaire, la partie externe s'associant au facteur de croissance et la partie interne étant susceptible de transmettre le signal mitotique. Cette transmission pourrait être assurée par l'activité tyrosine kinase que montrent ces récepteurs lors de leur association avec le facteur de croissance (Hunter et Cooper, 1985). Le produit de v-erb-B est une version tronquée du récepteur de l'EGF (Downward et al., 1984; Ullrich et al., 1984). L'oncogène v-fms a probablement été transduit à partir du récepteur d'un facteur de croissance spécifique des macrophages (M-CSF ou CSF1) (Sheer et al., 1985). La séquence nucléotidique de v-ros suggère qu'il pourrait également être homologue à un récepteur de facteur de croissance proche de l'insuline (Hunter, 1985; Hunter et Cooper, 1985). Les produit de ces trois v-onc sont des protéines transmembranaires, glycosylées et ont une activité tyrosine kinase. Une bonne partie des produits de v-erbB (Hayman et Beug, 1984; Privalsky et Bishop, 1982) et de v-fms (Anderson et al., 1984; Rettenmier et al., 1985a,b) réside dans l'appareil de Golgi, cependant la présence de ces protéines dans la membrane plasmique semble indispensable pour la transformation (Beug et Hayman, 1984; Roussel et al., 1984). L'activité tyrosine kinase de ces protéines est constitutive (Decker, 1985; Gilmore et al., 1985; Kris et al., 1985; Barbacid et Lauver,

- 14 -

1981; Feldman et al., 1982) et les <u>v-onc</u> de ce groupe pourraient induire la prolifération des cellules infectées en mimant la présence constante d'un facteur de croissance sur son récepteur.

## C) Protéines oncogènes tyrosine kinases, localisées sur la face interne de la membrane plasmique:

Ce groupe dont le représentant le plus étudié est  $pp60^{v-src}$  comprend les produits de <u>v-abl</u>, <u>v-fes/fps</u>, et probablement le produit de <u>v-yes</u> dont la localisation membranaire n'est pas démontrée, mais est fortement suspectée à cause de sa remarquable homologie avec  $pp60^{v-src}$  (Kitamura et al., 1982). L'association à des structures membranaires parait indispensable au pouvoir transformant de  $pp60^{v-src}$  (Cross et al., 1984) qui trouve peut être dans ces structures des cibles privilégiées à son activité tyrosine kinase. Mais à ce jour aucune protéine dont la phosphorylation sur une tyrosine pourrait induire la prolifération cellulaire n'a été trouvée (Hunter et Cooper, 1985).

Le pouvoir transformant de  $pp60^{v-src}$  pourrait être du à la phosphorylation d'autres constituants cellulaires que des protéines, les phosphoinositols qui ont des propriétés de second messager. En effet Sugimoto et al., (1984) et Macara et al., (1984) ont montré que d'une part l'activité kinase de  $pp60^{v-src}$  pouvait s'exercer in vitro sur les phosphoinositols de telle sorte que cela pourrait augmenter in vitro la production de diacylglycérol et d'inositoltriphosphate et que d'autre part le métabolisme des phosphoinositols est accru dans les cellules transformées par v-src.

Les deux produits du métabolisme des phosphoinositols, le diacylglycérol et l'inositoltriphosphate ont des effets importants sur le comportement cellulaire (Berridge, 1981; Berridge et Irwin, 1984). Le diacylglycérol stimule l'activité de la protéine kinase C qui est une thréonine/sérine kinase calcium dépendante (Takai et al., 1979a; Kishimoto et al., 1980), l'inositoltriphosphate est supposé mobiliser les réserves de calcium intracellulaires (Berridge et Irwin, 1984). L'action conjuguée de la protéine kinase C et de la mobilisation du calcium intracellulaire peut conduire à plusieurs réponses cellulaires, dont la prolifération.

Si cette hypothèse du mode d'action de la  $pp60^{v-src}$  est attrayante, il n'est pas démontré que cette protéine phosphoryle les phosphoinositols in vivo, ni que dans les cellules transformées par <u>v-src</u> la protéine kinase C ou la mobilisation du calcium soient impliquées.

#### D) Protéines oncogènes de la famille ras:

Chez les mammifères, cette famille comprend au moins 3 membres dont 2, c-Ha-ras et c-Ki-ras ont été transduits dans des rétrovirus de sarcome
murin (Harvey, 1964 ; Kirsten et al., 1967). Le troisième, N-ras, n'a pas d'équivalent viral connu et a été isolé à partir de DNA de tumeur humaine (un Neuroblastome, d'où l'initiale N), grâce à sa capacité de transformer certaines cellules par transfection (Shimizu et al., 1983a). Les protéines codées par ces 3 gènes ras sont similaires, ont un poids moléculaire de 21 kd, fixent et hydrolysent le GTP et sont localisées sur la face interne de la membrane plasmique. Les protéines ras virales ont conservé ces propriétés (Ellis et al., 1982), toutefois leur activité GTPasique est fortement diminuée (Gibbs et al., 1984b; Mc Grath et al., 1984; Sweet et al., 1984). Les premières indications quant à une fonction possible des gènes ras ont été obtenues chez la levure (Saccharomyces Cerevisiae). Des protéines RAS1 et RAS2 ont été isolées chez la levure et leur conservation phylogénétique est telle que la p21<sup>v-ras</sup> semble suppléer efficacement aux fonctions de RAS1 et RAS2 (DeFeo-Jones et al., 1985; Kataoka et al., 1985) et que des mutants des gènes RAS de la levure peuvent transformer des cellules de souris (Defeo-Jones et al., 1985). Les propriétés détectées chez les protéines ras de mammifères ont été retrouvées chez RAS1 et RAS2, propriétés qu'ont également des protéines régulatrices (Gs) de l'Adenyl cyclase (Gibbs et al., 1984b; Mc Grath et al., 1984; Sweet et al., 1984; Temeles et al., 1985). Ces proteines Gs sont activées par leur association avec le GTP et s'autorégulent grâce à leur activité GTPasique (pour revue: Gilman, 1984). Les protéines v-ras ayant perdu cette autorégulation pourraient ainsi avoir un effet constitutif sur l'Adenyl cyclase, comme cela a été montré pour un mutant fabriqué à partir du gène RAS2 de la levure (Toda et al., 1985).

Cependant, si les protéines RAS de la levure interviennent dans la régulation du métabolisme de l'AMP cyclique, ce modèle ne semble pas transposable chez les mammifères, la  $p21^{v-ras}$  n'ayant pas d'effet détectable sur l'activité de l'Adenyl cyclase dans les cellules infectées (Beckner et al., 1985). Le pouvoir transformant de <u>v-ras</u> pourrait passer lui aussi par une stimulation autocrine de la prolifération, déjà invoquée pour <u>v-sis</u>. En effet, les cellules transformées par <u>v-ras</u> produisent des facteurs de croissances, appelés TGF ("Transforming Growth Factors"), auquels elles sont sensibles (De Larco et al., 1978; Ozanne, 1980).

# E) Protéines oncogènes sérine/thréonine kinases:

Les gènes <u>v-mos</u> (Kloetzer et al., 1984) et <u>v-mil/raf</u> (Moelling et al., 1984) ont une activité sérine/thréonine kinase in vitro, propriété déja rencontrée chez la protéine kinase C qui semble un des relais possibles dans la transmission du signal mitotique. Les connaissances relatives aux propriétés de <u>v-mos</u> et <u>v-mil/raf</u> sont encore trop restreintes pour supposer que ces deux oncogènes jouent un rôle apparenté à la protéine kinase C, d'autant plus que si cette dernière est associée à la membrane cytoplasmique, les produits de <u>v-mos</u> (Papkoff et al., 1983) et de <u>v-mil/raf</u> (Bunte et al., 1983) sont cytosolubles.

### F) Protéines oncogènes à localisation nucléaire:

Les protéines oncogènes virales ayant cette propriété sont les produits de v-myc (Donner et al., 1982; Atitalo et al., 1983c; Hann et al., 1983), v-myb (Klempnauer et al., 1984), v-fos (Curran et al., 1984) et v-ski (Stavnezer cité par Bishop, 1985). v-myc et v-myb sont des protéines se liant à l'ADN et sont localisées plus précisément dans la matrice nucléaire, structure où la réplication de l'ADN et la transcription sont supposées avoir lieu. Ces deux propriétés (affinité pour l'ADN, et localisation nucléaire) semblent importantes pour le maintien du pouvoir transformant de v-myc et v-myb. En effet, d'une part certaines cellules hématopoïétiques transformées par v-myb retrouvent un phénotype normal sous l'action d'un phorbol ester (Symonds et al., 1984a), et cette réversion phénotypique est accompagnée (et peut être causée) par le changement de localisation de v-myb qui devient cytoplasmique. D'autre part, des mutants de v-myc (Donner et al., 1983) et v-myb (Moelling et al., 1985) ont des produits qui sont toujours à localisation nucléaire mais qui ont perdu une partie de leur pouvoir transformant en même temps que leur capacité à se lier à l'ADN.

De par leur localisation nucléaire et leur capacité à se lier à l'ADN ces protéines oncogènes pourraient déréguler la transcription de certains gènes. Cette hypothèse est renforcée par les deux d'observations suivantes. Primo, les produits de v-myc, v-myb et E1A (un gène précoce d'un virus à ADN, Adénovirus) ont quelques homologies de séquences entr'elles (Ralston et Bishop, 1983) et des durées de vie courtes compatibles avec un rôle de régulation (Hann et Eisenman, 1984; Ramsay et al., 1984; Klempnauer et al., 1984; Spinder et Berk, 1984). Il a été montré que le gène E<sub>1</sub>A est capable d'inhiber certains promoteurs ou activateurs de transcription (Borrelli et al., 1984; Velcich et Ziff, 1985), et cela pourrait expliquer l'inhibition de la transcription de gènes d'histocompatibilité (MHC-1) observée dans des cellules transformées par certains Adénovirus, inhibition qui semble corrélée avec la tumorigénicité des cellules transformées par ces virus à ADN (Schrier et al., 1983). Secondo, des expériences d'expression in vitro ont montré que le produit du gène myc pouvait réguler le promoteur de transcription d'un gène codant pour une protéine de choc thermique. Bien que cela ne soit pas démontré, cette régulation pourrait résulter d'une interaction de la protéine myc avec des séquences nucléotidiques du

- 17 -

promoteur du gène de choc thermique (Kingston et al., 1984b). Enfin le gène <u>c-myc</u>, dont l'accumulation des transcrits a été observée dans des cellules soumises à l'action de certains facteurs de croissances ou de substances mitogènes (Kelly et al., 1983), pourrait jouer un rôle dans l'induction de la prolifération de cellules quiescentes (en phase  $G_0$  du cycle cellulaire). Les cellules infectées par <u>v-myc</u> pourraient être moins dépendantes de facteurs de croissance et être sensibilisées à des facteurs impliqués dans le phénomène de progression à travers le cycle cellulaire. De fait, des cellules de souris dans lesquelles un gène <u>c-myc</u> est exprimé à partir d'un promoteur de transcription viral, ont perdu leur dépendance vis-à-vis des interleukines -1 et -2, facteurs nécessaires à la prolifération de ces cellules avant l'introduction du gène <u>myc</u> (Rapp et al., 1985).

#### V) ACTIVATION DES c-onc ET CANCERS:

Les délais très brefs nécessaires aux rétrovirus oncogènes pour induire des cancers chez l'animal ou pour transformer les cellules en culture, sont en faveur d'un processus transformant en une étape. De nombreuses observations cliniques et expérimentales montrent que les cancers spontanés, par contre, apparaissent après des délais relativement longs, à la suite d'étapes successives de dérèglements (pour revue : Cairns et Logan, 1983). La transduction par des rétrovirus, de séquences d'origine cellulaire conférant à ces rétrovirus un pouvoir oncogène, a incité de nombreux laboratoires à rechercher un rôle éventuel de ces séguences cellulaires dans le processus cancéreux non viro-induit. Une dizaine de c-onc semblent impliqués à des degrès divers dans certains cancers spontanés. Deux séries d'observations suggèrent que les différentes étapes de la tumorigénèse pourraient correspondre au dérèglement de différents gènes cellulaires. D'une part l'étude des quelques c-onc trouvés activés (ayant leurs régulations et/ou leurs structures modifiées) dans des tumeurs montre que les modifications qu'ils ont subies ne sont pas capables à elles seules de conférer à ces c-onc le pouvoir de rendre tumorigènes des cellules normales. D'autre part dans certaines tumeurs, deux oncogènes ont été trouvés activés et des expériences de reconstitution in vitro ont montré que la coopération de ces deux oncogènes est nécessaire pour transformer des cellules normales en cellules tumorigènes.

Deux stratégies principales ont permis de détecter dans des cellules tumorales ou des lignées dérivées de cellules tumorales, l'activation de certains <u>c-onc</u>. La première de ces stratégies consiste à rechercher des gènes capables de transformer une lignée fibroblastique de souris, la NIH3T3, directement à partir de l'ADN des cellules transformées, par



# Schéma 8: Test NIH3T3

transfection de cet ADN dans les  $NIH_{3T3}$ . La seconde stratégie consiste à rechercher d'éventuelles modifications de la structure de gènes et d'étudier l'effet de ces modifications sur la régulation ou sur les propriétés de ces gènes.

# A) Gènes activés détectés par le test NIH<sub>3T3</sub> (schéma 8)

Shih et al (1979) ont montré que de l'ADN de cellules transformées par des carcinogènes chimiques contient des gènes capables de transformer les NIH3T3. Le test consiste à détecter des foyers de NIH3T3 morphologiquement transformées par transfection au phosphate de calcium de l'ADN cellulaire testé (pour revue: Weinberg, 1981; Cooper, 1982). Les techniques de biologie moléculaire permettent d'isoler à partir de l'ADN des NIHama transformées, les gènes introduits responsables de cette transformation. Entre 10% à 50% des ADN de lignées cellulaires ou de biopsies contiennent un gène transformant sur NIH3m3 (Cooper, 1982; Pulciani et al., 1982a), gène qui s'avère être généralement l'un des membres de la famille ras: c-Ha-ras1, c-Ki-ras2 ou N-ras. Ce dernier n'a pas d'équivalent viral connu et son existence a été révélée par le test NIH<sub>3T3</sub> (Hall et al., 1983; Murray et al., 1983; Shimizu et al., 1983a,c). Un autre gène, neu, n'ayant pas d'équivalent viral connu mais apparenté à v-erb-B, a également été détecté par ce test (Shectker et al., 1984). Cette technique a permis de détecter de l'ordre d'une dizaine de gènes n'ayant pas d'homologie avec des v-onc connus. L'un d'entre eux, B-Lym, semble activé spécifiquement dans des lymphomes B et possède des homologies de séquences avec les gènes de la famille des transferines (Goubin et al., 1983).

### 1) Modes d'activation des gènes cellulaires ras:

Parmi tous ces gènes, les seuls dont on connaisse actuellement le mode d'activation sont les gènes <u>ras</u>: ils acquièrent leur pouvoir transformant par modification du  $12^{\text{ème}}$  ou du  $61^{\text{ème}}$  Acide Aminé (A.A) de la  $p21^{\text{C-ras}}$  à la suite d'une mutation ponctuelle dans l'un ou l'autre des codons correspondant à ces A.A. La substitution d'un seul A.A semble altérer profondément la structure de la  $p21^{\text{C-ras}}$ : il est possible de séparer la protéine mutée de la protéine normale par électrophorèse (Santos et al., 1982; Tabin et al., 1982; Yuasa et al., 1984). Ces mutations ponctuelles entrainent une perte d'activité GTPasique du même ordre que celle observée chez la  $p21^{\text{V-ras}}$ . Dans toutes les tumeurs testées, les mutations affectant les gènes <u>ras</u> sont des événements somatiques: ces mutations ne sont retrouvées dans aucun des deux allèles <u>c-ras</u> des cellules normales du patient (Feig et al., 1984; Fujita et al., 1984; Kraus et al., 1984; Santos et al., 1984). Il semble que les gènes <u>ras</u> soient des cibles privilégiées des carcinogènes chimiques, tout du moins chez le rat, puisque dans de nombreuses tumeurs expérimentales induites par ce moyen, un gène <u>ras</u> est activé par mutation ponctuelle (Balmain et Pragnell 1983; Sukumar et al., 1983). Toutefois, les mutations ne sont pas le seul moyen d'activer les gènes <u>ras</u>, un effet de dose est également possible: des NIH<sub>3T3</sub> peuvent être transformées par transfection d'un gène <u>c-ras</u> normal mis sous le contrôle d'un promoteur viral (Chang et al., 1982a), et la conjugaison des deux effets, mutations et surexpression, est capable de rendre tumorigène une cellule normale (Spandidos et Wilkie, 1984).

### 2) Efficacité du test NIH<sub>3T3</sub>:

Les raisons pour lesquelles le test NIH<sub>3T3</sub> n'est positif que pour une fraction des ADN testés sont mal connues. Cependant, il est possible que le test NIH<sub>3T3</sub> ne puisse détecter qu'un répertoire restreint de gènes cellulaires transformant, pour les raisons suivantes. Premièrement les NIH3m3 sont des cellules établies en lignée (immortelles), et sont peut-être insensibles à des gènes dont l'activation participerait à ce processus comme peut-être c-myc dont même l'équivalent viral ne transforme les NIH3m3 qu'à très faible efficacité (Copeland et Cooper, 1980). Deuxièmement l'activation de certains gènes, suffisante pour participer à la tumorigénèse de certaines cellules est peut-être insuffisante pour transformer les NIH<sub>2T2</sub>: de l'ADN cellulaire dans lequel le gène v-abl est intégré transforme efficacement les NIH3T3 (Cooper et Neiman, 1980), aucune détection du gène c-abl par le test NIH3T3 n'a été rapportée bien qu'il soit activé dans de nombreuses leucémies myéloïdes chroniques (Heisterkamp et al., 1983; Canaani et al., 1984; Collins et al., 1984). Il apparait donc que le test NIH3m3 n'est pas le test idéal pour détecter tous les gènes activés dans les cellules transformées.

### B) Gènes activés par des remaniements:

A l'aide d'endonucleases de restriction et de sondes spécifiques d'un gène cellulaire (Southern, 1975), il est possible, à partir de l'ADN cellulaire d'une tumeur, de détecter des anomalies de structure de ce gène, en comparant son profil de digestion et d'hybridation avec le profil du même gène obtenu à partir de l'ADN de cellules normales du même organisme ou d'un organisme de la même espèce. L'emploi systématique de cette technique pour chaque tumeur analysée et pour chaque oncogène connu est cependant difficile. Il est donc indispensable de découvrir des indices qui orientent les recherches quant aux gènes susceptibles d'être activés dans une tumeur. Ces indices peuvent être obtenus par les deux voies suivantes:

- 20 -

viral MC29







<u>Schéma 9</u>: Structure des gènes myc et des ARN du gène humain - analyse qualitative et quantitative des transcrits des <u>c-onc</u> connus.

- recherche d'anomalies chromosomiques susceptibles de perturber la structure de ces gènes, dont la localisation chromosomique est connue (tableau II).

L'analyse des transcripts des <u>c-onc</u> connus est relativement ardue et son interprétation est souvent rendue difficile par le manque de critères définissant le choix de la cellule normale devant servir de contrôle pour la cellule tumorale étudiée. Cette stratégie a cependant permis de mettre en évidence, pour la première fois, l'activation d'un gène cellulaire dans une tumeur, activation due à l'insertion à proximité de ce gène d'un promoteur viral (LTR). Cette "LTR activation" est fréquemment détectée dans des tumeurs d'animaux infectés par des rétrovirus dépourvus d'oncogènes.

Les anomalies chromosomiques (parmi lesquelles des translocations, des amplifications ou des délétions de fragments de chromosome) sont fréquentes dans les cellules tumorales. Des techniques de coloration des chromosomes en métaphase, assignant à chacun d'eux une alternance spécifique de bandes claires et sombres, permettent de distinguer chaque chromosome, de définir les partenaires impliqués dans des translocations et de localiser les points de rupture et les régions délétées ou amplifiées (pour revue: Yunis, 1983). Dans certains cancers, des régions chromosomiques spécifiques sont affectées par l'une des anomalies citées, et des études faites au niveau moléculaire ont montré que dans quelques cancers, l'anomalie semble affecter la structure de gènes spécifiques.

Pour illustrer ces trois cas d'activation de gènes cellulaires qui sont la "LTR activation", la translocation chromosomique et l'amplification gènique, le gène <u>c-myc</u> est particulièrement indiqué puisqu'il est activé dans divers cancers par l'une ou l'autre de ces anomalies. Avant d'exposer chacun de ces cas, nous rappellerons quelques notions sur la structure et les propriétés connues du gène <u>c-myc</u> ainsi que sur les hypothèses concernant sa fonction.

### 1) Le gène cellulaire myc (c-myc)

a) Structure et propriétés du gène c-myc (schéma 9):

Le gène <u>c-myc</u>, homologue cellulaire de <u>v-myc</u>, est phylogénétiquement stable et a une structure similaire chez le poulet, la souris et l'homme. Il occupe environ 8 kbp (milliers de paires de bases) dans le génome et comporte trois exons séparés par deux introns (Dalla-Favera et al., 1982c). La protéine <u>c-myc</u> homologue à la protéine <u>v-myc</u> est codée par les deux derniers exons qui sont très conservés dans les 3 espèces citées. Le premier exon (exon1) est moins conservé phylogénétiquement et chez l'homme il contient un cadre ouvert qui a la capacité de coder pour une protéine de 20 kd (Gazin et al., 1983) dont l'existence dans des cellules eucaryotes n'a cependant jamais été mise en évidence. De plus cet exon1 contient une séquence capable de s'apparier avec une séquence de l'exon2 pour former une boucle en épingle à cheveux qui pourrait jouer un rôle régulateur (Saito et al., 1983).

Chez l'homme et la souris deux promoteurs de transcription (P1 et P2) (Saito et al., 1983; Stanton et al., 1983) sont utilisés pour produire les ARN matures de 2.4 kb et 2.5 kb (milliers de bases), et un promoteur cryptique (P3) est situé en amont de l'exon2 chez l'homme (Colby et al., 1983 ; Taub et al., 1984b) et chez la souris (Sheng-ong et al., 1982; Adams et al., 1983; Stanton et al., 1983). Les protéines codées par le gène <u>c-myc</u> de ces 3 espèces sont particulièrement conservées et il est probable qu'elles aient également conservé les caractéristiques suivantes (Ramsay et al., 1984; Donner et al., 1982; Alitalo et al., 1983c; Hann et al., 1983; Persson et al., 1984a; Evan et Hancock, 1985; Thompson et al., 1985) (dont certaines n'ont cependant pas été démontrées pour la protéine <u>myc</u> de l'une ou l'autre des espèces citées):

- détection par électrophorèse en gel d'acrylamide d'un doublet de proteines de poids moléculaires voisins (58 et 60 kd chez le poulet, 60 et 62 kd chez la souris, 65 et 68 kd chez l'homme) poids moléculaires différents de ceux calculés d'après la séquence nucléotidique du gène <u>c-myc</u> dans les 3 espèces (46 kd, 47 kd, 48 kd respectivement),

- localisation nucléaire,
- capacité, démontrée in vitro, à se fixer à l'ADN,
- phosphorylation sur des résidus sérine et thréonine,
- durée de-demi vie courte, de l'ordre de 20 minutes.

### b) Fonction du gène c-myc:

La fonction du gène <u>c-myc</u> est inconnue, cependant certaines observations semblent attribuer un rôle de ce gène dans la prolifération cellulaire. Selon un modèle (Pledger et al., 1977), le stade  $G_0-G_1$ (progression des cellules entre l'état de quiescence et la phase S de synthèse de l'ADN) peut être divisée en au moins deux étapes controllées par des facteurs de croissance tissus-spécifiques. La première étape est appelée "compétence" et la seconde "progression". Des cellules quiescentes peuvent être amenées à l'état de "compétence" par une exposition au PDGF pour les fibroblastes (Pledger et al., 1978; Armelin et al., 1984) ou à des lipopolysaccharides pour les lymphocytes B (Kelly et al., 1983). Le gène myc semble participer à l'installation de l'état de "compétence", mais son

- 22 -







Schéma 10: Expression du gène c-myc par "LTR activation"

rôle n'est pas clairement établi. En effet, l'exposition des fibroblastes et des lymphocytes aux facteurs induisant l'état de compétence est suivie dans les deux types de cellule d'un pic d'accumulation des ARN messagers du gène <u>c-myc</u> et l'injection de protéines <u>myc</u> dans des fibroblastes quiescents est capable d'induire l'état de "compétence" (Kaczmarek et al., 1985). Cependant la situation est plus complexe puisque dans les lymphocytes, l'expression du gène <u>c-myc</u> n'a pas cet effet (Smeland et al., 1985) et il a été montré que dans les fibroblastes l'état de compétence peut être obtenu par le PDGF sans que le pic d'accumulation des ARN <u>myc</u> soit observé (Coughlin et al., 1985). De plus le gène <u>c-myc</u> pourrait également être impliqué dans la phase de "progression" qui conduit les cellules "compétentes" à entrer dans la phase S. Cette phase de "progression" est contrôlée, du moins pour les fibroblastes, par l'EGF et la Somatomédine C (Leof et al., 1982) et l'expression du gène <u>c-myc</u> est un événement précoce induit par l'EGF (Coughlin et al., 1985).

Néanmoins, si la fonction du gène <u>c-myc</u> n'est pas connue, l'activation de ce gène, fréquemment observée dans certains cancers spécifiques, participe probablement au processus tumorigène. Quels sont les modes d'activation du gène c-myc observés dans ces cancers?

# 2) Activation du gène c-myc par "LTR activation":

Les rétrovirus sans oncogène (ALV) induisent des cancers après une période de latence longue comparativement aux rétrovirus oncogènes. Un des mécanismes possibles de l'émergence de certains de ces cancers est la "LTR activation" de gènes cellulaires: augmentation de la transcription de ces gènes par les séquences promotrices et activatrices contenues dans les LTR d'un ALV intégré à proximité de ces gènes (schéma 10). Ce type d'activation a été trouvé chez plusieurs espèces et pour plusieurs gènes cellulaires, dont quatre sont homologues à des <u>v-onc</u>, deux sont des facteurs de croissance, et les autres des gènes jusqu'alors inconnus. Le gène cellulaire <u>myc</u> est activé par "LTR activation" chez plusieurs espèces, dans des tumeurs lymphoïdes.

L'exemple décrit dans ce mémoire est celui de l'activation du gène <u>c-myc</u> dans des lymphomes B chez le poulet. Les travaux de Hayward et al. (1981), Payne et al. (1982), Neel et al. (1981), Linial et Groudine (1985), ont montré que dans 80% des lymphomes étudiés, un ALV est intégré à proximité ou dans le locus du gène <u>c-myc</u>. La plupart de ces ALV intégrés sont incomplets et certains ne sont plus représentés que par un de leurs LTR. Dans chaque cas, le taux des transcrits du gène <u>c-myc</u> est de 20 à 30 fois celui de cellules B contrôles, et les ARN <u>myc</u> sont initiés soit à partir du promoteur viral soit à partir des promoteurs propres à c-myc,

	Chromosome	Bande	``Oncogène''	
		cen-p21	N-ras *	
		p32	B-lym*	
	1	p32	L-myc*	
		p36-1/p36-2	fgr(src-2)	
		q12/qter	ski	
	2	p23/pter	N-myc*	
	3	p25	raf (mil) - 1	
	4		raf (mil) −2	
	5	q34	fms (Rec. M-CSF)	
	~	p23/q12	Ki-ras-1	
	Б	q22/q24	myb	
		pter/q22	erbB-1 (Rec. EGF)	
	6	p11/qter	met*	
		q 1 1	mos	
	8	q24	myc	
	9	q34	abl	
U /	·	p15	Ha-ras-1	
	11	q13	bc1-1*	
		q23/q24	ets	
	10	p12/pter	Ki-ras-2	
-	, IZ	q14/pter	int-1*	
13	14	q21/q31	fos	
	15	q25/q26	fes	
<b>U</b> /		p13	p53 *	
	17	q11/q12	erbA	
		q11/q22	neu *	
10	18	q21	bc1-2*	
 	20	q12/q13	src-1	
<b>Z</b> I /	22	q11	bcr*	
	~~	q12/q13	sis(PDGF-B)	
	X		Ha-ras-2	
Υ,	* Pas d'équ	ivalents viraux o	connus.	

Tableau II: Localisation chromosomique des c-onc

activés probablement par les séquences "enhancer" du LTR proviral. Les remaniements du gène <u>c-myc</u> "LTR activé" touchent parfois les séquences codantes de ce gène. En effet, Westaway et al. (1984) ont montré que dans certains lymphomes, la séquence nucléotidique du gène <u>c-myc</u> subit des mutations conduisant à des substitutions d'Acides Aminés de la protéine. La participation éventuelle de ces substitutions dans l'apparition des lymphomes B est inconnue.

A partir de l'ADN de certains de ces lymphomes, un gène transformant a été isolé par le test NIH3T3, gène qui n'est pas le gène c-myc "LTR activé" mais un gène qui n'a pas d'équivalent viral connu (il a été appelé B-Lym pour "B-lymphomas") et dont la caractéristique principale connue est son homologie de séquence avec les gènes de la famille des transferines (Cooper et Neiman 1980, 1981, Goubin et al., 1983). La présence de ces deux gènes activés dans un même lymphome est peut être corrélée avec les deux étapes observées dans l'émergence des lymphomes de type B chez des poulets infectés par un ALV. La première étape consiste en l'apparition dans la bourse de Fabricius, de follicules prénéoplasiques dont la plupart régressent, la seconde étape amenant un de ces follicules à croître et à devenir invasif (Cooper et al., 1968; Neiman et al., 1980b). L'activation du gène c-myc semble impliquée dans la première étape puisque la formation des follicules prénéoplasiques peut être obtenue par un virus contenant un mutant du gène v-myc de MC29 (un des virus de la myélocitomatose aviaire). L'ADN de la plupart de ces follicules ne contient pas de gènes capables de transformer les NIH3T3 par transfection, ce qui pourrait suggérer que la seconde étape (progression vers le stade invasif) nécessite l'activation d'un second gène qui dans ce cas pourrait être B-Lym (Neiman et al., 1985).

# 3) Activation de c-myc par translocation chromosomique

La connaissance de la localisation des <u>c-onc</u> sur les chromosomes humains (tableau II) à permis de focaliser les recherches sur une éventuelle activation de certains <u>c-onc</u> par des translocations spécifiques à certains cancers. Dans de nombreux cas les points de cassure chromosomique des translocations ne se font pas au voisinage de <u>c-onc</u> connus, mais dans certains cas ils sont localisés sur les mêmes bandes chromosomiques que des <u>c-onc</u> (pour revue: Rowley 1983; Yunis, 1983). Une bande chromosomique représente environ  $10^4$  kbp, un gène environ 100 kbp, des analyses complémentaires sont donc nécessaires pour localiser précisement les points de cassure par rapport au <u>c-onc</u>. Dans plusieurs cancers pour lesquels des translocations spécifiques ont été observées, un des points de cassure est généralement situé dans le locus même d'un <u>c-onc</u>. De telles translocations spécifiques impliquent le gène c-myc dans des



# Schéma 11: Chromosomes impliqués dans les Lymphomes de Burkitt

- Localisation de l'allèle transloqué du gène c-myc
- Localisation des allèles transloqués des gènes d'immunoglobulines
- J<sup>5</sup>' Orientation transcriptionnelle ₃· des gènes

lymphomes humains, les lymphomes de Burkitt (BL) qui résultent de la prolifération clônale d'une cellule de type B productrice d'immunoglobulines. Ces BL sont associés en Afrique à l'éthiologie du virus Epstein-Barr (EBV) dont le rôle dans l'émergence des BL est mal connu, et qui peut être absent des cellules tumorales. Des plasmocytomes murins (MPC) induits par des carcinogènes chimiques, présentent des caractéristiques voisines de celles des BL et constituent un modèle animal de cette maladie (pour revue: Kaplan et Szajnert, 1985).

# a) Modifications structurales du gène c-myc dans les lymphomes de Burkitt:

Dans 100% des BL décrits, une translocation implique un échange de matériel génétique entre d'une part le chromosome 8 et d'autre part soit le chromosome 14 (environ 85 % des BL) (Manalova et al., 1979), soit les chromosomes 2 ou 22 dans les autres cas appelés variants (Bernheim et al., 1981) (schéma 11). La zone de cassure sur le chromosome 8 est situé dans la bande q24 qui contient le gène c-myc humain (Neel et al., 1982; Dalla-Favera et al., 1982b; Taub et al., 1982). Les zones de cassure des trois autres chromosomes impliqués sont situés en 14q32, 2p13 et 22q11 ce qui correspond à la localisation respective des chaines lourdes (IgH) (Kirsh et al., 1982) et des chaines légères Kappa (IgK) (Malcolm et al., 1982) ou Lambda (IgL) (Taub et al., 1982) des immunoglobulines (schéma 11). Pour deux BL ayant une translocation t (8 ; 14), il a été démontré que l'un des deux allèles c-myc est transloqué du chromosome 8 sur le chromosome 14 dans le locus des IgH (Dalla-Favera et al., 1982b; Davis et al., 1984), et des observations indiquent que cette situation est vraisemblablement valable pour tous les BL t(8 ; 14). Dans les BL variants (t(2 ; 8) et t(8 ; 22)) qui ont été étudiés, c'est une partie du locus des IgK ou IgL qui est transloquée du chromosome 2 ou 22 respectivement, sur le chromosome 8 (Croce et al., 1983; Erikson et al., 1983b; Davis et al., 1984; Hollis et al., 1984).

Des analyses fines de biologie moléculaire effectuées sur plusieurs cas de chaque type de translocation ont permis de dégager certaines caractéristiques (Schéma 11). La position et l'orientation transcriptionnelle de chacun des gènes des immunoglobulines a pu être définie par rapport au gène <u>c-myc</u>. L'orientation de chaque gène sur son chromosome d'origine en a été déduite. Les points de cassure chromosomiques ne sont jamais les mêmes et sont situés d'une part à l'intérieur des gènes d'immunoglobulines pour les chromosomes 2, 14 et 22, d'autre part dans une zone de 10 kbp en 5' du deuxième exon du gène c-myc dans la majorité des BL

- 25 -

Allèle c-myc normal	Allèle c-myc transloqué	
normai		-

 Augmentation de la transcription par un "enhancer" des gènes des immunoglobulines

5

Exemple: BL t(8; 14) ATG Stop  $(\neg P_3)$  TG Stop  $(\neg P_3)$  TG Stop TG StopTG Stop

 Augmentation de la transcription due à la "proximité" des chaines d'immunoglobulines transcriptionnellement actives



3) Augmentation de la transcription par perte de signaux de régulation Exemple: BL t(8; 14)

<u>Schéma 12 A</u>: Différents modèles d'activation du gène c-myc dans les Lymphomes de Burkitt au niveau transcriptionnel t(8 ; 14), et dans une zone plus large (de l'ordre de 100 kbp) en 3' du gène <u>c-myc</u> dans les BL variants en ce qui concerne le chromosome 8 (Taub et al., 1982; Adams et al., 1983; Dalla-Favera et al., 1983; Erikson et al., 1983a; Marcu et al., 1983; Bernard et al., 1983; Taub et al., 1984a).

b) Quels sont les effets de ces translocations sur le gène c-myc? De nombreuses inconnues concernant la fonction, les propriétés, la régulation, et le rôle de <u>c-myc</u> dans des cellules normales, ainsi que l'hétérogénéité des observations concernant les réarrangements de <u>c-myc</u> dans les BL empêchent encore de proposer un modèle unique pour l'activation de ce gène dans les BL.

Le premier modèle, proposé par Klein (1981) supposait une élévation de la transcription du gène c-myc due à des promoteurs ou des "enhancers" de transcriptions amenés par les translocations à proximité de ce gène (schéma 12A 1). Cependant dans les BL, les promoteurs des chaines d'immunoglobulines, quand ils sont déplacés, le sont de telle sorte qu'ils ne peuvent pas initier les ARN myc, ils sont en sens inverse dans les t(8; 14) et en 3' de c-myc dans les variants (Adams et al., 1983; Hamlyn et Rabbitts, 1983; Bernard et al., 1983; Marcu et al., 1983; Taub et al., 1984b; Croce et al., 1983; Erikson et al., 1983b; Davis et al., 1984; Hollis et al., 1984). Des "enhancers" tissu-spécifiques sont connus dans les chaines d'immunoglobulines chez la souris et chez l'homme (Banerji et al., 1983; Gillies et al., 1983; Boss, 1983), mais les translocations ne les déplacent généralement pas au voisinage des promoteurs du gène c-myc, et un seul cas de BL où le "enhancer" des IgH semble être responsable de l'augmentation de l'expression du gène c-myc est décrit (Hayday et al., 1984).

Un autre modèle fait également intervenir une influence des gènes d'immunoglobulines sur la transcription du gène <u>c-myc</u> transloqué. Des expériences de Croce et ses collaborateurs, auteurs de ce modèle, suggèrent qu'au cours de la maturation des cellules B, les variations d'expression du gène <u>c-myc</u> accolé aux gènes d'immunoglobulines par la translocation, ne suivraient pas les variations d'expression de l'allèle normal <u>c-myc</u> mais celles de l'expression des gènes d'immunoglobulines. En d'autres termes, si l'allèle <u>c-myc</u> transloqué est exprimé alors que l'allèle normal ne l'est pas, c'est qu'au stade de maturation des BL l'expression des gènes d'immunoglobulines est induite et que l'allèle <u>c-myc</u> amené accidentellement à leur proximité est soumis à cette induction. Les auteurs de ce modèle postulent que dans les cellules B, des facteurs spécifiques de certains

A11	èle	c-	m	y	C
	nor	ma	1		

Allèle c-myc transloqué

1) Augmentation du taux de protéine par un mécanisme post-transcriptionnel



2) Augmentation du taux de protéine par un mécanisme traductionnel



<u>Schéma 12 B</u>: Différents modèles d'activation du gène c-myc dans les Lymphomes de Burkitt au niveau post-transcriptionnel stades de maturation interagissent avec des "enhancers" non encore identifiés, capables d'activer l'expression des gènes d'immunoglobulines (schéma 12A 2) (Nishikura et al., 1983; ar-Rushdi et al., 1983; Feo et al., 1985). Ce modèle a l'avantage d'une part d'offrir une explication générale de l'activation du gène c-myc dans les BL, d'autre part de relier cette activation à une caractéristique remarquable des BL observée dès 1982 par Lenoir et ses collègues. En effet, les BL étant producteurs d'immunoglobulines expriment toujours les chaines lourdes (chromosome 14) et soit les chaines légères Kappa (chr. 2), soit les chaines légères Lambda (chr. 22). Le fait remarquable est que le gène c-myc est transloqué dans tous les cas connus à une exception près (Hollis et al., 1984) dans un des allèles des chaines d'immunoglobulines exprimées (Lenoir et al., 1982). Cette étroite corrélation pourrait suggérer, comme dans le modèle de Croce et collaborateurs, que l'expression du gène c-myc est induite par un environnement de gènes transcriptionnellement actifs. Ce modèle fait cependant intervenir des "enhancers" ayant des caractéristiques peu communes -et qui restent à découvrir- car ils devraient dans certains cas pouvoir agir à des distances de l'ordre de 100 kbp, distances séparant le gène c-myc des gènes d'immunoglobulines dans certaines translocations.

Les autres modèles sont basés sur une dérégulation du gène c-myc par des modifications de sa structure plutôt que sur une activation par les gènes des immunoglobulines. Leder et son équipe ont proposé un modèle de régulation du gène c-myc faisant intervenir à la fois des facteurs activateurs et des facteurs inhibiteurs agissant en trans sur la transcription de ce gène. Ces facteurs agiraient en se fixant sur des régions localisées principalement en 5' de l'exon1 du gène myc. Des modifications de la structure de la chromatine dans ces régions pourraient donc conduire à l'expression constitutive du gène myc en empêchant la fixation des facteurs inhibiteurs (schéma 12A 3). De telles modifications ont été détectées dans les BL par les auteurs de ce modèle et pourraient résulter des altérations apportées par les translocations aux séquences nucléotidiques de la région 5' du gène myc (Leder et al., 1983; Taub et al., 1984a; Siebenlist et al., 1984). Dans les BL t(8 ; 14) ces altérations sont fréquentes puisque le point de cassure du chromosome 8 est généralement situé à proximité de la région 5' du gène myc qui est transloqué sur le chromosome 14. Dans les BL variants, bien que le point de cassure soit situé en 3' du gène c-myc qui reste sur le chromosome 8, des réarrangements de la région 5' du gène c-myc ont été observés (Rabbitts et al., 1983c, 1984; Taub et al., 1984a; Erikson et al., 1982). Les auteurs de ce modèle ont également proposé que l'un des facteurs inhibiteurs de la

transcription soit la protéine <u>c-myc</u> elle-même qui a la capacité de se lier à l'ADN. Cette rétro-inhibition pourrait rendre compte de l'absence d'expression de l'allèle <u>myc</u> normal observée dans tous les BL testés sauf un. Fait interessant, dans ce cas les séquences codantes du gène <u>c-myc</u> transloqué ont subies de nombreuses mutations (Rabbitts et al., 1983b). Si l'hypothèse concernant la rétro-inhibition du gène <u>c-myc</u> est correcte, cette exception pourrait s'expliquer par le fait que les mutations ont modifié les propriétés de la protéine <u>c-myc</u> de telle sorte que cette dernière ne puisse plus interagir avec le site de régulation de l'allèle normal.

Les deux derniers modèles expliquent l'activation du gène c-myc non plus au niveau transcriptionnel, mais l'un au niveau post-transcriptionnel et l'autre au niveau traductionnel. Janteur et son groupe ont mis en évidence une régulation de c-myc au niveau post-transcriptionnel. Ils ont montré que les ARN myc ont généralement une demi-durée de vie très courte, de l'ordre de 10 minutes et que, pour la plupart des cas où une accumulation de ces ARN a été détectée, cette accumulation est due pour une grande part à une augmentation de la durée de vie des ARN, de l'ordre de 10 fois. Ces auteurs ont montré que dans certains BL la durée de vie des ARN initiés dans le gène myc transloqué est fortement augmentée et suggèrent que dans ce cas le gain de stabilité résulte des altérations ou de l'absence de l'exon1 dans ces ARN (schéma 12B 1) (Dani et al., 1984a; Blanchard et al., 1985; Piechaczyk et al., 1985; Eick et al., 1985). Cette différence de stabilité entre des ARN normaux et des ARN tronqués dans l'exon1 a pu être mise en évidence dans une même cellule (Rabbitts et al., 1985) et pourrait signifier que des altérations de l'exon1 pertubent la structure spatiale des ARN c-myc et diminuent leur dégradabilité. Cette modification de structure spatiale pourrait résulter de l'absence de formation de la boucle en épingle à cheveux proposée par Saito et al., (1983) qui lui, suppose à cette boucle un rôle de régulation sur la traduction des ARN myc (schéma 12B 2).

En résumé, dans tous les lymphomes de Burkitt, le gène <u>c-myc</u> est activé par une translocation chromosomique qui place ce gène à proximité d'un gène des immunoglobulines transcriptionnellement actif et qui dans de nombreux cas affecte sa structure. De nombreux travaux réalisés en vue de définir le mode d'activation du gène <u>c-myc</u> dans ces cancers ont permis de découvrir certaines facettes de la régulation de ce gène qui semble complexe et de proposer quelques modèles pour son activation. Il semble cependant encore difficile d'éclaircir totalement le mode d'activation de ce gène dont les propriétés, le mode d'action et la fonction sont mal connus. Néanmois, une expérience récente rend fort probable l'implication du gène c-myc activé dans l'apparition des lymphomes de Burkitt.

Cette expérience a été réalisée par Adams et al., (1985) qui ont observé l'apparition de lymphomes de type B chez des souris en mimant l'activation du gène c-myc dans les cellules lymphoïdes de ces animaux. Ces auteurs ont obtenu des souris transgéniques contenant dans leur génome un gène c-myc exogène, en microinjectant ce gène dans un ovule de souris fertilisé. Ce gène s'intègre dans le génome de l'oeuf de telle sorte que tous les tissus du futur animal contiennent ce gène (pour revue: Palmitter et Brinster, 1985). Il est possible d'étudier l'effet de l'expression du gène intégré dans un tissu determiné, en assujétissant ce gène à des promoteurs ou des "enhancers" de transcription tissu-spécifiques. Adams et ont placé le gène normal c-myc de souris sous le contrôle du al. "enhancer" des IgH ou des IgK et ont obtenu des souris transgéniques contenant l'une de ces constructions. La plupart de ces souris développent des lymphomes de type B monoclonaux dans les quelques mois qui suivent leur naissance. Les souris ayant intégré le gène myc exogène sans "enhancer" ne font pas de tumeur. Ces travaux montrent à l'évidence que l'expression du gène myc sous contrôle du "enhancer" des IgH est capable d'induire des lymphomes du même type que les lymphomes de Burkitt.

La majorité des tumeurs observées sont monoclonales. Pourtant le gène <u>c-myc</u> lié au "enhancer" est intégré dans tous les tissus de l'animal et son expression est supposée survenir dans toutes les cellules permissives à l'activité du "enhancer", notamment les cellules B. Ceci suggère qu'un second événement est nécessaire à l'installation des tumeurs dans ces expériences. Ce second événemment pourrait être l'activation d'un autre gène comme le suggère la détection par le test NIH<sub>3T3</sub> dans certains lymphomes de Burkitt d'un second gène activé, <u>N-ras</u> (Murray et al., 1983) ou <u>B-Lym</u> (Diamond et al., 1983). La présence des deux gènes activés <u>c-myc</u> et <u>B-Lym</u> dans des cancers d'un même tissu dans des espéces différentes (le poulet et l'homme), pourrait laisser penser que des associations préférentielles de gènes activés sont privilégiées pour l'apparition de cancers dans un tissu donné.

### 4) Activation du gène c-myc par amplification génique:

Une autre manière que la cellule semble avoir choisie pour augmenter la transcription de l'un de ses gènes est l'amplification de ce gène. Des amplifications géniques ont été observées dans des cellules résistantes à des drogues cytotoxiques. Ces amplifications peuvent être décelées sous

deux formes, l'une liée au chromosome et détectable comme une région colorée de façon homogène ("Homogeneously Stained Region" ou HSR), l'autre libre ayant l'aspect d'un minichromosome ("Double Minute" ou DM) (pour revue: Schimke, 1982). Ces abbérations chromosomiques sont fréquemment observées dans les cellules tumorales (Cowell, 1982). Il n'est cependant pas évident d'identifier les gènes contenus dans ces amplifications car l'origine de la région amplifiée dans les DM et les HSR est difficile à localiser, les dernières étant mobiles (peut être sous l'aspect transitoire de DM) et pouvant s'intégrer à un autre endroit du génome (Alitalo et al., 1983a; Nowell et al., 1983). De plus ces régions amplifient des zones de l'ordre de 300 kbp pouvant contenir de nombreux gènes et il est difficile de déterminer quels sont les gènes susceptibles d'être impliqués dans le processus cancéreux. Une des stratégies consiste à rechercher si de multiples copies de l'un des c-onc connus sont présentes dans l'ADN des cellules contenant des HSR ou des DM. Ceci peut être déterminé en comparant les intensités des bandes obtenues dans l'ADN des cellules transformées et dans l'ADN de cellules contrôles après hybridation de ces ADN avec une sonde radioactive du c-onc.

Une amplification du gène c-myc a ainsi été détectée dans plusieurs types cellulaires transformés, amplification qui s'accompagne d'une accumulation des ARN c-myc dans ces cellules. Le gène c-myc est amplifié dans une lignée cellulaire HL60, ainsi que dans la leucémie promyélocytique de laquelle dérive cette lignée (Collins et Groudine, 1982; Dalla-Favera et al., 1982a), et dans d'autres lignées issues de tumeurs de tissus variés: carcinomes du colon (Alitalo et al., 1983a), carcinomes du sein (Kozbor et Croce, 1984), et carcinomes du poumon (Little et al., 1983). Dans les carcinomes du poumon il semble que l'amplification du gène c-myc soit un événement tardif dans la chronologie de ces cancers (Little et al., 1983). L'activation du gène c-myc par amplification génique pourrait être elle-même sous la dépendance de l'activation d'autres gènes: chez la souris, une amplification du gène c-myc est détectée dans la plupart des fibroblastes transformés par un rétrovirus de leucémies murines (A-MuLV) qui propage l'oncogène v-abl (Nepveu et al., 1985). Est-ce que dans les tumeurs humaines l'amplification du gène c-myc pourrait être également induite par un oncogène déja activé? Si une réponse est encore impossible, la question semble néanmois pouvoir être posée puisque le test NIH3T3 effectué avec l'ADN des cellules HL60 a permis de détecter un second gène activé dans ces cellules, une fois encore un gène de la famille ras, N-Ras (Murray et al., 1981, 1983).



<u>Schéma 13</u>: Expérience de reconstitution de la coopération des gènes myc et ras activés pour la transformation de fibroblastes embryonnaires de rat (REF)

### C) Coopération de gènes et tumorigénèse:

Dans certaines tumeurs citées plus haut, dans lesquelles un gène c-myc est trouvé activé par des remaniements structuraux, un autre gène activé (c-ras ou B-Lym) a été détecté par le test NIH3T3 et certaines observations suggèrent une participation éventuelle des deux oncogènes dans le processus tumorigène. Des expériences de reconstitution in vitro ont montré qu'une coopération des oncogènes myc et ras était susceptible de convertir des cellules normales en cellules tumorigènes (schéma 13). Des fibroblastes embryonnaires de rat (REF) (Land et al., 1983) et des cellules épithéliales de rein de jeunes rats (BRK) (Ruley, 1984) peuvent être établis en lignée (immortalisation) et rendus tumorigènes par cotransfection d'un gène myc et d'un gène ras activés, alors que la transfection du gène ras activé seul transforme morphologiquement les REF sans les rendre tumorigènes ni les immortaliser (Land et al., 1983) et que la transfection du gène myc activé immortalise les REF et les BRK sans les rendre tumorigènes (Ruley et al., 1984). Ces expériences renforcent l'idée que les différentes étapes observées dans l'apparition des cancers spontanés pourraient correspondre à des activations successives de gènes, chaque gène activé permettant à une cellule d'échapper graduellement aux contrôles de l'organisme et de proliférer. Ce premier modèle de coopération entre deux gènes cellulaires activés laisse supposer que des associations privilégiées d'oncogènes sont peut-être nécessaires pour qu'une étape succède à une autre dans un cancer donné. La complexité d'une seule cellule, la diversité des tissus de l'organisme et de leurs interrelations ainsi que certaines observations laissent supposer que ces associations privilégiées pourraient être nombreuses et variées. Par exemple, les gènes myc et ras activés peuvent avoir des effets différents de ceux observés dans le modèle de Land et ses collègues. En ce qui concerne le gène c-ras, Spandidos et Wilkie (1984) ont montré que dans certaines circonstances, un gène ras muté peut immortaliser des cellules, et que ce même gène ras muté et mis sous le contrôle d'un promoteur de transcription viral est capable de rendre tumorigènes des cellules embryonnaires. De plus l'activation du gène ras a été décelée à la fois à des stades précoces de l'apparition des tumeurs (Balmin et al., 1984) et à des stades plus tardifs (Albino et al., 1984; Vousden et al., 1984). En ce qui concerne le gène myc activé, il a été montré qu'il peut également transformer dans certaines conditions des cellules mammifères embryonnaires (Vennstrom et al., 1984) et que la surexpression du gène c-myc dans des cellules établies en lignées peut rendre ces cellules tumorigènes (Keath et al., 1984). De plus, comme nous l'avons vu, l'activation du gène myc semble être un événement précoce dans l'apparition des lymphomes de type B, et un événement tardif dans les carcinomes du poumon. On pourrait également supposer que les partenaires de ces associations particulières puissent être choisis parmi un répertoire plus ou moins vaste de gènes incluant les gènes transduits par les rétrovirus devenus de ce fait oncogènes. Certains de ces rétrovirus ont transduit deux gènes cellulaires qui pourraient être des partenaires pour l'une de ces associations privilégiées. Pour l'un de ces rétrovirus à deux oncogènes, MH2, nous avons vérifié cette hypothèse. Enfin, des modèles plus complexes, et donc se rapprochant d'autant plus des phénomènes survenant dans l'apparition des cancers spontanés, feront peut-être intervenir une nouvelle classe de gènes, les "anti-oncogènes" dont l'implication dans ces tumeurs est supposée de par les observations suivantes. Des expériences utilisant des hybrides cellulaires somatiques entre des cellules transformées et des cellules normales, hybrides qui ont perdu les critères de transformation (Graig et Sager, 1985) suggèrent l'existence de facteurs suppresseurs du phénotype transformé. De plus, dans certaines tumeurs, les deux allèles d'un même gène ont été éliminés (Cavenee et al., 1983; Murphee et Benedict 1984; Benedict et al., 1983; Oshimura et al., 1985). Il semblerait que ces "anti-oncogènes" puissent se réveler aussi complexes et nombreux que les oncogènes. En effet, leur pouvoir "suppresseur" de la transformation semble montrer une certaine spécificité envers les oncogènes responsables de cette transformation. Par exemple, des cellules révertantes provenant de fibroblastes transformés par le virus Ki-MSV (v-Ki-ras), peuvent supprimer par hybridation somatique l'effet transformant non seulement du gène ras, mais également des gène v-fes et v-src cependant ces cellules révertantes ne suppriment pas l'effet transformant des gènes v-mos, v-fms ou v-sis (Noda et al., 1983).

# PRESENTATION DU TRAVAIL

L'étude des rétrovirus oncogènes a permis de détecter, parmi les quelques 50.000 gènes supposés nécessaires à l'organisme humain, des gènes dont les dérégulations pourraient participer à l'apparition de cancers non viro-induits. Il est bien établi que les cancers spontanés résultent de processus multiétapes et c'est dans certaines de ces étapes que des oncogènes cellulaires seraient impliqués. Les bases moléculaires de ces différentes étapes de déréglements cellulaires et de leurs interrelations sont mal connues. Cependant des modèles qui pourraient servir d'approche pour ces études commencent à voir le jour. Par exemple, une coopération pour la transformation de fibroblastes embryonnaires de rat a été mise en évidence et implique les deux oncogènes activés <u>myc</u> et <u>ras</u>. Existe-t-il une relation entre le type cellulaire transformé par la coopération? En d'autres termes, peut-on trouver d'autres couples d'oncogènes susceptibles d'être impliqués dans d'autres coopérations?

La découverte de rétrovirus ayant transduit dans leur génome non pas une mais deux séquences cellulaires spécifiques pose le problème de savoir si cette association dans un même virus est le fait du hasard ou si chacun des deux gènes est biologiquement actif et dans ce dernier cas s'il y a coopération pour la transformation de types cellulaires définis. Nous avons testé ces hypothèses sur le rétrovirus MH2. Ce virus a transduit dans son génome les séquences spécifiques distinctes <u>mil</u> et <u>myc</u>. Nous avons pu définir, en collaboration avec le groupe de Georges Calothy une activité biologique pour chacun des deux gènes de MH2 et nous avons pu mettre en évidence leur coopération pour la transformation de cellules d'origine nerveuse, des cellules de neurorétine d'embryon de poulet en culture, composées essentiellement de neurones et de cellules gliales.

Ce premier point établi nous nous sommes attachés à tester si ce modèle de coopération pouvait être étendu aux homologues cellulaires humains des deux oncogènes <u>v-mil</u> et <u>v-myc</u>. Ce travail nécessitait de déterminer quel est le mode d'activation capable de conférer à chacun de ces deux gènes cellulaires clonés des propriétés semblables à leur homologue viral dans le système biologique défini. Nous avons répondu en partie à cette question pour l'un de ces gènes, le gène cellulaire humain <u>myc</u>. Nous avons montré que ce gène, activé par un promoteur de transcription viral, avait un comportement analogue à son homologue viral du virus MH2 dans le système biologique utilisé. Il reste à rechercher un mode d'activation du gène cloné humain <u>c-mil</u> capable de conférer à ce gène des propriétés analogues à son homologue viral de MH2. Si le modèle de coopération de <u>v-myc</u> et <u>v-mil</u> peut-être étendu aux homologues cellulaires activés de ces deux gènes, nous pourrons envisager l'étude au niveau moléculaire des mécanismes de cette coopération.

Enfin, il restera à savoir si ce modèle pourrait avoir une valeur prédictive pour des cancers humains spontanés, c'est à dire si dans de tels cancers on peut trouver le gène <u>mil</u> et le gène <u>myc</u> activés ensembles. La connaissance de modes d'activation des gènes clonés permettra peut-être de faciliter ces investigations. Cette connaissance pourrait en effet donner une idée des types de modifications à rechercher pour les gènes <u>c-mil</u> et <u>c-myc</u> dans des tumeurs, modifications susceptibles d'avoir entrainé la participation de ces gènes dans l'apparition de ces tumeurs.

### RESULTATS ET DISCUSSION

# Propriétés biologiques des virus MH2 et MC29 sur fibroblastes embryonnaires de poulet



 Propriétés biologiques des virus MH2 et MC29 sur cellules de neurorétine de poulet



<u>Schéma 14</u>: Comparaison des effets biologiques des virus MH2 et MC29 sur des fibroblastes embryonnaires de poulet (FEP) et sur des cellules de neurorétine (CNR)

(Critère de transformation: clonage en milieu semi-solide)

#### I) PROPRIETES BIOLOGIQUES DES DEUX GENES v-myc ET v-mil DE MH2

Pour réaliser ce travail, il nous a fallu d'une part un système biologique adéquat et d'autre part des mutants de MH2 n'exprimant que le gène v-myc ou n'exprimant que le gène v-mil (article N° 1).

Le système biologique choisi est composé de deux types de cellules en culture, des fibroblastes embryonnaires de poulet (FEP) et des cellules de neurorétine d'embryon de poulet de 7 jours (CNR). Les FEP devaient nous permettre de mettre en évidence l'activité biologique du gène <u>v-myc</u> de MH2. En effet, la plupart des propriétés biologiques du virus MH2 (<u>v-myc</u> et <u>v-mil</u>) sont comparables à celles du virus MC29 (<u>v-myc</u>) et peuvent donc être attribuées au gène <u>v-myc</u>, bien que des différences de structure existent entre les deux gènes (Kan et al., 1984b). Parmi les propriétés communes connues à ces deux virus permettant de détecter l'activité du gène <u>v-myc</u> nous avons choisi la transformation des fibroblastes embryonnaires aviaires.

Le choix du second type cellulaire, les CNR a été quidé cette fois par un comportement du virus MH2 différent de celui du virus MC29, pouvant laisser supposer un rôle du gène v-mil (schéma 14). Les CNR sont obtenues par la dissociation des cellules qui forment la neurorétine d'embryon de poulet et se composent de neurones et de cellules gliales. Après leur mise en culture, les CNR effectuent 2 à 4 cycles de division et peuvent alors être maintenues à l'état quiescent pendant plusieurs semaines (Calothy et al., 1980). Nous nous sommes intéressé à deux effets biologiques inductibles sur les CNR, la prolifération et la transformation. La prolifération des CNR est quantifiée par comptage des cellules en fonction du temps de culture et peut être représentée par des courbes de croissance. Le critère de transformation des CNR, tout comme celui des fibroblastes aviaires, est le test de clônage en milieu semi-solide qui détecte la capacité de cellules transformées à se diviser en absence d'ancrage (Macpherson et Montagnier, 1964). La prolifération des CNR quiescentes peut être induite par infection avec des mutants du virus RSV (v-src) (Calothy et al., 1978), la prolifération et la transformation peuvent être induites par certains virus dont le RSV sauvage ou MH2 (v-myc et v-mil). Par contre, l'infection des CNR quiescentes par le virus MC29 (v-myc) n'a pas d'effet apparent sur ces cellules (article N° 1, Fig. 1 a). En supposant que les différences de comportement des virus MH2 et MC29 n'étaient pas dues aux différences de structure des gènes v-myc de ces deux virus, cela laissait entrevoir un rôle du gène v-mil dans l'induction de la prolifération et/ou de la transformation des CNR par le virus MH2.



<u>Schéma 15 A</u>: Structure des ARN du virus MH2 dans une cellule infectée et caractérisation des mutants isolés biologiquement, MH2-C125 et MH2-PA200

Les mutants nécessaires à l'étude des propriétés de chacun des gènes de MH2 ont été obtenus par deux voies différentes, des mutations spontanées bien que rares, étant susceptibles de modifier dans un mutant, les propriétés originelles des gènes v-myc ou v-mil. D'une part des mutants biologiques du virus MH2 ont été isolés dans le laboratoire de G.Calothy (schéma 15A), le mutant MH2-Cl25 qui n'exprime que le gène v-myc et le mutant MH2-PA200 qui n'exprime que le gène v-mil de MH2. La caractérisation du mutant MH2-Cl25 (article N° 2) a montré que le génome de ce virus est en fait l'ARN sous-génomique de MH2 (Saule et al., 1983) propagé par le "helper" RAV-1 en l'absence de l'ARN génomique. La caractérisation du mutant MH2-PA200 (article N° 3) suggère une recombinaison homologue entre les virus MH2 et RAV-1 conservant seul l'oncogène v-mil fonctionnel (schéma 15A). Il apparait probable que le virus RAV-1 a récupéré des séquences du virus MH2 (la partie 3' des séquences gag, le gène v-mil et la partie 5' du gène v-myc) au détriment de séquences virales (des séquences 3' du gène gag, le gène pol et des séquences 5' du gène env).D'autre part, nous avons fabriqué des mutants à partir du provirus cloné de MH2, le mutant MH2-OB de telle sorte qu'il n'exprime que le gène v-myc et le mutant MH2-LI200 de telle sorte qu'il n'exprime que le gène v-mil (schéma 15B). La suppression du produit de v-mil dans MH2-OB et du produit de v-myc dans MH2-LI200 résultent d'un changement de la phase de lecture de ces gènes, occasionné par la délétion de séquences du gène gag (fragment BamHI-BamHI) pour le mutant MH2-OB et d'une addition de quatre nucléotides au site SalI du gène v-myc pour le mutant MH2-LI200 (schéma 15B). Les formes virales de ces mutants ont été obtenues en cotransfectant dans des celules aviaires, l'ADN de ces mutants avec l'ADN d'un provirus compétent pour la réplication (RAV-1).

Les effets biologiques de ces deux séries de mutants ont été analysés dans le système biologique défini (schéma 16):

Les mutants  $\underline{v-myc}^+$  se comportent comme le virus MC29 dans ce système, les FEP infectés par ces mutants clonent en milieu semi-solide avec une efficacité semblable à des FEP infectés par MH2. Les CNR infectées par les mêmes mutants ne sont ni induites à proliférer (article N° 1, Fig. 1 b) ni capables de cloner en milieu semi-solide (schéma 16).

Les mutants  $\underline{v-mil}^+$  n'ont pas d'effet apparent sur les FEP. Par contre ils induisent la prolifération des CNR; les courbes de croissance des CNR infectées par les mutants  $\underline{v-mil}^+$  sont semblables aux courbes de croissance des CNR infectées par MH2 (article N° 1, Fig. 1 b). Cependant des CNR infectées par de tels virus ne clonent pas en milieu semi-solide contrairement aux CNR infectées par MH2 (schéma 16).



<u>Schéma 15 B</u>: structure des mutants fabriqués à partir du provirus cloné de MH2, MH2-OB et MH2-LI200

Si les gènes <u>v-myc</u> et <u>v-mil</u> des mutants de MH2 avaient conservé respectivement les propriétés des gènes <u>v-myc</u> et <u>v-mil</u> de MH2 cela impliquait que la transformation des CNR par MH2 nécessitait la coopération des gènes <u>v-myc</u> et <u>v-mil</u>, puisque ni <u>v-myc</u> seul ni <u>v-mil</u> seul n'était capable d'induire cette transformation. La transformation des CNR par <u>v-myc</u> semblait donc nécessiter que ces CNR soient d'abord induites à proliférer par le produit du gène <u>v-mil</u>. Cela a pu être démontré par l'expérience de reconstitution représentée sur le schéma 16: des CNR quiescentes ont été induites à proliférer par infection avec un mutant <u>v-mil</u><sup>+</sup> et ces CNR proliférantes mais non transformées ont alors pu être transformées par surinfection avec un mutant <u>v-myc</u><sup>+</sup>.

### II) DISCUSSION

Ces travaux ont permis de définir un effet biologique pour les gènes v-mil et v-myc du rétrovirus oncogène MH2 dans un système biologique composé de fibroblastes de poulet (FEP) et de cellules de neurorétine d'embryon de poulet de 7 jours (CNR). Les rôles du gène v-mil et du gène v-myc dans les effets biologiques du virus MH2 dans ce système ont pu être déterminés. La transformation des FEP par MH2 est sous la dépendance du gène v-myc seul, l'induction de la prolifération des CNR par MH2 est sous le contrôle du gène v-mil seul et la transformation des CNR par MH2 requiert la coopération des deux gènes v-mil et v-myc. Les propriétés biologiques de chacun des deux gènes v-mil et v-myc ont été déterminées grâce à des mutants de MH2 n'exprimant que l'un ou l'autre de ces gènes. Pour chaque gène, deux types de mutants ont été utilisés, les uns fabriqués in vitro à partir du provirus cloné de MH2, les autres sélectionnés biologiquement à partir du virus MH2. Nous avons caractérisé le contenu génétique de ces derniers après clonage de leurs provirus intégrés dans le génome de cellules infectées. Les deux mutants v-myc<sup>+</sup> (MH2-OB, mutant fabriqué in vitro et MH2-Cl25 mutant isolé biologiquement) ont des propriétés semblables dans le système biologique utilisé: ils transforment les FEP et n'ont pas d'effet apparent sur les CNR. Les deux mutants v-mil+ (MH2-LI200 fabriqué in vitro et MH2-PA200, isolé biologiquement) ont également des propriétés semblables, ils induisent la prolifération des CNR sans les transformer et n'ont pas d'effet apparent sur les FEP. Avec ces mutants nous avons pu reconstituer toutes les propriétés du virus MH2 définies dans le système. Ceci tend à montrer que les gènes v-myc et v-mil contenus dans les mutants ont gardé les propriétés originelles de chacun des gènes respectifs du virus MH2 sauvage. Cependant, si dans les mutants v-myc<sup>+</sup> aucun peptide de la protéine v-mil ne peut être exprimé, dans chacun des mutants v-mil+, MH2-PA200 et MH2-LI200, un ARN sous-génomique est

Propriétés biologiques des mutants v-myc+



# Propriétés biologiques des mutants v-mil+



Expérience de reconstitution



<u>Schéma 16</u>:

Propriétés biologiques des mutants v-myc+ et des mutants v-mil+

Expérience de reconstitution des propriétés du virus MH2 sur les CNR
formé, ARN qui pourrait coder respectivement pour 32 A.A et 220 A.A de la partie NH2 de la protéine <u>v-myc</u> qui en compte 423 (schéma 15). On ne peut donc pas exclure formellement un rôle de ces peptides <u>v-myc</u> dans l'induction de la prolifération des CNR par les mutants <u>v-mil</u><sup>+</sup>. Cette éventualité est cependant rendue fort peu probable par des expériences menées dans notre laboratoire par Christine Dozier qui a fabriqué un mutant <u>mil</u><sup>+</sup> ne pouvant pas exprimer les peptides <u>v-myc</u> incriminés. Ce mutant induit la prolifération des CNR (sans les transformer) avec une efficacité comparable à celle de nos mutants v-mil<sup>+</sup>.

## A) Propriétés du gène v-myc de MH2

Aucune différence entre les effets biologiques du gène v-myc de MH2 et ceux du gène v-myc de MC29 n'a pu être décelée dans les FEP et dans les CNR, ni dans les autres cellules testées: fibroblastes embryonnaires de caille (FEC) ou macrophages de poulet (Graf et al., sous presse). Les différences de structure du gène v-myc de MH2 par rapport au gène v-myc de MC29 ne semblent donc pas influencer de façon détectable les propriétés biologiques in vitro de ce gène. Ces différences de structures sont de deux ordres. D'une part, bien que les deux protéines v-myc de MC29 et de MH2 soient des protéines de fusion avec des déterminants du gène de structure viral gag, la proportion des déterminants gag est différente dans les deux protéines. La P110<sup>gag-myc</sup> de MC29 compte 450 AA de la partie NH2 terminale du gène qag tandis que la  $p61^{v-myc}$  de MH2 n'en compte que 6. D'autre part dans les séquences v-myc elles-mêmes, 38 AA répartis sur toute la séquence différent entre ces deux protéines (Kan et al., 1984b). Si ces différences ne semble pas avoir d'influence sur le pouvoir transformant du gène v-myc in vitro, en ont-elles sur son spectre oncogène in vivo ? Afin de tester cette hypothése, une étude comparative des spectres oncogènes chez le poulet du mutant MH2-Cl25 et du virus MC29 est en cours en collaboration avec le groupe de Françoise Dieterlein.

#### B) Sélection des mutants biologiques v-myc<sup>+</sup>

Plusieurs mutants comparables au virus MH2-Cl25, c'est à dire correspondant à la propagation de l'ARN sous-génomique de MH2, ont été isolés avec une fréquence de 1 pour 10 par rapport au virus sauvage. Ces résultats indiquent que si l'ARN sous-génomique de MH2 est encapsidé dans les virions, il est nettement défavorisé par rapport à l'ARN génomique. Ceci pourrait refléter le fait que l'ARN sous-génomique a perdu par épissage des régions supposées être impliquées dans les phénomènes d'encapsidation (Pugatsch et Stacey, 1983). Cependant les mutants biologiques v-myc<sup>+</sup> ont un titre infectieux voisin de celui du virus MH2

- 40 -

sauvage ce qui suppose que lorsqu'il est propagé seul par un virus "helper", l'ARN sous-génomique a une efficacité d'encapsidation comparable à l'ARN génomique. L'explication d'un tel phénomène reste à découvrir.

# C) Propriétés du gène v-mil de MH2

Ces travaux ont permis d'associer pour la première fois une propriété intrinsèque au gène <u>v-mil</u> de MH2. En effet, dans un autre système que nous décrirons plus loin, le gène <u>v-mil</u> n'a une activité biologique détectable que s'il est associé au gène <u>v-myc</u>. Le gène <u>v-mil</u> est capable seul d'induire la prolifération des CNR sans les transformer. Cependant la prolifération des CNR infectées par <u>v-mil</u> est limitée à 20 cycles de division environ, ce qui est du même ordre de grandeur que le nombre de divisions effectuées par des fibroblastes embryonnaires de poulet mis en culture. Ceci pourrait signifier que les CNR -qui sont des cellules à un stade de différenciation avancé- seraient bloquées à l'état quiescent avant d'avoir épuisé leur potentiel de division et que le gène <u>v-mil</u> induirait leur prolifération en levant ce blocage. Une telle hypothèse pour le mode d'action de <u>v-mil</u> pourrait expliquer l'absence d'effet de ce gène sur les FEP qui eux semblent pouvoir épuiser spontanément leur potentiel de division dès leur mise en culture.

#### D) Activité kinase de la protéine v-mil et prolifération

Les oncogènes viraux ont été classés en familles selon des critères d'homologie de structure. Le groupe de G.Calothy a montré que tous les gènes testés appartenant à la famille <u>src</u>, dont <u>v-mil</u> fait partie, induisent la prolifération des CNR. Ces gènes ont en commun une activité kinase qui pourrait être le moyen par lequel ils induisent la prolifération des CNR. Cette hypothèse est testée dans notre laboratoire par Fabienne Denhez qui analyse les propriétés biologiques sur les CNR de mutants dans lesquels l'activité kinase de la protéine <u>v-mil</u> est abolie par des mutations dirigées affectant le site de fixation de l'ATP nécessaire à la phosporylation.

# E) Le gène v-mil de MH2 est-il oncogène ?

Dans nos conditions et pour les critères utilisés, le gène <u>v-mil</u> n'a pas d'activité transformante décelable in vitro, ni sur les CNR ni sur les FEP et des observations laissent suggérer que le pouvoir oncogène chez le poulet du mutant MH2-PA200 (<u>v-mil</u><sup>+</sup>) est très réduit (Graf et al., sous presse). Par contre, l'oncogène viral <u>v-raf</u>, homologue murin du gène <u>v-mil</u> (Jansen et al., 1984), est responsable du pouvoir transformant du virus de sarcome murin MSV-3611 (Rapp et al., 1983b). Les deux gènes viraux ont pourtant été transduits à partir du même gène cellulaire phylogénétiquement conservé (Kan et al., 1984a). Cependant, outre la différence des espèces dans lesquelles ces deux gènes viraux ont été testés pour leur pouvoir oncogène, des différences de structure existent entre les gènes <u>v-mil</u> et <u>v-raf</u> qui pourraient rendre compte pour une part des différences de comportement de ces gènes. Cette hypothèse pourrait être testée en étudiant le pouvoir oncogène chez le poulet (respectivement la souris) du virus MH2-PA200 (respectivement MSV-3611) dans lequel le gène <u>v-mil</u> (respectivement <u>v-raf</u>) serait remplacé par le gène <u>v-raf</u> (respectivement v-mil).

# F) Sélection des mutants biologiques v-mil+

Le mutant v-mil<sup>+</sup> MH2-PA200 sélectionné à partir du virus sauvage MH2 est le résultat d'une recombinaison entre le gènome du virus "helper" et le génome de MH2. Un mutant MH2-PA201 du même type que MH2-PA200 a été detecté dans une culture à long terme de CNR infectées par un virus MH2 sauvage (article N° 3). L'analyse des transcrits viraux dans ces cellules montre que les ARN du mutant MH2-PA201 sont plus abondants que ceux du virus sauvage. La détection dans ces cellules d'un seul type de mutant qui semble prendre l'avantage sur le virus sauvage suggère qu'un mécanisme sélectif pourrait être responsable de l'émergence de ces mutants, mécanisme spécifique aux CNR puisque de tels mutants n'ont pas été détectés dans des cultures de FEP infectées par le même virus MH2. La pression de sélection favorisant le maintien des mutants v-mil<sup>+</sup> dans les CNR infectées par MH2 pourrait résulter du comportement différents des CNR vis à vis des deux virus. Les CNR transformées par MH2 ont une adhérence au plastique de la boite de culture plus faible que les CNR infectées par les mutants v-mil+, une proportion importante de ces cellules passe dans le surnageant de culture et sont ainsi éliminées.

### G) Coopération des gènes v-myc et v-mil

Ni le gène <u>v-myc</u> seul ni le gène <u>v-mil</u> seul n'est capable d'induire la transformation des CNR. Dans le système étudié, l'induction de la prolifération des CNR par le gène <u>v-mil</u> est un préalable nécessaire à leur transformation par le gène <u>v-myc</u>. Cette transformation en plusieurs étapes pourrait constituer un modèle in vitro pour l'étude du processus multiétape observé dans l'apparition des cancers spontanés. Un autre exemple de coopération implique également les gènes du virus MH2 cette fois dans des macrophages de poulet (Graf et al., sous presse). Dans ce système c'est l'effet du gène <u>v-mil</u> qui est tributaire de l'effet du gène <u>v-myc</u>. En effet le gène v-mil seul n'a pas d'effet apparent, le gène v-myc seul transforme

- 42 -

les macrophages qui restent cependant dépendant pour leur prolifération d'un facteur de croissance, le cMGF ("cnicken Myelomonocytic Growth Factor"). L'infection par le mutant  $\underline{v-mil}^+$  MH2-PA200 rend indépendant du cMGF la prolifération de ces mêmes macrophages transformés qui produisent alors eux-mêmes ce facteur de croissance. Transposée chez l'animal cette coopération induit les effets suivants: les macrophages transformés par le gène  $\underline{v-myc}$  sont peu tumorigènes et ne métastasent pas tandis que les macrophages transformés par le virus MH2 sont hautement tumorigènes et métastasent (Linial, 1982; Graf et al., sous presse). Ces résultats montrent que si le gène  $\underline{v-mil}$  seul n'est pas oncogène chez le poulet, son association avec le gène  $\underline{v-myc}$  dans le rétrovirus MH2 n'est pas le fait du hasard puisque cette association apporte au virus un pouvoir oncogène accru par rapport à un virus ne contenant que le gène  $\underline{v-myc}$ .

L'exemple du rétrovirus MH2 montre que l'étude des rétrovirus à deux oncogènes peut conduire à mettre en évidence, et ce dans plusieurs tissus, des étapes successives de déréglements qui pourraient ressembler à celles observées dans des cancers spontanés où ces étapes semblent être sous la dépendance de gènes cellulaires activés, peut-être des gènes homologues aux oncogènes viraux.



<u>Schéma 17</u>: Deux chimères du gène c-myc humain conduisant à l'expression dans les fibroblastes aviaires d'une protéine myc humaine normale

Afin de tester si ce modèle de coopération peut être étendu aux deux gènes humains activés c-myc et c-mil, il nous fallait tout d'abord rechercher le mode d'activation capable de conférer aux deux gènes clonés des propriétés analogues aux oncogènes viraux dans le système utilisé. Ce travail a été en partie réalisé pour le gène humain c-myc. Les données de la littérature semblaient suggérer qu'une expression constitutive du gène c-myc pourrait être suffisante pour activer ce gène. Nous avons testé cette hypothèse et montré que l'expression forcée du gène humain normal c-myc transforme des fibroblastes embryonnaires de caille (FEC) avec une efficacité comparable à celle du gène v-myc de MH2. Pour réaliser ce travail, nous avons utilisé un clone du gène humain c-myc que nous avions isolé d'une banque de gènes de foie foetal et dont la séquence nucléotidique a été déterminée en collabroration avec le groupe de Francis Galibert (Gazin et al., 1984). Afin d'obtenir l'expression du gène humain c-myc (H-c-myc) dans les cellules aviaires, nous avons fabriqué des chimères dans lesquelles les séquences codantes de H-c-myc sont sous le contrôle de séquences promotrices de transcription virale contenues dans le LTR d'un rétrovirus aviaire (schéma 17). Certaines de ces chimères ont été construites de telle sorte qu'elles permettent l'expression dans les cellules récipientes d'une protéine c-myc identique à la protéine humaine, c'est à dire sans fusion avec des peptides de gènes de structure viraux. L'une des chimères permet l'expression d'ARN identiques aux ARN myc observés dans les cellules humaines normales. Les ARN sont initiés dans les promoteurs usuels du gène c-myc humains activés par les séquences "enhancer" du LTR viral et se terminent au site de polyadenylation du gène c-myc (schéma 17A). L'autre chimère a permis d'obtenir l'expression d'un ARN susceptible d'être propagé par un virus "helper". Cet ARN est initié dans un promoteur viral et se termine par les séquences U3-R, le signal de polyadenylation du gène myc ayant été éliminé (schéma 17B).

Ces chimères ont été introduites dans des FEC par la méthode de précipitation au phosphate de calcium (Graham et Van der Eb, 1973). Des foyers de cellules transformées sont apparus avec une fréquence semblable à celle de l'ADN du mutant v-myc<sup>+</sup> de MH2, MH2-Cl25 ou de l'ADN du provirus de MC29. Nous avons vérifié la présence des chimères dans les cellules transformées. Les transcrits contenant les séquences codantes de H-<u>c-myc</u> ont été analysés et ont une structure qui correspond à un épissage correct attendu (schéma 17). Enfin la protéine humaine <u>c-myc</u> a été détectée dans les cellules transformées par immunoprécipitation avec des sérums de lapin immunisé contre des polypeptides <u>c-myc</u> humain produits chez E.Coli.

Nous avons obtenu un virus porpageant les séquences codantes  $H-\underline{c-myc}$ en cotransfectant la chimère décrite dans le schéma 17B avec de l'ADN d'un provirus "helper", pRAV-1. Ce virus, v-AHM, est capable de transformer en masse des cultures de fibroblastes aviaires d'une manière comparable au mutant <u>v-myc</u><sup>+</sup> MH2-Cl25. Un provirus de v-AHM a été isolé d'une banque de gènes de cellules infectées par le virus v-AHM. Ce provirus est biologiquement actif, il transforme les FEC avec une efficacité identique à celle de la chimère de départ. La séquence nucléotidique des régions codantes  $H-\underline{c-myc}$  du provirus v-AHM a été déterminée par le groupe de Brigitte Debuire et son analyse a montré qu'<u>aucune mutation</u> n'est intervenue dans ces régions. L'expression forcée de la protéine normale humaine <u>myc</u> est donc capable de transformer des cellules embryonnaires de caille.

#### IV) DISCUSSION

Nous avons montré que l'expression forcée du gène humain <u>myc</u> est suffisante pour conférer à ce gène un pouvoir transformant in vitro semblable au gène <u>v-myc</u>. Ces résultats confirment ceux obtenus dans un autre système par Lee et al (1985). En effet ce groupe a montré que le gène humain <u>c-myc</u> sous la dépendance de promoteurs viraux est capable tout comme le gène <u>v-myc</u> de coopérer avec le gène <u>ras</u> activé pour transformer des fibroblastes embryonnaires de rat. De plus nous avons montré que dans les processus de transfection et de propagation des séquences codantes <u>c-myc</u> humaines dans les cellules aviaires n'est apparue aucune mutation qui aurait pu participer au pouvoir transformant du gène <u>c-myc</u> humain. C'est donc la protéine <u>normale myc</u> humaine qui, surexprimée dans ces fibroblastes, est responsable de leur transformation.

Ceci suggère que le gène humain <u>myc</u> est susceptible de jouer un rôle dans l'apparition des tumeurs où il a été trouvé activé par une dérégulation de son expression sans que la séquence nucléotidique de ses régions codantes soit modifiée. Cependant ce mode d'activation du gène <u>c-myc</u> n'est peut-être pas exclusif, comme le montre l'exemple du gène <u>c-ras</u> qui peut acquérir un pouvoir transformant soit par une surexpression soit par des mutations ponctuelles (introduction, paragraphe: Différences entre <u>c-onc</u> et <u>v-onc</u>). Les gènes <u>v-myc</u> des rétrovirus de la myélocytomatose aviaire comportent des mutations par rapport à leurs homologues cellulaires et ces mutations pourraient participer au pouvoir oncogène de ces virus (Braun et al., 1985). Est-ce que le pouvoir oncogène d'un virus propageant un gène <u>v-myc</u> est différent de celui d'un virus propageant un gène <u>c-myc</u> humain normal? Afin d'aborder cette question, une étude comparative du spectre oncogène chez le poulet du virus v-AHM (c-myc humain) et du virus MH2-Cl25 (v-myc de MH2) est en cours en collaboration avec le groupe de F.Dieterlein.

# CONCLUSIONS

Les travaux présentés dans ce mémoire ont permis de mettre en évidence une coopération dans la transformation entre les oncogènes v-mil et v-myc réunis dans un même virus. Différents modèles de coopération entre des oncogènes activés dans la transformation de tissus variés pourraient servir d'approche à l'étude des processus multiétape observés dans l'apparition des cancers spontanés. Ces modèles ne sont pas encore nombreux mais quelques observations sont néanmois possibles. D'une part un même couple d'oncogènes activés est capable de coopérer dans des tissus différents, des neurorétines et des macrophages aviaires. Cependant le rôle de chaque partenaire semble différent dans chaque tissu: le produit de v-myc ne transforme les cellules de neurorétine que si celles-ci sont d'abord induites à proliférer par le produit de v-mil; le produit de v-mil, par un mécanisme autocrine, rend indépendant d'un facteur de croissance des macrophages transformés par v-myc. D'autre part, le choix des partenaires pour la transformation pourrait dépendre du tissu dans lequel s'effectue leur coopération: myc et ras dans des fibroblastes de rat et myc et mil dans des cellules de neurorétines aviaires, bien que dans ce cas la différence d'espèce semble elle aussi jouer un rôle puisque le gène myc activé a un comportement différent dans les cellules mammifères qu'il "immortalise" plutôt qu'il ne transforme et dans les cellules aviaires qu'il transforme sans généralement les "immortaliser". Ces observations indiquent que les modèles de coopération entre oncogènes activés pourraient se montrer très variés, peut-être aussi variés que le sont les types de cancers spontanés. Les autres rétrovirus à deux oncogènes, tout comme MH2, pourraient eux aussi contribuer à la mise en évidence de tels modèles.

La connaissance de propriétés biologiques des gènes <u>v-mil</u> et <u>v-myc</u> permet de rechercher des modes d'activation de leurs homologues cellulaires humains. Un mode d'activation du gène <u>myc</u> humain a été déterminé, mode d'activation qui confère à ce gène des propriétés semblables in vitro à celles du gène <u>v-myc</u> du rétrovirus MH2. Des modes d'activation susceptibles de conférer au gène <u>c-mil</u> humain des propriétés semblables à celles du gène <u>v-mil</u> de MH2 sont en cours d'étude par C.Dozier. La détermination de ces modes d'activation permettrait de tester si ces deux oncogènes cellulaires activés sont capables de fournir un modèle de coopération équivalent à celui fourni par leurs homologues viraux. Dans l'affirmative nous pourrions utiliser ce modèle pour étudier au niveau moléculaire les modalités de cette coopération. Par exemple, peut-on mettre en évidence des gènes dont l'expression serait spécifiquement modulée dans les CNR par l'un ou l'autre des deux gènes humains activés ? Est-ce que des facteurs de

1

croissance sont induits par l'un ou l'autre des gènes activés, comme cela est le cas dans des macrophages transformés par le virus MH2 ?

Enfin, ce modèle de coopération entre les gènes <u>mil</u> et <u>myc</u> activés a-t-il une valeur prédictive pour des cancers humains spontanés ? En d'autres termes, peut-on trouver les deux gènes humains <u>mil</u> et <u>myc</u> activés ensembles dans certaines tumeurs où ils pourraient coopérer pour participer à l'apparition de ces tumeurs ? La détermination de modes d'activation des gènes cellulaires clonés permettra peut-être de faciliter la recherche de telles tumeurs.

# BIBLIOGRAPHIE

- 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.

- 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.

- ALBINO, A.P., R.LESTRANGE, A.I.OLIFF, M.E.FURTH and L.J.OLD (1984). Transforming ras genes from human melonoma : A manifestation of tumor heterogeneity. Nature 308 : 69-72.

- ALITALO,K., M.SCHWAB, C.C.LIN, H.E.VARMUS and J.M.BISHOP. (1983a) 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.

- ALITALO,K., G.RAMSAY, J.M.BISHOP, S.OHLSSON-PFEIFER, W.W.COLBY and A.D.LEVINSON (1983c) Identification of nuclear proteins encoded by viral and cellular myc oncogenes. Nature 306 : 274-277.

- ANDERSON,S.J., M.A.GONDA, C.W.RETENMIER and C.J.SHERR. (1984). Subcellular localization of glycoproteins encoded by the viral oncogene v-fms. J.Virol. 51 : 730-741.

- ANTONIADES, H.N. (1981). Human platelet-derived growth factor (PDGF) : purification of PDGF-I and PDGF-II and separation of their reduced subunits. Proc. Natl. Acad. Sci. 78 : 7314-7317.

- 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.

- AR-RUSHDI, A., K.NISHIKURA, J.ERIKSON, R.WATT, G.ROVERA and C.M.CROCE. (1983). Differential expression of the translocated and the untranslocated c-myc oncogene in Burkitt lymphoma. Science 222 : 390-393.

- AUGUST, J.T., D.P.BOLOGNESI, E.FLEISSNER, R.V.GILDEN and R.C.NOWINSKI. (1974). A proposed nomenclature for the virion proteins of oncogenic RNA viruses. Virology 60 : 595-601.

- BALMAIN,A. and I.B.PRAGNELL. (1983). Mouse skin carcinomas induced in vivo by chemical carcinogens have a transforming Harvey-ras oncogene. Nature 303 : 72-74.

- BALMAIN, A., M.RAMSDEN, G.T.BOWDEN and J.SMITH. (1984). Activation of the mouse cellular Harvey ras gene in chemically induced benign skin papillomas. Nature 307 : 658-660.

- BALTIMORE, D. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. Nature 226 : 1209-1211.

- BANERJI, J., L.OLSON and W.SCHAFFNER. (1983). A lymphocyte-specific cellular enhancer is located downstream of the joining region in immunoglobulin heavy chain genes. Cell 33 : 729-740.

- BARBACID, M. and A.V.LAUVER. (1981). The gene products of McDonough feline sarcoma virus have an in vitro associated protein kinase that phosphorylates tyrosine residues: Lack of detection of this enzymatic activity in vivo. J.Virol. 40 : 812-821.

- BARRE-SINOUSSI, F., J.C.CHERMANN, F.REY, M.T.NUGEYRE., S.CHAMARET, J.GRUEST, C.DANGUET, C.AXLER-BLIN, F.VEZINET-BRUN, C.ROUZIOUX, W.ROZENBAUM and L.MONTAGNIER. (1983). Isolation of T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science 220 : 868-870.

- BECKNER, S.K., S.HATTORI and T.Y.SHIH. (1985). The ras oncogene product p21 is not a regulatory component of adenylate cyclase. Nature 317 : 71-72.

- BEGG,A.M. (1927). A filtrable endothelioma of the fowl. Lancet 2 : 912-915.

- BENEDICT, W.F., A.L.MURPHREE, A.BANERJEE, C.A.SPINAL, M.C.SPARKES and R.S.SPARKES. (1983). Patient with 13 chromosome deletion : Evidence that the retinoblastoma gene is a recessive cancer gene. Science 219 : 973-974.

- BERNARD,O., S.CORY, S.GERONDAKIS, 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 tumors. EMBO J. 2 : 2375-2383.

- BERNHARD, W.. (1958). Electron microscopy of tumor cells and tumor viruses. A review. Cancer Res. 20 : 712-727.

- 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.

- BERRIDGE, M.J. (1981). Phosphatidylinositol hydrolysis : A multifunctional transducing mechanism. Mol. Cell. Endocrinol. 24 : 115-140.

- BERRIDGE, M.J. and R.F.IRVINE. (1984). Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. Nature 312 : 315-321.

- BETSHOLTZ,C., B.WETERMARK, B.EK and C.H.HELDIN. (1984). Coexpression of a PDGF-like growth factor and PDGF receptors in a human osteosarcoma cell line : implications for autocrine receptor activation. Cell 39, 447-457.

- BEUG,H.,A. VON KIRCHBACH, G.DOEDERLEIN, J.F.CONSCIENCE and T.GRAF. (1979). Chicken hematopoietic cells transformed by seven strain of defective avian leukemia viruses display three distinct phenotypes of differenciation. Cell 18 : 375-390.

- BEUG, H. and M.J.HAYMAN. (1984). Temperature-sensitive mutants of avian erythroblastosis virus : Surface expression of the erbB product correlates with transformation. Cell 36 : 963-972.

- BISHOP, J.M. (1983). Cellular oncogenes and retroviruses. Ann. Rev. Biochem. 52 : 301-354.

- 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  $G_0$  arrested fibroblasts and is post-transcriptionally regulated in response to growth factors. Nature 317 : 443-445.

- BORRELLI, E., R.HEN and P.CHAMBON. (1984). Adenovirus-2 E1A products repress enhancer-induced stimulation of transcriptase. Nature 312 : 608-612.

- BOSS,M.A. (1983). Enhancer elements in immunoglobulin genes. Nature 303 : 281-282.

- BOWEN-POPE, D.F., A.VOGEL and R.ROSS. (1984). Production of platelet-derived growth factor-like molecules and reduced expression of platelet-derived growth factor receptors accompany transforming by a wide spectrum of agents. Proc. Natl. Acad. Sci. 81 : 2396-2400.

- BRAUN, M.J., P.L.DEININGER and J.W.CASEY (1985). Nucleotide sequence of a trunsduced myc gene from a defective feline leukemia provirus. J.Virol. 55 : 177-183.

- BROOME, S. and GILBERT, W. (1985). Rous sarcoma virus encodes a transcriptional activator. Cell 40 : 537-546.

- 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.

- CAIRNS, J. and J.LOGAN. (1983). Step by step into carcinogenesis. Nature 304 : 582-583.

- CALOTHY, G., F.POIRIER, G.DAMBRINE and B.PESSAC. (1978). A transformation defective mutant of Rous sarcoma virus inducing chick embryo neuroretinal cell proliferation. Virology 89 : 75-84.

- CALOTHY,G., F.POIRIER, G.DAMBRINE, P.MIGNATTI, P.COMBES an B.PESSAC. (1980). Expression of viral oncogenes in differentiating chick embryo neuroretinal cells infected with avian tumor viruses. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 44 : 983-990.

- CANAANI.E., D.STEINER-SALTZ, E.AGHAI, R.P.GALE, A.BERREBIA and E.JANUSZEWICZ. (1984). Altered transcription of an oncogene in chronic myeloid leukaemia. Lancet I : 593-595.

- CAPON,D.J., E.Y.CHEN, A.D.LEVINSON, P.H.SEEBURG, and D.V.GOEDDEL. (1983). Complete nucleotide sequences of the T24 human bladder carcinoma oncogene and its normal homologue. Nature (1983) 302 : 33-37.

- CARPENTER, G. (1984). Properties of the receptor for epidermal growth factor. Cell 37 : 357-358.

- CAVENEE,W.K., T.P.DRYJA, R.A.PHILIPS, W.F.BENEDICT, R.GODBOUT, B.L.GALLIE, A.L.MURPHREE, L.C STRONG and R.L.WHITE. (1983). Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. Nature 305 : 779-784.

- CHANG, E.H., M.E.FURTH, E.SCOLNICK and D.R.LOWY. (1982a). Tumorigenic transformation of mammalian cells induced by a normal human gene homologous to the oncogene of Harvey murine sarcoma virus. Nature 297 : 479-482.

Ŋ

- CHEN, I.S.Y., A.J.CANN, N.P.SHAH, and R.B.GAYNOR. (1985). Functional relation between HTLV-II x and adenovirus E1a proteins in transcriptional activation. Science 230 : 570-573.

- CHIU,I.M., E.P.REDDY, D.GIVOL, K.C.ROBBINS, S.R.TRONICK and S.A.AARONSON. (1984). Nucleotide sequence analysis identifies the human c-sis proto-oncogene as a structural gene for platelet-derived growth factor. Cell 37 : 123-129.

- CHIU,I.M., A.YANIV, J.E.DAHLBERG, A.GAZIT, S.F.SKUNTZ, S.R.TRONICK and S.A.AARONSON. (1985). Nucleotide sequence evidence for relationship of AIDS retrovirus to lentiviruses. Nature 317 : 366-368.

- CLARKE, M.F., E.WESTIN, D.SCHMIDT, S.F.JOSEPHS, L.RATNER, F.WONG-STAAL, R.C.GALLO and M.S.REITZ. (1984). Transformation of NIH<sub>3T3</sub> cells by a human c-sis cDNA clone. Nature 308 : 464-467.

- COFFIN, J.M., T.C.HAGEMAN, A.M.MAXAM and W.A.HASELTINE. (1978). Structure of the genome of Moloney murine leukemia virus : A terminally redundant sequence. Cell 13 : 761-773.

- COFFIN, J.M., H.E.VARMUS, J.M.BISHOP, M.ESSEX, W.D.HARDY JR, G.S.MARTIN, N.E.ROSENBERG, E.M.SCOLNICK, R.A.WEINBERG and P.K.VOGT. (1981). A proposal for naming host cell-derived inserts in retrovirus genomes J. Virol. 40: 953-957.

- 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. 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.

- COLLETT,M.S., E.ERIKSON, A.F.PURCHIO, J.S.BRUGGE and R.L.ERIKSON. (1979b). A normal cell protein similar in structure and function to the avian sarcoma virus transforming gene product. Proc. Natl. Acad. Sci. 76 : 3159-3163.

- COLLETT,M.S., A.F.PURCHIO and R.L.ERIKSON. (1980). Avian sarcoma virus-transforming protein pp60<sup>Src</sup> shows protein kinase activity specific for tyrosine. Nature 285 : 167-169.

- COLLINS,S.J. and M.GOUDINE. (1982). Amplification of endogenous myc related DNA sequences in a human myeloid leukaemia cell line. Nature 298 : 679-681.

- COLLINS,S.J., I.KUBONISHI, I.MIYOSHI and M.T.GROUDINE. (1984). Altered transcription of the c-abl oncogene in K-562 and other chronic myelogenous leukemia cells. Science 225 : 72-74.

- 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.

and the second sec

- COOPER,G.M. and P.E.NEIMAN. (1980). Transforming genes of neoplasms induced by avian lymphoid leukosis viruses. Nature 287 : 656-659.

- COOPER, G.M. and P.E.NEIMAN. (1981). Two distinct candidate transforming genes of lymphoid leukosis virus-induced neoplasms. Nature 292 : 857-858.

- COOPER, G.M. (1982). Cellular transforming genes. Science 218 : 801-806.

- COPELAND, N.G. and G.M.COOPER. (1980). Transfection by DNAs of avian erythroblastosis virus and avian myelocytomatosis virus strain MC29. J.Virol. 33 : 1199-1202.

- 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.

- COWELL, J.K. (1982). Double minutes and homogeneously staining regions: Gene amplification in mammalian cells. Annu. Rev. Genet. 16 : 21-59.

- 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.

- CROSS,F.R., E.A.GARBER, D.PELLMAN and H.HANAFUSA. (1984). A short sequence in the p60<sup>Src</sup> N-terminus is required for p60<sup>Src</sup> myristylation and membrane association and for cell transformation. Mol.Cell. Biol. 4 : 1834-1842.

- CULLEN, B.R., K.RAYMOND and G.JU. (1985a). Functional analysis of the transcription control region located within the avian retroviral long terminal repeat. Mol. Cel. Biol. 5 : 438-447.

- CULLEN, B.R., K.RAYMOND and G.JU. (1985b). Transcriptional activity of avian retroviral long terminal repeats directly correlates with enhancer activity. J.Virol. 53 : 515-521.

- CURRAN, T., A.D.MILLER, L.ZOKAS and J.M.VERMA. (1984). Viral and cellular fos proteins : A comparative analysis. Cell 36 : 259-268.

- DAHLBERG, J.E., R.C.SAYWER, J.M.TAYLOR, A.J.FARAS, W.E.LEVINSON, H.M.GOODMAN and J.M.BISHOP. (1974). Transcription of DNA from the 70S RNA of Rous sarcoma virus. I. Identification of a specific 4S RNA which serves as primer. J.Virol. 13 : 1126-1133.

- DALLA-FAVERA, R., F.WONG-STAAL and R.C.GALLO. (1982a). Onc gene amplification in promyelocytic leukaemia cell line HL-60 and primary leukaemic cells of the same patient. Nature 299 : 61-63.

- DALLA-FAVERA,R., M.BREGNI, J.ERIKSON, D.PATTERSON, R.C.GALLO and C.M.CROCE. (1982b). Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 : 7824-7827.

- DALLA-FAVERA,R., E.P.GELMANN, S.MARTINOTTI, G.FRANCHINI, T.S.PAPAS, R.C.GALLO and F.WONG-STAAL. (1982c). Cloning and characterization of different human sequences related to the onc gene (v-myc) of avian myelocytomatosis virus (MC29). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79: 6497-6501.

and the second second

- 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.

- DANI,C., J.M.BLANCHARD, M.PIECHACZYK, S.El SABOUTY, L.MARTY and P.JEANTEUR. (1984a). Extreme instability of c-myc mRNA in normal and transformed cells. Proc. Natl. Acad. Sci. 81 : 7046-7050.

- DAVIS, M., S.MALCOLM and T.H.RABBITTS. (1984). Chromosome translocation can occur on either side of the c-myc oncogene in Burkitt lymphoma cells. Nature 308 : 286-288.

- DECKER,S.J. (1985). Phosphorylation of the erbB gene product from an avian erythroblastosis virus-transformed chick fibroblast cell line. J.Biol.Chem. 260 : 2003-2700.

- DE FEO-JONES, D., E.SCOLNICK, R.KOLLER and R.DHAR. (1983). ras-related gene sequences identified and isolated from Saccharomyces cerevisae. Nature 306 : 707-709.

- DE FEO-JONES, D., K.TATCHELL, L.C.ROBINSON, I.S.SIGAL, W.C.VASS, D.R.LOWY and E.M.SCOLNICK (1985). Mammalian and yeast ras gene products : biological function in their heterologous systems. Science 228 : 179-184.

- DE LARCO, J.E. and G.J.TODARO. (1978). Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. Proc. Natl. Acad. Sci. 75 : 4001-4005.

- DEUEL,T.F., J.S.HUANG, R.T.PROFFITT, J.U.BAENZIGER, D.CHANG and B.B.KENNEDY. (1981). Human platelet-derived growth factor : Purification and resolution into two active protein fractions. J.Biol.Chem. 256 : 8896-8899.

- 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.

- DINOWITZ,M. (1975). Innibition of Rous sarcoma virus by alpha-amanitin : Possible role of cell DNA-dependent RNA polymerase form II. Virology 66 : 1-9.

- 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.

- 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.

- DOOLITTLE,R.F., M.W.HUNKAPILLER, L.E.HOOD, S.G.DEVARE, K.C.ROBBINS, S.A.AARONSON and H.N.ANTONIADES. (1983). Simian sarcoma virus onc gene, v-sis, is derived from the gene (or genes) encoding a platelet-derived growth factor. Science 221 : 275-277.

- 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.

- DYSON, P.J., K.QUADE and J.A.WYKE. (1982). Expression of the ASV src gene in hybrids between normal and virally transformed cells : Specific suppression occurs in some hybrids but not others. Cell 30 : 491-498.

 $\geq 1 \lesssim \{ y_i \in [0, \infty) \}$ 

- EICK, D., M.PIECHACZYK, B.MENGLEIN, 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.

- EISENMAN, R.N. and V.M.VOGT. (1978). The biosynthesis of oncovirus proteins. Biochim. Biophys. Acta 473 : 187-239.

- ELLIS,R.W., D.DE FEO, T.Y.SHIH, M.A.GONDA, H.A.YOUNG, N.TSUCHIDA, D.R.LOWY and E.M.SCOLNICK. (1981). The p21 src genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses originate from divergent members of a family of normal vertebrate genes. Nature 292 : 506-511.

- ELLIS, R.W., D.R.LOWY and E.M.SCOLNICK. (1982). The viral and cellular p21 (ras) gene family, p. 107-126. In g.KLEIN (ed.), Advances in viral oncology, vol.1. Raven Press, New York.

- ERIKSON, J., J.FINAN, P.C.NOWELL and C.M.CROCE. (1982). Translocation of immunoglobulin V H genes in Burkitt lymphoma. Proc. Natl. Acad. Sci. 79 : 5611-5615.

- ERIKSON, J., A.AR-RUSHDI, H.L.DRWINGA, P.C.NOWELL and C.M.CROCE. (1983a). Transcriptional activation of the translocated c-myc oncogene in Burkitt lymphoma. Proc. Natl. Acad. Sci. 80 : 820-824.

- ERIKSON, J., K.NISHIKURA, A.AR-RUSDHI, J.FINAN, B.EMANUEL, G.LENOIR, P.C.NOWELL and C.M.CROCE. (1983b). Translocation of an immunoglobuline kappa locus to a region 3' of an unrearranged c-myc oncogene enhances c-myc transcription. Proc. Natl. Acad. Sci. 80 : 7581-7585.

- EVA,A., K.C.ROBBINS, P.R.ANDERSEN, A.SRINIVASAN, S.R.TRONICK, E.P.REDDY, N.W.ELLMORE, A.T.GALEN, J.A.LAUTENBERGER, T.S.PAPAS, E.H.WESTIN, F.WONG-STAAL, R.C.GALLO and S.A.AARONSON. (1982). Cellular genes analogous to retroviral onc genes are transcribed in human tumour cells. Nature 295 : 116-119.

- EVAN, I.E. and D.C.HANCOCK. (1985). Studies on the interaction of the human c-myc protein with cell nuclei :  $p62^{C-myC}$  as a member of a discrete subset of nuclear proteins. Cell 43 : 253-261.

- FEIG,L.A., R.C.BAST, Jr.R.C.KNAPP and C.M.COOPER. (1984). Somatic activation of ras<sup>k</sup> gene in a human ovarian carcinoma. Science 223 : 698-701.

- FELDMAN,R.A., L.H.WANG, H.HANAFUSA and P.C.BALDUZZI. (1982). Avian sarcoma virus UR2 encodes a transforming protein which is associated with a unique protein kinase activity. J.Virol. 42 : 228-236.

- FEO,S., A.AR-RUSHDI, K.MUEBNER, J.FINAN, P.C.NOWELL, B.CLARKSON and C.M.CROCE. (1985). Suppression of the normal mouse c-myc oncogene in human lymphoma cells. Nature 313 : 493-495.

- FOSTER, A.D., M.SHIBUYA and M.HANAFUSA. (1985). Activation of the transforming potential of the cellular fps gene. Cell 42 : 105-115.

- FUJITA, J., O.YOSHIDA, Y.YUASA, J.S.RHIM, M.HATANAKA and S.A.AARONSON. (1984). Ha-ras oncogenes are activated by somatic alterations in human urinary tract tumours. Nature. 309 : 464-466.

- GALLO,R.C., S.Z.SALAHUDDIN, M.POPOVIC, G.M.SHEARER, M.KAPLAN, B.F.HAYNES, T.J.PALKER, R.REDFIELD, J.OLESKE, B.SAFAI, G.WHITE, P.FOSTER and P.D.MARKHAM. (1984). Human T-lymphotropic retrovirus, HTLV-III, isolated form AIDS patients and donors at risk for AIDS. Science 224 : 500-503.

- GALLWITZ, D., C.DORATH and C.SANDER. (1983). A yeast gene encoding a protein homologous to the human c-has/bas proto-oncogene product. Nature 306 : 704-707.

- 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.

- GAZZIT,A., H.IGARASHI, I.M.CHIU, A.SRINIVASAN, A.YANIV, S.R.TRONICK, K.C.ROBBINS and S.A.AARONSON. (1984). Expression of the normal human sis-PDGF-2 coding sequence induces cellular transformation. Cell 39 : 89-97.

- GAZZOLO,L., C.MOSCOVICI, M.G.MOSCOVICI and J.SAMARUT. (1979). Response of hemopoietic cells to avian acute leukemia viruses : Effects on the differentiation of the target cells. Cell 16 : 627-638.

- GIBBS,J.B., I.S.SIGAL, M.POE and E.M.SCOLNICK. (1984b). Intrinsic GTPase activity distinguishes normal and oncogenic ras p21 molecules. Proc. Natl. Acad. Sci. 81 : 5704-5708.

- GILBOA, E., S.W.MITRA, S.GOFF and D.BALTIMORE. (1979). A detailed model of reverse transcription and tests of crucial aspects. cell 18 : 93-100.

- GILLIES, S.D., S.L.MORRISON, V.T.OI and S.TONEGAWA. (1983). A tissue-specific transcription enhancer element is located in the major intron of a rearranged immunoglobuline heavy chain gene. Cell 33 : 717-728.

- GILMAN,A.G. (1984). G proteins and dual control of adenylate cyclase. Cell 36 : 577-579.

- GILMORE,T., J.E.DE CLUE and G.S.MARTIN (1985). Protein phosphorylation at tyrosine is induced by the v-erbB gene product in vivo and in vitro. Cell 40 : 609-618.

- GONDA,T.J., D.K.SHEINESS and J.M.BISHOP. (1982). Transcripts from the cellular homologs of retroviral oncogenes : Distribution among chicken tissues. Mol.Cell.Biol. 2 : 617-624.

- GONDA,T.J. and D.METCALF. (1984). Expression of myb, myc and fos proto-oncogenes during differentiation of a murine myeloid leukemia. Nature 310 : 249-251.

- 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.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 developping human placenta suggests autocrine control of trophoblast growth. Cell 41 : 301-312.

- GOYETTE, M., C.J.PETROPOULOS, P.R.SHANK and N.FAUSTO. (1983). Expression of a cellular oncogene during liver regeneration. Science 219 : 510-511.

- GOYETTE,M., C.J.PETROPOULOS, P.R.SHANK and N.FAUSTO. (1984). Regulated transcription of c-Ki-ras and c-myc during compensatory growth of rat liver. Mol. Cell. Biol. 4 : 1493-1498.

- GRAF, T. and D.STEHELIN. (1982). Avian leukaemia viruses oncogenes and genome structure. Bioch. Bioph. Acta 651 : 245-271.

- GRAF,T., F.VON WEIZSAECKER, S.GRIESER, J.COLL, D.STEHELIN, T.PATCHINSKY, K.BISTER, C.BECHADE, G.CALOTHY and A.LEUTZ. (1986). v-mil induces autocrine growth and enhanced tumorigenicity in v-myc transformed avian macrophages. Cell (sous presse).

- 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.

- GRAIG, R.W. and R.SAGER. (1985). Suppression of tumorigenicity in hybrids of normal and oncogene-transformed CHEF cell. PNAS 82 : 2062-2066.

- GRANDGENETT, D.P., A.C.VORA and R.D.SCHIFF. (1978). A 32000-dalton nucleic acid-binding protein from avian retrovirus cores possesses DNA endonuclease activity. Virology 89 : 119-132.

- GRANDGENETT, D.P. and C.V.AJAYKUMAR. (1985). Site-specific nicking at the avian retrovirus LTR circle junction by the viral pp32 DNA endonuclease. N.A.R. 13 : 6205-6221.

- GREENBERG, M.E. and E.B.ZIFF. (1984). Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. Nature 311 : 433-438.

- HALL, A., C.J.MARSHALL, N.K.SPURR and R.A.WEISS. (1983). Identification of transforming gene in two human sarcoma cell lines as a new member of the ras gene family located on chromosome one. Nature 303 : 396-400.

- HAMLYN, P.H. and T.H.RABBITTS. (1983). Translocation joins the c-myc and the immunoglobulin gamma1 genes in a Burkitt lymphoma revealing a third exon in the c-myc oncogene. Nature 304 : 135-139.

- HANN,S.R., H.D.ABRAMS, L.R.ROHRSCHNEIDER 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.

- 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.

- HARVEY, J.J. (1964). An unidentified virus which causes the rapid production of tumours in mice. Nature 204 : 1104-1105.

- HASELTINE, W.A., D.G.KLEID, A.PANET. E.ROTHENBERG and D.BALTIMORE. (1976). Ordered transcription of RNA tumor virus genomes. J.Mol.Biol. 106 : 109-131.

- HASELTINE, W.A., A.M.MAXAM and W.GILBERT. (1977). Rous sarcoma virus genome is terminally redundant : The 5' sequence. Proc. Natl. Acad. Sci. 74 : 989-993.

- HAYDAY,A.C., S.D.GILLIES, H.SAITO, C.WOOD, K.WIMAN, W.S.HAYWARD and S.TONEGAWA. (1983). Activation of a translocated human c-myc gene by an enhancer in the immunoglobulin heavy chain locus. Nature 307 : 334-340.

.

- HAYMAN, M.J. (1978b). Synthesis and processing of avian sarcoma virus glycoproteins. Virology 85 : 475-486.

- HAYMAN, M.J. and H.BEUG. (1984). Identification of a form of the avian erythroblastosis virus erb-B gene product at the cell surface. Nature 309 : 460-462.

- HAYWARD, W.S. (1977). Size and genetic content of viral RNAs in avian oncovirus-infected cells. J.Virol. 24 : 47-63.

- HAYWARD,W.S., B.G.NEEL and S.M.ASTRIN. (1981). Activation of a cellular oncogene by promotor insertion in ALV induced lymphoid leukosis. Nature 290 : 475-480.

- HEISTERKAMP,N., J.R.STEPHENSON, J.GROFFEN, P.F.HANSEN, A.DE KLEIN, C.R.BARTRAM and G.GROSVELD. (1983). Localization of the c-abl oncogene adjacent to a translocation breakpoint in chronic myelocytic leukaemia. Nature 306 : 239-242.

- HELDIN, C.H., B.WESTERMARK and A.WASTESON. (1979). Platelet-derived growth factor : Purification and partial characterization. Proc. Natl. Acad. Sci. 76 : 3722-3726.

- 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.

- HUANG, J.S., S.S.HUANG and T.F.DEUEL. (1984). Transforming protein of simian sarcoma virus stimulates autocrine cell growth of SSV-transformed cells through PDGF cell-surface receptors. Cell 39 : 79-87.

- HUGHES,S.E., P.R.SHANK, D.H.SPECTOR, H.J.KUNG, J.M.BISHOP, H.E.VARMUS, P.K.VOGT and M.L.BREITMAN. (1978). Proviruses of avian sarcoma virus are terminally redundant, co-extensive with unintegrated linear DNA and integrated at many sites. Cell 15 : 1397-1410.

- HUNTER, T. and B.M.SEFTON. (1980). Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. Proc. Natl. Acad. Sci. 77 : 1311-1315.

- HUNTER, T. (1985). At last the insuling receptor. Nature 313 : 740-741.

- HUNTER, T. and J.A.COOPER. (1985). Protein-tyrosine kinases. Ann. Rev. Biochem. 54 : 897-930.

- JACKS, T. and H.E.VARMUS. (1985). Expression of the Rous sarcoma virus pol gene by ribosomal frameshifting. Science 230 : 1237-1242.

- JANSEN, H.W., T.PATSCHINSKY and K.BISTER. (1983a). Avian oncovirus MH2 : Molecular cloning of proviral DNA and structural analysis of viral RNA and protein. J.Virol. 48 : 61-73.

- JANSEN, H.W., R.LURZ, K.BISTER, T.I.BONNER, G.E.MARK. and U.R.RAPP. (1984). Homologous cell-derived oncogenes in avian carcinoma virus MH2 and murine sarcoma virus 3611. Nature 307 : 281-284.

- JOHNSSON, 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.

- JOHNSSON, A., C.BETSHOLTZ, K.VON DER HELM, C.H.HELDIN and B.WESTERMARK. (1985). Platelet-derived growth factor agonist activity of a secreted form of the v-sis oncogene product. Proc. Natl. Acad. Sci. 82 : 1721-1725.

- JOHNSTON, P. (1971). Taxonomic features of seven serotypes of simian and ape foamy viruses. Infect. Immun. 3 : 793-799.

- KACZMAREK,L., J.K.HYLAND, R.WAIT, M.ROSENBERG and R.BASERGA. (1985). Microinjected c-myc as a competence factor. Science 228 : 1313-1315.

- KALYANARAMAN,V.S., M.G.SARNGADHARAN, M.ROBERT-GUROFF, I.MIYOSHI, D.BLAYNEY, D.GOLDE and R.C.GALLO. (1982b). A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. Science 218 : 571-573.

- KAN,N.C., C.S.FLORDELLIS, G.E.MARK, P.H.DUESBERG and T.S.PAPAS. (1984a). A common onc gene sequence transduced by avian carcinoma virus MH2 and by murine sarcoma virus 3611. Science 223 : 813-816.

- KAN,N.C., C.S.FLORDELLIS, G.E.MARK, P.H.DUESBERG and T.S.PAPAS. (1984b). 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. 81 : 3000-3004.

- KAPLAN, J.C. et M.F.SZAJNERT. (1985). Le paradigme du lymphome de Burkitt. Medecine/Sciences 1 : 17-23.

- KATAOKA,T., S.POWERS, C.McGILL, O.FASANO, J.STRATHERN, J.BROACH and M.WIGLER. (1984). Genetic analysis of yeast RAS1 and RAS2 genes. Cell 37 : 437-445.

- KATAOKA,T., S.POWERS, S.CAMERON, O.FASANO, M.GOLDFARD, J.BROACH and M.WIGLER. (1985). Functioanl homology of mammalian and yeast ras genes. Cell 40 : 19-26.

- 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.

- KIRSTEN, W.H., L.A.MAYER, R.L.WOLLMANN and M.I.PIERCE. (1967). Studies on a murine erythroblastosis virus. J. Natl. Cancer Inst. 38 : 117-139.

- KISHIMOTO, A., Y.TAKAI, T.MORI, U.KIKKAWA and Y.NISHIZUKA. (1980). Activation of calcium and phospholipid-dependent protein kinase by diacylglycerol, its possible relation to phosphatidylinositol turnover. J.Biol. Chem. 255 : 2273-2276.

- KITAMURA,N., A.KITAMURA, K.TOYOSHIMA, Y.HIRAYAMA and M.YOSHIDA. (1982). Avian sarcoma virus Y73 genome sequence and structural similarity of its transforming gene product to that of Rous sarcoma virus. Nature 297 : 205-207.

> د از در مربق از می از در از در مغیر منبور میدود از توجه ا

- KLEIN,G. (1981). The role of gene dosage and genetic transpositions in carcinogenesis. Nature 294 : 313-318.

- 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.

- KLOETZER,W.S., S.A.MAXWELL and R.B.ARLINGHAUS. (1984). Further characterization of the P859<sup>ag-mos</sup> associated protein kinase activity. Virology 138 : 143-155.

- KOURY, G. and P.GRUSS. (1983). Enhancer-elements. Cell 33: 313-314.

- KOZEOR, 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.

- KRAKOWER, J.M., M.BARBACID and S.A.AARONSON. (1977). Radioimmunonoassay for mammalian type C viral reverse transcriptase. J.Virol. 22: 331-339.

- KRAUS, M.H., Y.YUASA and S.A.AARONSON. (1984). A position 12-activated Ha-ras oncogene in all HS578T mammary carcinosarcoma cells but not normal mammary cells of the same patient. Proc. Natl. Acad. Sci. 81 : 5384-5388.

- KRIS,R.M., I.LAX, W.GULLICK, M.D.WATERFIELD, A.ULLRICH, M.FRIDKIN and J.SCHLESSINGER. (1985). Antibodies against a synthetic peptide as a probe for the kinase activity of the avian EGF receptor and v-erbB protein. Cell 40 : 619-625.

- LAI, M.M.C., J.C.NEIL and P.K.VOGT. (1980). Cell-free translation of avian erythroblastosis virus RNA yields two specific and distinct proteins with molecular weights of 75.000 and 40.000. Virology 100 : 475-483.

- 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.

- LEAMNSON, R.N. and M.S.HALPERN. (1976). Subunit structure of the glycoprotein complex of avian tumor virus. J.Virol. 18: 956-968.

- LEDER, P., J.BATTEY, G.LENOIR, G.MOULDING, W.MURPHY, H.POITER, T.STEWARD and R.TAUB. (1983). Translocations among antibody genes in human cancer. Science 222 : 765-771.

- LEE, J.S., H.E.VARMUS and J.M.BISHOP. (1979). Virus-specific messenger RNAs in permissive cells infected by avian sarcoma virus. J.Biol.Chem. 245 : 8015-8022.

- LEE,T.H., J.E.COLIGAN, J.G.SODROSKI, W.A.HASELTINE, S.Z.SALAHUDDIN, F.WONG-STAAL, R.C.GALLO and M.ESSEX. (1984c). Antigens encoded by the 3'-terminal region of human T-cell leukemia virus : Evidence for a functional gene flanked by the env gene and 3' LTR. Science 226 : 57-61.

- 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.

5

- LENOIR, G.M., J.L.PREUD'HOMME, A.BERNHEIM, and R.BERGER. (1982). Correlation between immunoglobulin light chain expression and variant translocation in Burkitt's lymphoma. Nature 298 : 474-476.

- LEOF, E.B., W.WHARTON, J.J.VAN WYK and W.J.PLEDGER. (1982). Epidermal growth factor (EGF) and somatomedin C regulate  $G_1$  progression in competent BALB/c 3T3 cells. Exp. Cell. Res. 141 : 107-112.

- LEV, Z., N.LEIBOVITZ, O.SEGEV and B.Z.SHILO. (1984). Expression of the src and abl cellular oncogenes during the development of Drosophila melanogaster. Mol. Cell. Biol. 4 : 982-984.

- LEVINSON, A.D., S.A.COURINEIDGE and J.M.BISHOP. (1981). Structural and functional domains of the Rous sarcoma virus transforming protein (pp60<sup>SrC</sup>). Proc. Natl. Acad. Sci. 78 : 1624-1628.

- 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 systthesis. 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.

- MACARA,I.G., G.V.MARINETTI and P.C.BALDUZZI. (1984). Transforming protein of avian sarcoma virus UR2 is associated with phosphatidylinositol kinase activity : possible role in tumorigenesis. Proc. Natl. Acad. Sci USA 81 : 2728-2732.

- MACPHERSON, I. and L.MONTAGNIER. (1964). Agar suspension culture for the selective assay of cells transformed by polyoma virus. Virology 23 : 291-294.

- MALCOM,S., P.BARTON, C.MURPHY, M.A.FERGUSSON-SMITH, D.L.BENTLEY and T.RABBITTS. (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.

- MANGEL,W.F., H.DELIUS and P.H.DUESBERG. (1974). Structure and molecular weight of the 60-70 S RNA and the 30-40 S RNA of the Rous sarcoma virus. Proc. Natl. Acad. Sci. 71 : 4541-4545.

- 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.

- MATHEY-PREVOT, B., H.HANAFUSA and S.KAWAI. (1982). A cellular protein is immunologically crossreactive with and functionally homologous to the Fujinami sarcoma virus transforming protein. Cell 28 : 897-906.

- McGRATH, J.P., D.J.CAPON, D.V.GOEDDEL and A.D.LEVINSON. (1984). Comparative biochemical properties of normal and activated human ras p21 protein. Nature 310 : 644-649.

de ser de la del Carros

- 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.

- MIYOSHI,I., I.KUBONISHI, S.YOSHIMOTO, T.AKAGI, Y.OHTSUKI, Y.SHIRAISHI, K.NAGATA and Y.HINUMA. (1981). Type C virus particles in a cord T-cell line derived by cocultivating normal human cord leukocytes and human leukaeic T cells. Nature 294 : 770-771.

- MOELLING,K., B.HEIMANN, P.BEIMLING, U.R.RAPP and T.SANDER. (1984). Serine-and threonine-specific protein kinase activities of purified gag-mil and gag-raf proteins. Nature 312 : 558.

- MOELLING, K., E.PFAFF, H.BEUG, P.BEIMLING, T.BUNTE, M.E.SCHALLER and T.GRAF. (1985). DNA-binding activity is associated with purified myb proteins from AMV and E26 viruses and is temperature-sensitive for E26 ts mutants. Cell 40 : 983-990.

- MOLONEY, J.B. (1966). A virus induced rhabdomyosarcoma of mice. Natl. Cancer Inst. Monogr. 22 : 139-142.

- MULLER,R., D.J.SLAMON, J.M.TREMBLAY, M.J.CLINE and I.M.VERMA. (1982). Differential expression of cellular oncogenes during pre and post natal development of the mouse. Nature 299 : 640-644.

- MULLER,R., I.M.VERMA and E.D.ADAMSON. (1983a) Expression of c-onc genes : c-fos transcripts accumulate to high levels during development of mouse placenta, yolk sac and amnion. EMBO J. 2 : 679-684.

- MULLER,R., D.J.SLAMON, E.D.ADAMSON, J.M.TREMBLAY, D.MULLER, M.J.CLINE and I.M.VERMA. (1983b). Transcription of c-onc genes c-ras<sup>Ki</sup> and c-fms during mouse development. Mol. Cell. Biol. 3 : 1062-1069.

- MURPHREE, A.L. and W.F.BENEDICT. (1984). Retinoblastoma : clues to human oncogenesis. Science 223 : 1028-1033.

- MURRAY, M.J., B.Z.SHILO, C.SHIH, D.COWING, H.W.HSU and R.A.WEINBERG. (1981). Three different human tumor cell lines contain different oncogenes. Cell 25 : 355-361.

- 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.

- 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.

- 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.

- NEIL, J.C., D.HUGHES, R.McFARLANE, N.M.WILKIE, D.E.ONIONS, G.LEES and O.JAREET. (1984). Transduction and rearrangement of the myc gene by feline leukaemia virus in naturally occuring T-cell leukaemias. Nature 308 : 814-820.

- NEIMAN, P.E., L.JORDAN, R.A.WEISS and I.N.PAYNE. (1980b). Malignant lymphoma of the bursa of Fabricius : Analysis of early transformation. Cold Spring Harbor. Conf. Cell Proliferation 8 : 519-528.

- 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.

- NEPVEU, A., P.D.FAHRLANDER, J.A.YANG and K.B.MARCU (1985). Amplification and altered expression of the c-myc oncogene in A-MuLV-transformed fibroblasts. Nature 317 : 440-443.

- 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.

- 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.

- NODA, M., Z.SELINGER, E.M.SCOLNICK and R.H.BASSIN. (1983). Flat revertants isolated from Kirsten sarcoma virus-transformed cells are resistant to the action of specific oncogenes. Proc. Natl. Acad. Sci. 80 : 5602-5606.

- NOWELL, P., J.FINAN, R.DALLA FAVERA, R.C.GALLO, A.AR-RUSHDI, H.ROMANCZUK, J.R.SELDEN, B.S.EMANUEL, G.ROVERA and C.M.CROCE. (1983). Association of amplified oncogene c-myc with an abnormally banded chromosome 8 in a human leukaemia cell line. Nature 306 : 494-497.

- OGURA, H., H.GELDERBLOM and H.BAUER. (1974). Isolation of avian nephroblastoma virus from avian myeloblastosis virus by the infectious DNA technique. Intervirology 4 : 69-76.

- OPPERMANN, H., J.M.BISHOP, H.E.VARMUS and L.LEVINTOW. (1977). A joint product of the genes gag and pol of avian sarcoma virus : A possible precursor of reverse transcriptase. Cell 12 : 993-1005.

- OPPERMANN, H., A.D.LEVINSON, H.E.VARMUS, L.LEVINTOW and J.M.BISHOP. (1979). Uninfected vertebrate cells contain a protein that is closely related to the product of the avian sarcoma virus transforming gene (src). Proc. Natl. Acad. Sci. 76 : 1804-1808.

- OSHIMURA, M., T.M.GILMER and J.C.BARRET. (1985). Nonrandom loss of chromosome 15 in syrian hamster tumours induced by v-ha-ras plus v-myc oncogenes. Nature 316 : 636-639.

- OWEN, A.J., P.PANTAZIS and H.N.ANTONIADES. (1984). Simain sarcoma virus-transformed cells secrete a mitogen identical to platelet-derived growth factor. Science 225 : 54-56.

- OZANNE, B., R.J.FULTON and P.L.KAPLAN. (1980). Kirsten murine sarcoma virus transformed cell lines and a spontaneously transformed rat cell line produce transforming factors. J.Cell. Physiol. 105 : 163-180.

- PALMITER, R.D. and R.L.BRINSTER. (1985). Transgenic mice. Cell 41 : 343-345.

- PANET, A., D.BALTIMORE and T.HANAFUSA. (1975a). Quantitation of avian RNA tumor virus reverse transcriptase by radioimmunoassay. J.Virol. 16 : 146-152.

- PAPAGEORGE, A.G., D.DE FEO-JONES, P.ROBINSON, G.TEMELES and E.M.SCOLNICK. (1984). Saccharomyces cerevisiae synthesizes proteins related to the p21 gene product of ras genes found in mammals. Mol. Cell. Biol. 4 : 23-29.

- PAPKOFF, J., E.A.NIGG and T.HUNTER. (1983). The transforming protein of Moloney Murine Sarcoma Virus is a soluble cytoplasmic protein. Cell 33 : 161-172.

- 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., L.HENNIGHAUSEN, R.TAUB, W.DEGRADO and P.LEDER. (1984a). Antibodies to human c-myc oncogene product : Evidence of an evolutionarily conserved protein induced during cell proliferation. Science. 225 : 687-693.

- PETERS,G., F.HARADA, J.E.DAHLBERG, A.PANET, W.A.HASELTINE and D.BALTIMORE. (1977). Low-molecular-weight RNAs of Moloney murine leukemia virus : Identification of the primer for RNA-directed DNA synthesis. J.Virol. 21 : 1031-1041.

- PETERS, G. and J.E.DAHLBERG. (1979). RNA-directed DNA synthesis in Moloney murine leukemia virus : Interaction between the primer tRNA and the genome RNA. J.Virol. 31 : 398-407.

- PETERSEN, R.B. and P.B.HACKETT. (1985). Characterization of ribosome binding on Rous sarcoma virus RNA in vitro. J.Virol. 56 : 683-690.

- 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. (1977). Induction of DNA synthesis in Balb/c 3T3 cells by serum components : reevaluation of the commitment process. Proc. Natl. Acad. Sci. 74 : 4481-4485.

- 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.

- POIESZ,B.J., F.W.RUSCETTI, A.F.GAZDAR, P.A.BUNN, J.D.MINNA and R.C.GALLO. (1980b). Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. Proc. Natl. Acad. Sci. 77 : 7415-7419.

- PRIVALSKY,M.L. and J.M.BISHOP. (1982). Proteins specified by avian erythroblastosis virus coding region localization and identification of a previously undetected erb-B polypeptide. Proc. Natl. Acad. Sci. 79 : 3958-3962.

- PROUDFOOT, N.J. and G.G.BROWNLEE. (1976). 3' non-coding region sequences in eukariotic messenger RNA. Nature 263 : 211-214.

- PUGATSCH,T. and D.W.STACEY. (1983). Identification of a sequence likely to be required for avian retroviral packaging. Virology 128 : 505-511.

- PULCIANI, S., E.SANTOS, A.V.LAUVER, L.K.LONG, S.A.AARONSON and M.BARBACID. (1982a). Oncogenes in solid human tumors. Nature 300 : 539-542.

- RABBITTS,T.H., P.H.HAMLYN and R.BAER. (1983b). Altered nucleotide sequences of a translocated c-myc gene in Burkitt lymphoma. Nature 306 : 760-765.

- RABBITTS,T.H., A.FORSTER, R.BAER and P.H.HAMLYN. (1983c). Transcription enhancer identified near the human Cu immuno-globulin heavy chain gene is unavailable to the translocated c-myc gene in a Burkitt lymphoma. Nature 306 : 806-809.

- RABBITTS, P.H., A.FORSTER, M.A.STINSON and T.H.RABBITTS (1985). Truncation of exon 1 from the c-myc gene results in prolonged c-myc mRNA stability. EMBO J. 4 : 3727-3733.

- RADKE,K., H.BEUG, S.KORNFELD and T.GRAF. (1982). Transformation of both erythroid and myeloid cells by E26, an avian leukemia virus that contains the myb gene. Cell 31 : 643-653.

- RAINES,E.W. and R.ROSS. (1982). Platelet-derived growth factor. I. High yield purification and evidence for multiple forms. J.Biol. Chem. 257 : 5154-5160.

- 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., 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.

- 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.

- RAPP,U.R., M.D.GOLDSBOROUGH, G.E.MARK, T.I.BONNER, J.GROFFEN, F.H.REYNOLDS Jr. and J.R.STEPHENSON. (1983b). Structure and biological activity of v-raf, a unique oncogene transduced by retrovirus. Proc. Natl. Acad. Sci. 80 : 4218-4222.

- RAPP,U.R., J.L.CLEVELAND, K.BRIGHTMAN, A.SCOTT, J.N.IHLE (1985). Abrogation of IL-3 and IL-2 dependence by recombinant murine retroviruses expressing v-myc oncogenes. Nature 317 : 434-438.

- REDDY, E.P., R.K.REYNOLDS, E.SANTOS and M.BARBACID. (1982). A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. Nature 300 : 149-152.

- RESNICK,R., C.A.OMER and A.J.FARAS. (1984). Involvment of retrovirus reverse transcriptase-associated RNase H in the initiation of strong-stop (+) DNA synthesis and the generation of the long terminal repeat. J.Virol. 51 : 813-821.

- RETTENMIER, C.W., J.H. CHEN, M.F. ROUSSEL and C.J. SHERR. (1985a). The product of the c-fms proto-oncogene : a glycoprotein with associated tyrosine kinase activity. Science 228 : 320-322.

- RETTENMIER, C.W., M.F.ROUSSEL, C.O.QUINN, G.R.KITCHINGMAN, A.T.LOOK and C.J.SHERR. (1985b). Transmembrane orientation of glycoproteins encoded by the v-fms oncogene. Cell 40 : 971-981.

- RIFKIN, D.B. and R.W.COMPANS. (1971). Identification of the spike proteins of Rous sarcoma virus. Virology 46 : 485-489.

and the second sec

- RNA Tumour Viruses, R.WEISS, N,TEICH, M.VARMUS, J.COFFIN. (1982, 1985). Eds Cold Spring Harbor Laboratory.

- ROBBINS,K.C., H.N.ANTONIADES, S.G.DEVARE, M.W.HUNKAPILLER and S.A.AARONSON. (1983). Structural and immunological similarities between simian sarcoma virus gene product(s) and human platelet-derived growth factor. Nature 305 : 605-608.

- ROHRSCHNEIDER, I.R., R.N.EISENMAN and C.R.LEITCH. (1979). Identification of a Rous sarcoma virus transforming-related protein in normal avian and mammalian cells. Proc. Natl. Acad. Sci. 76 : 4479-4483.

- ROUS, P. (1911). A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. J.Exp. Med. 13 : 397-411.

- 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 hematopoietic cell transformation. Nature 281 : 452-455.

- ROUSSEL, M.F., C.W.RETTENMIER, A.T.LOOK and C.J.SHERR. (1984). Cell surface expression of v-fms-coded glycoproteins is required for transformation. Mol. Cell. Biol. 4 : 1999-2009.

- ROWLEY, J. (1983). Human oncogene locations and chromosome aberrations. Nature 301 : 290-291.

- ROYER-POKORA, B., S.GRIESER, H.BEUG and T.GRAF. (1979). Mutant avian erythroblastosis virus with restricted target cell specificity. Nature 282 : 750-752.

- RUCKLE,G. (1958a). Studies with the monkey intranuclear agent (MINIA) and foamy-agent derived from spontaneously degenerating monkey kidney cultures. I Isolation and tissue culture behavior of the agents and identification of MINIA as closely related to measles virus. Arch. Gesamte Virusforsch. 8 : 139-166.

- 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.

- SABRAN, J.L., T.W.HSU., C.YEATER, A.KAJI, W.S.MASON and J.M.TAYLOR. (1979). Analysis of integrated avian RNA tumor virus DNA in transformed chicken, duck, and quail fibroblasts. J.Virol. 29: 170-178.

- 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.

- SANTOS, E., S.R.TRONICK, S.A.AARONSON, S.PULCIANI and M.BARBACID. (1982). T24 human bladder carcinoma oncogene is an activated form of the normal human homologue of BALB and Harvey-MSV transforming genes. Nature 298 : 343-347.

- SANTOS, E., D.MARTIN-ZANCA, E.P.REDDY, M.A.PIEROTTI, G.DELLA-PORTA and M.BARBACID. (1984). Malignant activation of a K-ras oncogene in lung carcinoma but not in normal tissue of the same patient. Science 223: 661-664.

١

- 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.

- SCHECTER, A.L., D.F.STERN, L.VAIDYANATHAN, S.J.DECKER, J.A.DREBIN, M.I.GREENE and R.A.WEINBERG. (1984). The neu oncogene : An erb-B related gene encoding a 185.000-M tumor antigen. Nature 312 : 513-516.

- SCHIMKE, R.T. (1982). In gene amplification R.T. Schimke ed. (New York : Cold Spring Harbor Laboratory press) : 327-333.

- SCHRIER, P.I., R.BERNARDS, R.T.M.J.VAESSEN, A.HOUWELING and A.J.VAN DER EB. (1983). Expression of class I major hitocompatibility antigens switched off by highly oncogenic adenovirus 12 in transformed rat cells. Nature 305 : 771-775.

- SCHWARTZ, D.E., R.TIZARD and W.GILBERT. (1983). Nucleotide sequence of Rous Sarcoma Virus. Cell 32 : 853-869.

- 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.

- SHANK, P.R. and M.LINIAL. (1980). Avian oncornavirus mutant (SE21Qlb) deficient in genomic RNA : Characterization of a deletion in the provirus. J.Virol. 36 : 450-456.

- SHARP,D.G. and J.W.BEARD. (1952). Counts of virus particles by sedimentation on agar and electron micrography. Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 75-79.

- SHEN-ONG,G.L., E.J.KEATH, S.P.PICCOLI and M.D.COLE (1982). Novel myc oncogene RNA from abortive immunoglobulin-gene recombination in mouse plasmacytomas. Cell 31 : 443-452.

- 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.

- SHIBUYA,M., T.HANAFUSA, H.HANAFUSA and J.R.STEPHENSON. (1980). Homology exists among the transforming sequences of avian and feline sarcoma viruses. Proc. Natl. Acad. Sci. 77 : 6536-6540.

- SHIH,C., B.Z.SHILO, M.P.GOLDFARB, A.DANNENBERG and R.A.WEINBERG. (1979). Passage of phenotypes of chemically transformed cells via transfection of DNA and chromatin. Proc. Natl. Acad. Sci. 76 : 5714-5718.

- SHIMIZU,K., M.GOLDFARB, M.PERUCHO and M.WIGLER. (1983a). Isolation and preliminary characterization of the transforming gene of a human neuroblastoma cell line. Proc. Natl. Acad. Sci 80 : 383-387.

- SHIMIZU,K., M.GOLDFARB, Y.SUARD, M.PERUCHO, Y.LI, T.KAMATA, J.FERAMISCO, E.STAVNEZER, J.FOGH and M.H.WIGLER. (1983c). Three human transforming genes are related to the viral ras oncogenes. Proc. Natl. Acad. Sci. 80 : 2112-2116.

- 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.

serve about

- SODROSKI, J.G., C.A.ROSEN and W.A.HASELTINE. (1984b). Trans-acting transcriptional activation of the long terminal repeat of human T lymphotropic viruses in infected cells. Science 225 : 381-385.

- 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.

- SOUTHERN, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 38 : 503-517.

- SPANDIDOS, D.A. and N.M.WILKIE. (1984). Malignant transformation of early passage rodent cells by a single mutated human oncogene. Nature 310 : 469-475.

- SPINDER, K.R. and A.J.BERK. (1984). Rapid intracellular turnover of adenovirus 5 early region 1A proteins. J.Virol. 52 : 706-710.

- 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.

- STAVNEZER, E., D.S.GERHARD, R.C.BINARI and I.BALAZS. (1981). Generation of transforming viruses in cultures of chicken fibroblasts infected with an avian leukosis virus. J.Virol. 39 : 920-934.

- 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.

- STILES,G.E., J.L.BITTLE and V.J.CABASSO. (1964). Comparison of simian foamy virus strains including a new serological type. Nature 201 :1350-1351.

- SUGIMOTO,Y., M.WHITMAN, L.C.CANTLEY and R.L.ERIKSON. (1984). Evidence that the Rous sarcoma virus transforming gene product phosphorylates phosphotidylinositol and diacylglycerol. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81: 2117-2121.

- SUKUMAR,S., V.NOTARIO, D.MARTIN-ZANCA and M.BARBACID. (1983). Induction of mammary carcinomas in rats by nitros-methylurea involves malignant activation of H-ras-1 locus by single point mutation. Nature 306 : 658-661.

- SWANSTROM,R., H.E.VARMUS and J.M.BISHOP. (1981a). The terminal redundancy of the retrovirus genome facilitates chain elongation by reverse transcriptase. J.Biol.Chem. 256 : 1115-1121.

- SWEET,R.W., S.YOKOYAMA, T.KAMATA, J.R.FERAMISCO, M.ROSENBERG and M.CROSS. (1984). The product of ras is a GTPase and the T24 oncogenic mutant is deficient in this activity. Nature 311 : 273-275.

- SYMONDS,G., K.H.KLEMPNAUER, G.I.EVAN and J.M.BISHOP. (1984a). Induced differentiation of AMV-transformed myeloblasts : Phenotypic alteration without altered expression of the viral oncogene. Mol. Cell. Biol. 4 : 2587-2593.

- TABIN,C.J., S.M.BRADLEY, C.I.BARGMANN, R.A.WEINBERG, A.G.PAPAGEORGE, E.M.SCOLNICK, R.DHAR, D.R.LOWY and E.H.CHANG. (1982). Mechanism of activation of a human oncogene. Nature 300 : 143-149.

- TAKAI,Y., A.KISHIMOTO, Y.IWASA, Y.KAWAHASA, T.MORI and Y.NISHIZUKA. (1979a). Calcium-dependent activation of a multifunctional protein kinase by membrane phospholipids. J.Biol. Chem. 254 : 3692-3695.

- TAKEYA,T. and H.HANAFUSA. (1983). DNA sequence of the cellular gene homologous to the RSV src gene and the mechanism for generating the transforming virus. Cell 32 : 881-890.

- TAPAROWSKY, E., Y.SUARD, O.FASANO, K.SHIMIZU, M.GOLDFARB and M.WIGLER. (1982). Activation of the T24 bladder carcinoma transforming gene is linked to a single amino acid change. Nature 300 : 762-765.

- TATCHELL,K., D.T.CHALEFF, D.DEFEO-JONES and E.M.SCOLNICK. (1984). Requirement of either of a pair of ras-related genes of Saccharomyces cerevisae for spore viability. Nature 309 : 523-527.

- 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.

- 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.TANTRAVAHI, 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.

- TEMELES,G.L., J.B.GIBBS, J.S.D'ALONZO, I.S.SIGAL and E.M.SCOLNICK. (1985). Yeast and mammalian ras proteins have conserved biochemical properties. Nature 313 : 700-703.

- TEMIN, H.M. and S.MIZUTAMI. (1970). RNA directed DNA polymrase in virions of Rous Sarcoma Virus. Nature 226 : 1211-1213.

- TEMIN, H.M. and D.BALTIMORE. (1972). RNA-directed DNA synthesis and RNA tumor viruses. Adv. Virus. Res. 17 : 129-186.

- 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.

- THOMPSON, C.B., P.B. CHALLONER, P.E. NEIMAN and M.GROUDINE. (1986). Expression of the c-myb proto-oncogene during cellular proliferation. Nature 319 : 374-380.

- TODA,T., I.UNO, T.ISHIKAWA, S.POWERS, T.KATAOKA, D.BROEK, S.CAMERON, J.BORACH, K.MATSUMOTO and M.WIGLER. (1985). In yeast, RAS proteins are controlling elements of adenylate cyclase. Cell 40 : 27-36.

- ULLRICH,A., L.COUSSENS, J.S.HAYFLICK, T.J.DULL, A.GRAY, A.W.TAM, J.LEE, Y.YARDEN, T.A.LIBERMANN, J.SCHLESSINGER, J.DOWNWARD, E.L.V.MAYES, N.WHITTLE, M.D.WATERFIELD and P.H.SEEBURG. (1984). Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. Nature 309 : 418-425.

- VARMUS, H.E., P.R.SHANK, S.E.HUGHES, H.J.KUNG, S.HEASLEY, J.MAJORS, P.K.VOGT and J.M.BISHOP. (1979b). Synthesis, structure and integration of the DNA of RNA tumor viruses. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43: 851-864.

 $\begin{array}{c} & \psi \in \mathcal{L}_{2}^{(n)} \\ & \psi \in \mathcal{T}_{2}^{(n)} : \psi \in \mathcal{L}_{2}^{(n)} : \psi \in \mathcal{L}_{2}^{(n)}$ 

- VELCICH, A. and E.ZIFF. (1985). Adenovirus E1a proteins repress transcription from the SV40 early promoter. Cell 40 : 705-716.

- VENNSTROM, B. and J.M.BISHOP. (1982). Isolation and characterization of chicken DNA homologous to the two putative oncogenes of avian erythroblastosis virus. Cell 28 : 135-143.

- 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.M. (1977). The reverse trancriptase. Biochim. Biophys. Acta. 473 : 1-38.

- VOGT,P.K. (1977). Genetics of RNA tumor viruses. In comprehensive virology (ed. H.Fraenkel-Conrat and R.Wagner), vol 9 pp 341-455. Plenum Press, New York.

- VON DER HELM,K. (1977). Cleavage of Rous sarcoma viral polyprotein precursor into internal structural proteins in vitro by viral protein p15. Proc. Natl. Acad. Sci. 74 : 911-915.

- VOUSDEN,K.H. and C.J.MARSHALL. (1984). Three different activated ras genes in mouse tumours. Evidence for oncogene activation during progression of a mouse lymphoma. EMBO J. 3 : 913-917.

- WATTERFIELD,M.D., G.T.SCRACE, N.WHITTLE, P.STROOBANT, A.JOHNSON, A.WASTESON, B.WESTERMARK, C.H.HELDIN, J.S.HUANG and T.F.DEUEL. (1983). Platelet derived growth factor is structurally related to the putative transforming protein p28<sup>SIS</sup> of simian sarcoma virus. Nature 304 : 35-39.

- WEINBERG, R.A. (1981). Use of transfection to analyze genetic information and malignant transformation. Biochim. Biophys. Acta. 651 : 25-35.

- WEINHOLD, E. and B.TRIEMER. (1978). Visna bei der Ziege. Z.Veterinaermed B 25 : 525-538.

- WEISS,S.R., H.E.VARMUS and J.M.BISHOP. (1977). The size and genetic composition of virus-specific RNAs in the cytoplasm of cells producing avian sarcoma-leukemia viruses. Cell 12 : 983-992.

- WEISSMANN,C., J.T.PARSONS, J.W.COFFIN, L.RYMO, M.A.BILLETER and H.HOFSTETTER. (1975). Studies on the structure and synthesis of Rous sarcoma virus RNA. Cold Spring Harbor Symp. Quant.Bio. 39 : 1043-1056.

- 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.

- WESTIN, E.H., R.C.GALLO, S.K.ARYA, A.EVA, L.M.SOUZA, M.A.BALUDA, S.A.AARONSON and F.WONG-STAAL. (1982a). Differential expression of the amv gene in human hematopoietic cells. Proc. Natl. Acad. Sci. 79 : 2194-2198.

- WESTIN, E.H., F.WONG-STAAL, E.P.GELMANN, R.DALLA-FAVERA, T.S.PAPAS, J.A.LAUTENBERGER, A.EVA, E.P.REDDY, S.R.TRONICK, S.A.AARONSON and R.C.GALLO. (1982b). Expression of cellular homologues of retroviral onc genes in human hematopoietic cells. Proc. Natl. Acad. Sci. 79: 2490-2494.

and the filmente

- WITTE,O.N. and D.BALTIMORE. (1978). Relationship of retrovirus polyprotein cleavages to virion maturation studied with temperature-sensitive murine leukemia virus mutants. J.Virol. 26 : 750-761.

- YAMAMOTO,T., B.DE CROMBRUGGHE and I.PASTAN. (1980a). Identification of a functional promoter in the long terminal repeat of Rous sarcoma virus. Cell 22 : 787-797.

- YAMAMOTO,T., H.HIHARA, T.NISHIDA, S.KAWAI and K.TOYOSHIMA. (1983a). A new avian erythroblastosis virus, AEV-H, carries erbB gene responsible for the induction of both erythroblastosis and sarcomas. Cell 34 : 225-232.

- YUASA,Y., R.A.GOL, A.CHANG, I.M.CHIU, E.P.REDDY, S.R.TRONICK and S.A.AARONSON. (1984). Mechanism of activation of an N-ras oncogene of SW-1271 human lung carcinoma cells. Proc. Natl. Acad. Sci. 81 : 3670-3674.

- YUNIS, J.J. (1983). The chromosomal basis of human Neoplasia. Science 221 : 227-236.

ARTICLE Nº 1
# Induction of proliferation or transformation of neuroretina cells by the *mil* and *myc* viral oncogenes

C. Bechade\*, G. Calothy\* & B. Pessac†

\* Institut Curie-Biologie, BAT. 110, 91405 Orsay, France

† INSERM U.178, Hôpital Broussais, 75654 Paris Cedex 14, France

P. Martin, J. Coll, F. Denhez, S. Saule, J. Ghysdael & D. Stéhelin

Unité associeé INSERM-CNRS d'Oncologie Moléculaire, Institut Pasteur, 1 rue Calmette, 59019 Lille, France

The genome of the avian retrovirus MH2 contains, in addition to the v-myc oncogene shared with three other avian retroviruses (MC29, CMII and OK-10), a second cell-derived oncogene, v-mil (refs 1-3). Like the three other viruses, which contain only v-myc, MH2 induces mainly liver and kidney carcinomas in fowl and transforms fibroblasts and macrophages in vitro<sup>4</sup>. However, MH2 and MC29 differ in their biological properties when assayed on cultures of chicken embryo neuroretina (NR) cells. Indeed, NR cells, which normally do not multiply in vitro, are induced to proliferate and become transformed upon infection with MH2, whereas infection with MC29 has no apparent effect on these cells<sup>5,6</sup>. To analyse the functions of the two oncogenes of MH2, we isolated spontaneous and *in vitro*-constructed mutants of this virus and investigated their effects on NR cell multiplication and transformation. We report here that expression of *v*-*mil* is sufficient to induce NR cell proliferation, although it does not result in cell transformation. In addition, viruses expressing only the *v*-*myc* oncogene fail to induce any detectable change in NR cells. However, cooperation of the two oncogenes is required to achieve transformation of NR cells by MH2.

Neuroretinas, dissected from 7-day-old chicken embryos, were dissociated into essentially single-cell suspensions and plated in Eagle's basal medium containing 5% fetal bovine serum. These cultures contain only neurones and glial cells<sup>7,8</sup>. Infection of NR cells with MH2 resulted within 7-10 days in the appearance of actively proliferating cells which could be readily subcultured for several generations (Fig. 1a). These cells were morphologically transformed and displayed anchorageindependent growth capacity (results not shown). In contrast, NR cells infected with MC29, CMII or OK-10, or with the helper virus RAV-1 used as a control, retained the morphology and limited growth capacity of normal cells (Fig. 1a). This lack of phenotypic response was not due to a block in virus replication, because the v-myc products were synthesized in infected cells and supernatants of infected NR cultures contained virus that efficiently transformed chicken embryo fibroblasts (results not shown).

1111



Fig. 1 Growth kinetics of virus-infected chicken neuroretina cells. NR cells were infected with MH2 (wild-type), MC29, CMII, OK-10 and RAV-1 (a) and MH2, MH2-PA200, MH2-cl.16, MH2-cl.25, MH2-OB and RAV-1 (b), then seeded at low density ( $\sim 2 \times 10^5$  cells per 5-cm dish). Medium was renewed daily and cells from two aliquot dishes were counted as indicated. Viruses used were obtained by RAV-1 superinfection of non-producer clones. (c) Constructed mutants. B, BamH1; E, EcoR1; H, Hind111; Hp, Hpa1; K, Kpn1; P, Pst1; Pv, Pvu1; X, Xho1; L, long terminal repeat. Open boxes represent proviral sequences and closed boxes flanking cellular sequences.

Methods. Preparation of NR cell cultures and growth assay: Neuroretinas were dissected from 7-day-old chick embryos. Cells were dissociated and resuspended in Eagle's basal medium (BME) supplemented with 5% fetal calf serum. Dishes (35 mm) containing  $\sim 2 \times 10^6$  cells were infected with the various viruses. When proliferation became evident in wild-type MH2-infected cells (7-10 days post-infection), cultures were passaged once in 5-cm dishes until MH2-infected cells reached confluency, and then seeded at low density for growth assay. Isolation of class I mutants MH2-cl.16, MH2-cl.25: Two viral stocks were used. MH2 (RAV-1) was obtained by superinfecting a non-producer quail embryo fibroblast (QEF cells) clone, MH2-QB2 (ref. 11), with RAV-1. MH2 (RAV-3) was kindly provided by Dr C. Moscovici. Both viruses exhibited comparable mitogenic and transforming properties in NR cells and directed the synthesis of P100gag-mil in transformed cells. QEF cells were infected at low multiplicity with MH2 (RAV-1) or MH2 (RAV-3) and seeded 6 h later at low density in soft agar-containing medium. Colonies of transformed cells developed within 2 weeks and were individually transferred to 35-mm dishes. At confluency, RAV-1 was added to rescue virus from occasional non-producer clones. Supernatants were used to infect NR cells. Media from two such clones, 16 and 25, contained virus which failed to induce NR cell growth. MH2-cl.16 originated from MH2 (RAV-1) and MH2-cl.25 from MH2 (RAV-3). The two mutant viruses were subcloned on QEF cells in soft agar, and virus stocks rescued from non-producer colonies by RAV-1 superinfection were unable to induce NR cell multiplication, but transformed chicken fibroblasts and macrophages. Isolation of class II mutant MH2-PA200: MH2-PA200 was isolated by end-point dilution of MH2 on NR cells. NR cells were infected with serial twofold dilutions of MH2 (RAV-1), to determine the highest dilution of the virus inducing cell proliferation. The reciprocal of this dilution defined the mitogenic titre of the virus in mitogenic units (MU) per ml. Several NR cultures were then infected with 0.3-0.5 MU per plate and superinfected 1 week later with RAV-1 to rescue virus from occasional non-producer cells. Virus produced by one such culture was selected for this study because it induced NR cell multiplication in the absence of morphological transformation. This variant was designated MH2-PA200 (RAV-1). Strategy used for constructed mutants (c): DNA of pMH2-Hd plasmid<sup>1</sup> was digested with BamHI, ligated and transfected in Escherichia coli HB101 cells. A clone was selected, pMH2-OB, which lacked the 1.3-kb BamHI restriction fragment derived from the gag gene. Sequence analysis around the recombination site indicated that translation of the pMH2-OB RNA should result in the synthesis of a product containing the amino-terminal 52 amino acids of p19gag linked to 5 amino acids derived from the v-mil sequence in a +1 frameshift (C. Henry and B. Debuire, unpublished data). To construct the MH2-LI200 mutant, DNA of pMH2-Hd plasmid was partially cleaved by SalI endonuclease and cohesive termini were filled in by treatment with the Klenow fragment of DNA polymerase I. This generated a new PvuI site as expected, and should result in a +1 frameshift in the translation of the v-myc sequence. Infectious virus (MH2-OB) was rescued from pMH2-OB DNA transfected cells using RAV-1 as helper virus.

To analyse the biological properties of the two oncogenes of MH2 further, we isolated two classes of virus mutants by their capacity to alter the phenotype of NR cells. Class I mutants were selected because they were unable to induce NR cell proliferation (see Fig. 1 legend). Two such mutants, MH2-cl.16 and MH2-cl.25, were isolated from two distinct viral stocks. MH2-cl.16 and MH2-cl.25, like wild-type MH2, transformed chicken embryo fibroblasts and macrophages (T. Graf, personal communication). In contrast to wild-type virus-infected cultures, NR cells infected with either mutant were not transformed, nor were they stimulated to grow (Fig. 1b). An additional mutant virus, MH2-OB, possessing similar biological properties (Fig. 1b), was obtained by deleting most of the gag sequence in plasmid pMH2-Hd (ref. 1) which contains a biologically active provirus (this yields a premature termination of the gagmil protein, see Fig. 1c).

Two class II mutants were isolated as follows. Mutant virus MH2-PA200 was selected because it induced proliferation of NR cells, without morphological transformation (Fig. 1 legend). Such cells could be subcultured for many generations but ultimately did senesce (after ca. two month). The second mutant, MH2-LI200, with similar biological properties, was derived from plasmid pMH2-Hd (ref. 1) by generating a frameshift mutation in v-myc, resulting in the premature termination of its translation product (Fig. 1c legend).

The P100<sup>gag-mil</sup> translation product of v-mil<sup>9,10</sup> was readily detected by immunoprecipitation of lysates of <sup>35</sup>S-methioninelabelled cells infected with either wild-type MH2 or class II mutants (that is, MH2-PA200, Fig. 2b) using antisera specific for gag proteins (lanes 2) or for a bacterially expressed v-mil protein (lanes 3). In contrast, no v-mil specific protein was detected in fibroblasts transformed by class I mutants (Fig. 2c-e, respectively).

We next performed blot analyses of RNA isolated from cells infected with either wild-type or mutant viruses. As expected from previous studies<sup>1,11</sup>, cells infected with wild-type MH2 synthesized a 5.7-kilobase (kb) genomic RNA detectable with either a v-mil or a v-myc probe (Fig. 3c, lanes 1 and 2, respectively) and a 2.8-kb subgenomic RNA detected with a v-myc probe only (Fig. 3c, lane 2). The 5.7-kb genomic RNA and the 2.8-kb subgenomic RNA species are known to encode respec-



Fig. 2 Characterization of gag and mil related proteins synthesized in avian cells infected by wild-type and mutant MH2 viruses. Chicken NR cells transformed by wild-type MH2 (a), or infected by MH2-PA200 (b) and fibroblasts transformed by MH2-cl.25 (c), MH2-cl.16 (d) and MH2-OB (e) were incubated for 3 h in the presence of  $30 \,\mu$ Ciml<sup>-1</sup> of L-35S-methionine (specific activity 1,000 Ci mmol<sup>-1</sup>), lysed and immunoprecipitates prepared as described previously<sup>22</sup>. Sera used were as follows: lanes 1, preimmune rabbit serum; lanes 2, rabbit anti gag serum; lanes 3, rabbit antiserum prepared to a bacterially expressed protein corresponding to the carboxy terminus of P100<sup>gag-mil</sup> (F.D. and J.G., in preparation). Immunoprecipitated proteins were analysed by SDSpolyacrylamide gel electrophoresis as described by Laemmli<sup>23</sup> fol-

lowed by fluorography on the dried gel.



Fig. 3 Size of viral RNA in MH2 wild-type or mutant infected chicken fibroblasts and NR cells. Northern blots of polyadenylated RNA were probed in lanes 1 with a 1.1-kb BamH1-Hpa1 v-mil-specific fragment. (see Fig. 1c) and in lanes 2 with a 0.6-kb Alul/Hae111-EcoRI fragment derived from the last exon of the chicken c-myc locus<sup>24</sup>. The probes were labelled with <sup>32</sup>P by nick translation and used as described previously<sup>11</sup>. Viruses used are listed across the top of the figure. Lanes a-d, transformed fibroblasts; lane e, MH2-PA200-infected NR cells. Transformed fibroblasts in lane c were obtained after transfection with a molecularly cloned MH2 provirus (pMH2-Hd)<sup>1</sup> together with a plasmid containing a biologically active RAV-1 provirus (a generous gift from Dr J. M. Bishop).

tively the P100<sup>gag-mil</sup> and p60/61<sup>myc</sup> proteins<sup>12,13</sup>. The 2.8-kb myc-specific RNA was detected in fibroblasts transformed by MH2-cl.16, MH2-cl.25 and MH2-OB at levels similar to those observed in cells transformed by wild-type MH2 (Fig. 3a, b, d, lanes 2). No virus-specific RNA hybridizing to the v-mil probe was detected in cells infected with mutant virus MH2-cl.16 and MH2-cl.25, indicating that these mutants had lost most or all of the v-mil sequences. In addition to the 2.8-kb RNA, cells infected with MH2-OB synthesized a 4.4-kb RNA that hybridized to both v-mil and v-myc probes (Fig. 3d). This, together with the size of the fragment deleted to generate pMH2-OB (1.3-kb, see Fig. 1c), led us to conclude that the 4.4-kb RNA was the genomic RNA of MH2-OB. The 4.0-kb species detected by the v-mil probe corresponds to the previously described c-mil endogenous transcript in fibroblasts<sup>1</sup> and appears on long exposures (Fig. 3a, b, lanes 1).

In contrast, no RNA hybridizing to a v-myc probe was detected in NR cells infected with MH2-PA200 (Fig. 3e, lane 2). The only virus-specific RNA synthesized in these cells was a 5.7-kb RNA hybridizing to a v-mil probe (Fig. 3e, lane 1). This RNA also hybridized to an env probe (not shown). The MH2-PA200 provirus has been molecularly cloned and the restriction map of this provirus suggests that it has been generated by recombination between wild-type MH2 and its helper virus, resulting in the probable substitution of  $\Delta$ gag-pol- $\Delta$ env sequences of the helper by  $\Delta$ gag-mil- $\Delta$ myc sequences from wild-type MH2 (to be published elsewhere).

MH2-PA200 and MH2-LI200 were as efficient as wild-type virus in inducing proliferation of NR cells (Fig. 1b). However, in contrast to wild-type virus-infected cells, NR cells infected with either mutant were not morphologically transformed nor were they able to form colonies in soft agar-containing medium. Both virus mutants also failed to transform macrophages (T. Graf, personal communication) and chicken embryo fibroblasts (not shown). The latter is surprising since the mouse virus MSV3611<sup>19</sup> that contains v-raf, the mouse-derived counterpart of v-mil, readily transforms mouse fibroblasts. This may indicate a structural difference in the two transduced genes or a different response of the target cells in the chicken and mouse species. Finally, reconstitution experiments showed that proliferating NR cells infected with MH2-PA200 became rapidly transformed on superinfection with MC29 (not shown).

The results presented here show that the ability to induce proliferation and transformation of NR cells from 7-day-old chicken embryos is a characteristic property which distinguishes MH2 from the other v-myc-containing viruses. Characterization of mutants MH2-PA200 and MH2-LI200 demonstrates that expression of v-mil is both necessary and sufficient to account for the mitogenic property of MH2 in NR cells. However, infection of NR cells and fibroblasts with mutant viruses expressing only v-mil does not result in cell transformation. That the mutant MH2-LI200 exhibits similar biological properties indicates that the v-mil sequence of MH2-PA200 is similar to that of wild-type virus. The v-mil gene shares significant sequence homology with other oncogenes of the src gene family<sup>14</sup> which induce both proliferation and transformation of NR cells<sup>5,1</sup> Interestingly, mutants in the src gene that, like v-mil, induce NR cell multiplication without transformation, have been described<sup>5</sup>. Several oncogenes of the src gene family encode plasma membrane-associated protein kinases specific for tyrosine residues, a property also shared by several growth factor receptors<sup>16,17</sup>. In contrast, P100<sup>gag-mil</sup> appears localized in the cytoplasm of transformed fibroblasts and is associated in vitro with a serine/threonine-specific protein kinase activity<sup>18,19</sup>. Such differences in intracellular localization and/or kinase specificity may explain the lack of transforming capacity of the v-mil product. Whether the mitogenic signals induced by the expression of v-mil and v-src in NR cells share common primary targets remains to be determined.

Mutants of MH2 expressing only the v-myc oncogene fail to induce transformation and proliferation of NR cells in the conditions used, although they still transform fibroblasts and macrophages. Therefore, the v-myc genes of MH2 and MC29 seem to be functionally indistinguishable, despite their structural differences<sup>20,21</sup>. However, transformation of NR cells by the v-myc gene can be established in cells already infected with mutants expressing only the v-mil gene. These results indicate that transformation of chicken NR cells by MH2 requires cooperation of the two oncogenes.

We acknowledge support from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale. Centre National de la Recherche Scientifique, Institut Pasteur de Lille, Fondation Contre la Leucémie, Association pour la Recherche sur le Cancer. We thank A. Begue and C. Lagrou for technical assistance, and N. Devassine for the typing.

Received 12 April; accepted 7 June 1985.

- 1. Coll, J., Righi, M., de Taisne, C., Dissous, C., Gegonne, A. & Stehelin, D. EMBO J. 2, 2189-2194 (1983).
- Jansen, H. W., Ruckert, B., Lurz, R. & Bister, K. EMBO J. 2, 1969-1975 (1983).
   Jansen, H. W., Trachmann, C. & Bister, K. Virology 137, 217-224 (1984).
   Graf, T. & Stehelin, D. Biochim. Biophys. Acta 651, 245-271 (1982).

- Calothy, G. et al. Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol. 44, 983-990 (1979). Calothy, G., Poirier, F., Crisanti-Combes, P. & Pessac, B. in Avian Tumor Viruses (eds Calothy, G., Pojrier, F., Crisanti-Combes, P. & Pessac, B. in Avian Tumor Viruses (eds Barlati, S. & de Giuli-Morgham, C.) 122-133 (Piccin, Padua, 1978).
   Crisanti-Combes, P. privat, A., Pessac, B. & Calothy, G. Cell Tissue Res. 185, 159-173 (1977).
   Crisanti-Combes, P. et al. Cell Differentiation 11, 45-54 (1982).
   Hu, S. S. F., Moscovici, C. & Vogt, P. K. Virology 89, 162-178 (1978).
   Ramsay, G. M., Hayman, M. J. & Bister, K. EMBO J. 1, 111-116 (1982).
   Saule, S. et al. EMBO J. 2, 805-809 (1983).
   Pachl, C., Biegalke, B. & Linial, M. J. Virol. 45, 133-139 (1983).
   Pachl, C., Schubach, W., Eisenman, R. & Linial, M. Cell 33, 335-344 (1983).
   Galibert, F., Dupont de Dinechin, S., Righi, M. & Stehelin, D. EMBO J. 3, 383-387 (1984).
   Pessac, B. & Calothy, G. Science 185, 709-710 (1974).
   Cohen S. Fava B. & & Sawwart, T. S. Pron and Acad. Sci. U.S. 4, 70, 6227 (2014).

- Cohen, S., Brau, R. A. & Sawyer, T. S. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A. 79, 6237-6241 (1982). Heldin, C. H., Ek, B. & Ronnstrand, L. J. biol. Chem. 258, 10054-10061 (1983). 16
- 17.
- Bunte, T., Greiser-Wilke, J. & Moeling, K. EMBO J. 2, 1087-1092 (1983) 18
- Moelling, K., Heimann, B., Beimling, P., Rapp, U. & Sander, T. Nature 312, 558-561 (1984).
   Roussel, M. et al. Nature 281, 452-455 (1979).
   Kan, N. C. et al. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A. 81, 3000-3004 (1984).
- Ghysdael, J., Neil, J. C. Wallbank, A. M. & Vogt, P. K. Virology 11, 386-400 (1981).
   Laemmli, U. K. Nature 227, 680-685 (1970).
- Watson, K. D., Reddy, P. E., Duesberg, P. H. & Papas, T. S. Proc. natn. Achd. Sci. U.S.A. 80, 2146-2150 (1983).

ARTICLE Nº 2

JOURNAL OF VIROLOGY, Mar. 1986, p. 1191–1194 0022-538X/86/031191-04\$02.00/0

# 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 MH21.

The avian retrovirus Mill-Hill 2 (MH2) is a replicationdefective 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: vmyc, 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 polyprotein 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 CL25transformed 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 *Eco*RI 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  $[^{32}P]dCTP$  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) *Eco*RI fragment containing the complete provirus into the *Eco*RI 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

Vol. 57, No. 3,



J. VIROL.



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 <sup>32</sup>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 CL25 DNA and nucleotides 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, more, plasmid DNA; more, cellular DNA; D , LTR.

to transfect quail embryo cells. DNA (30  $\mu$ g) was precipitated by the calcium phosphate method on 10<sup>6</sup> 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  $\mu$ 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 CL25transformed 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 Vol. 57, 1986



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 EcoRI (RI) and KpnI (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 EcoRI 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 SstII 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 [ $^{35}$ S]methionine, lysed, and incubated with rabbit antihuman 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).

### 1194 NOTES

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. Vandenbunder 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 Francaise 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
  Hayashi, K. 1980. A cloning vehicule suitable for strand separation. Gene 11:109-115.
- 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.
- 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.
- 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.
- Maxam, A. M., and W. Gilbert. 1980. Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. Methods Enzymol. 65:499-560.
- 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.
- Pachl, C., B. Biegalke, and M. Linial. 1983. RNA and protein encoded by MH2 virus: evidence for subgenomic expression of v-myc. J. Virol. 45:133-139.
- 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.
- Riggby, 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

ARTICLE N° 3 Accepté à Virology CHARACTERIZATION OF A MH2 MUTANT LACKING THE v-myc ONCOGENE

MARTIN, P., HENRY, C.\*, DENHEZ, F., AMOUYEL, P., BECHADE, C.#, CALOTHY, G.#, DEBUIRE, B.\*, STEHELIN, D. and SAULE, S.

INSERM UNITE 186 - INSTITUT PASTEUR - 1 RUE CALMETTE - 59019 LILLE Cedex

and the second second

\* I.R.C.L. INSERM UNITE 124 - PLACE DE VERDUN - 59045 LILLE Cedex

# INSTITUT CURIE-BIOLOGIE, Bat. 110 - 91405 ORSAY

### ABSTRACT

We have previously reported that a virus, MH2-PA200, lacking the ability to transform quail embryo cells, could be isolated from wild type (wt) MH2 stocks passaged on chicken neuroretina cells. We report here the molecular cloning and extensive characterization of this MH2-PA200 provirus. Molecularly cloned MH2-PA200 DNA was found to stimulate the growth of neuroretina cells by transfection assays and our results indicate that this recombinant virus was derived from the RAV-1 helper virus, in which v-mil and a small part of v-myc of MH2 were acquired at the expense of helper ( $\Delta$ gag-pol- $\Delta$ env) sequences. In order to assess the precise boundary between the myc and env genes we determined the nucleotide sequence of the junction fragment and showed that 11 nucleotides out of 13 nucleotides of the env gene were identical to the myc sequence at the recombination point. The nucleotide sequence of the myc-env junction fragment of another similar and independently generated MH2 mutant showed similarly 9 nucleotides of homology between the env and myc sequences at the recombination point that took place at another site , suggesting that a homologous recombination occurred between MH2 and RAV-1 viruses to generate MH2-PA200 and similar mutants.

### INTRODUCTION

The avian retrovirus Mill-Hill N°2 (MH2) is a replication defective retrovirus that induces carcinomas in fowl and transforms several cell types in culture (GRAF and BEUG, 1978). The MH2 genome contains the v-myc oncogene also found in three other retroviruses (MC29, CMII, OK10) and a second cell-derived oncogene v-mil (COLL et al., 1983; JANSEN et al., 1983) related to the src gene of RSV (GALIBERT et al., 1984 ; KAN et al., 1984). In MH2 transformed cells, v-mil is expressed as a 100 kd polyprotein (HU et al., 1978) resulting from the fusion of gag and mil sequences (BECHADE et al., 1985). This cytoplasmic protein exhibits an in vitro phosphothreonine/phosphoserine kinase activity (MOELLING et al., 1984). v-myc is expressed as a 61-63 kd protein doublet encoded by a 2.8 kb subgenomic mRNA (HANN et al., 1983; MARTIN et al., 1986). We recently distinguished some biological properties of the mil and myc oncogenes by studying the properties of virus-infected avian fibroblasts and embryo neuroretina cells (NR cells). wt-MH2, MC29, CMII and OK10 which contain v-myc are able to transform avian fibroblasts whereas wt-MH2 which contains both v-mil and v-myc has in addition the ability to induce the proliferation of avian embryo NR cells (BECHADE et al., 1985). From MH2 producing chicken NR cells we isolated MH2 mutants which are unable to morphologically transform avian embryo cells and do not contain the functional v-myc oncogene. In order to define the genetic organization of such v-myc defective mutants, we molecularly cloned a v-mil containing provirus from MH2-PA200 proliferating quail NR cells (BECHADE et al., 1985). Our results suggest that MH2-PA200 was generated by homologous recombination between the RAV-1 helper virus and MH2, resulting in the replacement of most of the helper gag-pol-env sequences by v-mil and part of v-myc of MH2.

### Cells and viruses

MH2-PA200 was previously characterized (BECHADE et al., 1985), and was derived from a MH2 (RAV-1) pseudotype virus obtained by superinfection of a non-producer quail fibroblast clone MH2 QB2 with RAV-1. Another MH2 mutant (MH2-PA201) was isolated from 7-day-old chicken embryo neuroretina (CNR) cells infected by a virus produced by quail embryo cells (QEC) co-transfected with wt-MH2 DNA, pMH2-Hd (COLL et al., 1983) and helper DNA pRAV-1 (a kind gift of J.M.Bishop).

# Transfection procedure

7-day-old quail embryo neuroretina (QNR) cells were transfected with phage DNA according to the calcium method developed by GRAHAM and Van der EB (1973). Precipitated DNA (35 ug) was added in 1 ml volume to 100 mm dishes containing 10<sup>7</sup> cells. After 1 hour incubation, cells were fed with 10 ml of Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10 % fetal calf serum (FCS). Ten days later, proliferating cells were observed and were grown up in DMEM 10 % FCS.

# Nucleic acids analysis

High molecular weight DNA was isolated as described (COLL et al., 1983). Cellular or cloned DNAs were digested with restriction endonucleases (Boehringer Mannheim, FRG and BRL inc, USA) according to the supplier's instructions. Fragments were size-separated by agarose gel electrophoresis and transferred to nitrocellulose according to SOUTHERN (SOUTHERN, 1975). Total cellular RNA was extracted and fractionated on oligo (dT)-cellulose as described (SAULE et al., 1983). Polyadenylated fractions were denatured by glyoxal treatment, submitted to electrophoresis in 1 % agarose gels and transferred to nitrocellulose. Blots were hybridized to  $^{32}$ P-labelled DNA, washed and subjected to autoradiography at - 70°C as previously described (SAULE et al., 1983).

### Cloned DNA probes

DNA fragments for the preparation of <sup>32</sup>P probes were obtained from suitable recombinant plasmids by endonuclease digestions and agarose gel purification.

The LTR probe was from the RSV-SRA genome and represented the 0.36 kbp EcoRI fragment containing the LTR sequences. The <u>gag</u> probe (SacI-EcoRI), the <u>pol</u> probe (EcoRI-KpnI), the 5' <u>env</u> probe (KpnI-EcoRI) and the 3' <u>env</u> probe (EcoRI-SacI) were derived from Pr-RSV-A and previously described (SAULE et al., 1983). <u>myc</u> probes included : a 5' <u>v-myc</u> probe (HpaI-PstI) derived from pMHX-Hd (COLL et al., 1983) and a 3' c-myc probe

corresponding to the 3' half of chicken exon 3 (SAULE et al., 1984). The v-mil probe was obtained from the 1.1 kb BamHI-HpaI fragment of plasmid pMH2BS (COLL et al., 1983). The purified fragments were labelled through nick-translation reaction (Amersham nick-translation kit) in the presence of ( $^{32}P$ ) dCTP according to the supplier's instructions.

# Cloning procedures

MH2-PA200 (RAV-1) growing QNR cells were used as source of DNA and a partial EcoRI gene library was prepared in a Charon 4A vector, as reported (COLL et al., 1983), with a minor modification in the preparation of Charon 4A arms by purification on a sucrose gradient. MH2 (RAV-1) proliferating CNR cells were used similarly as source of DNA in order to isolate <u>v-myc</u> deleted MH2 CNR provirus from a partial Sau3A gene library prepared in EMBL 4 vector. One such recombinant was called MH2-PA201.

# Protein labelling and immunoprecipitation

Labelling was performed on semi-confluent cultures seeded in 100 mm Petri dishes by incubation in 3 ml of Modified Eagle Medium lacking methionine (Met) followed by the addition of 0.25 mCi <sup>35</sup>S methionine for 60 min. Cells were lysed in 3 ml of 0.1 % SDS, 1 % triton, 0.5 % deoxycholate and 1 % trasylol, Tris-HCl 10 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM buffer (RIPA) and clarified at 100,000 g for 1 hour. 0.25 ml of the supernatant was then incubated for 3 hours at 4°C with 3 ul rabbit antiserum prepared with a bacterially expressed protein corresponding to the carboxy terminal part of P100<sup>gag-mil</sup> (FD and J.GHYSDAEL, in preparation). 10 mg of protein A sepharose beads were added to each sample for 3 hours at 4°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 by elution from beads by 5 min. boiling 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 gels (BECHADE et al., 1985).

# Preparation of the env-myc fragment and nucleotide sequencing

Subcloning of the EcoRI  $\Delta$  gag mil $\Delta$ myc $\Delta$ env fragment of the MH2-PA200 provirus was performed in the EcoRI site of pKH47 (HAYASHI, 1980). Subcloning of the BamHI-EcoRI mil- $\Delta$ myc- $\Delta$ env fragment of MH2-PA201 was performed similarly in BamHI-EcoRI sites of pKH 47. MH2-PA200 plasmid DNA was digested with HincII, digests were loaded onto a 1 % agarose gel and electrophoresed overnight. The 0.4 kbp  $\Delta$ mil- $\Delta$ myc- $\Delta$ env fragment from MH2-PA200 was then recovered and digested with HaeIII. For MH2-PA201, plasmid DNA was digested with HpaI- XbaI and the 0.4 kb $\Delta$  mil- $\Delta$ myc- $\Delta$ env fragment was recovered from a 1 % agarose gel and subjected to HaeIII enzymatic digestion. Nucleotide sequencing was performed by the MAXAM and

باليها والمراجب والمراجب

GILBERT procedure (MAXAM and GILBERT, 1980). The fragments were dephosphorylated and labelled with ( $\delta^{32}$ P) ATP and polynucleotide kinase as described (HERISSE et al., 1980). To separate the two labelled strands, fragments were denatured at 92°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.

### RESULTS

# Molecular cloning of MH2-PA200 provirus

QNR cells were infected with biologically cloned MH2-PA200 (RAV-1) pseudotype virus. DNA from these cells was used as a source of DNA for the preparation of a gene library. High molecular weight DNA was partially cut with EcoRI restriction endonuclease, ligated with purified lambda charon 4A arms, packaged and amplified. One lambda phage which hybridized with the <u>v-mil</u> and 3' <u>env</u> probes was isolated, then purified and amplified. Phage DNA was prepared and digested with different restriction enzymes. Fragments were run on agarose gels, transferred to nitrocellulose and hybridized with different ( $^{32}$ P) nick translated probes. A detailed restriction map of the provirus is shown in Figure 1.

The hybridization patterns obtained (Figure 1), allowed the following observations : first, the cloned MH2-PA200 provirus contained a LTR-gag sequence probably derived from RAV-1 helper virus, since the KpnI endonuclease site present in wt-MH2-LTR but absent in RAV-1 was not found in MH2-PA200. In addition the Pst I site located in the 5' part of the gag sequence in both MH2-PA200 and the RAV-1 helper virus was not present in wt-MH2 (Figure 1). Second, the MH2-PA200 provirus hybridized to the 5' <u>v-myc</u> probe but not to the 3' <u>v-myc</u> probe suggesting that part of the <u>v-myc</u> gene was present in this recombinant virus. Finally, both the 5' and 3' <u>env</u> probes hybridized to the MH2-PA200 provirus DNA. The <u>pol</u> probe did not anneal (data not shown). Therefore it appeared that the 3' recombination point occurred between 5' <u>myc</u> sequences of wt-MH2 and 5' <u>env</u> sequences of RAV-1 helper.

### MH2-PA200-like mutants are revealed by neuroretina cells

The use of a specific biological assay (NR cell proliferation) apears reveals rapidly and efficiently MH2-PA200-like mutants. This was illustrated by analysing proviral DNA from NR cells freshly infected with virus produced from QEC transfected with pMH2-Hd and pRAV-1 DNAs; this wt-MH2 (RAV-1) virus was passaged only once on quail embryo cells (QEC) after transfection. Chicken NR cells were passaged twice 20 days after infection with cloned wt-MH2 (RAV-1) virus in order to select proliferating cells before proviral DNA analysis. Southern blots of DNAs cleaved with EcoRI or other endonucleases allowing to distinguish between parental and mutant viruses were hybridized to a <u>v-mil</u> probe (Figure 2). For example, EcoRI endonuclease which cuts in the LTRs of wt-MH2 DNA revealed a provirus-sized band of 5.5 kbp in QEC transformed by wt-MH2 (first lane). No band corresponding to recombinant mutants (expected around 3.5 to 4 kbp if the internal EcoRI site in the helper env gene were acquired) was detected, indicating that such mutants, if present, represented a minor fraction of the proviruses. A similar experiment performed on chicken NR cells (Figure 2, third lane) readily revealed a strong 4.0 kbp band corresponding to recombinant molecules, in addition to a faint 5.5 kbp wt-MH2 proviral band. The mutant molecules at 4.0 kbp differed in size from the EcoRI fragment of 3.6 kbp seen with MH2-PA200 mitogenized (quail) NR cells (Figure 2 lane 2) suggesting that distinct recombination events had occurred in these two separate experiments. These results were confirmed by using other restriction endonucleases like PstI or XhoI + HindIII (Figure 2) or other probes like gag or 5' myc (data not shown). Bands without arrows in Figure 2 represent fragments of the cellular mil DNA. We thus conclude that molecularly cloned wt-MH2 can rapidly recombine with the RAV-1 helper to yield mutants lacking most of v-myc that appear to bear a selective advantage on chicken NR cells.

Next, we examined the transcription patterns of the MH2 mutants detected in Figure 2 lanes 2 and 3. Polyadenylated mRNAs extracted from MH2-PA200 QNR and MH2 CNR cells were hybridized on northern blots with v-mil and other probes. Results in Figure 3 show that the MH2-PA200 virus exhibited a 5.6 kb genomic RNA which also hybridized with the LTR, 5' myc and 3' env probes. In addition, the LTR and 3' env probes detected a 8.4 kb and a 3.2 kb viral RNA encoded by helper RAV-1 as well as a 2.4 kb band which also hybridized to the 5' myc probe but not to the v-mil or 3' myc probes. These results suggest that the splice acceptor site of the myc gene is conserved in this provirus and leads to the expression of a small subgenomic myc-env RNA. When analysing MH2 CNR cells , a 6 kb MH2-RAV-1 recombinant genomic RNA was detected with a 3' env probe in addition to the 8.4 and 3.2 kb helper mRNAs, confirming that this was a recombinant distinct from MH2-PA200. The existence of a putative subgenomic mRNA could not be demonstrated for this recombinant since its expected size was close to that of the RAV-1 helper env mRNA at 3.2 kb (Figure 3 last lane). Nucleotide sequence of the myc-env junction in the recombinants

For further analysis of recombination, we molecularly cloned the above-described recombinant. A Sau 3A DNA library from MH2 CNR cells in lambda EMBL4 was screened with <u>mil</u> and <u>env</u> probes and a recombinant lambda phage (MH2-PA201) containing a DNA insert which hybridized to both probes was isolated. The precise boundary between <u>myc</u> and <u>env</u> sequences was then determined in MH2-PA200 as well as MH2-PA201.

- 90 -

The 0.4 kbp HincII fragment from MH2-PA200 provirus and the 0.4 kbp HpaI-XbaI fragment from MH2-PA201 provirus were purified on agarose gels, cleaved with HaeIII endonuclease and subjected to nucleotide sequence determination by the MAXAM and GILBERT procedure. In Figure 4 we compare the relevant nucleotide sequences to the wt-MH2 <u>myc</u> and SRA <u>env</u> sequences. In these two mutants it appeared that the recombination points were different but exhibited several similarities. In MH2-PA200, 11 homologous nucleotides divided into two stretches of 5 and 6 nucleotides were found between the <u>env</u> and <u>myc</u> sequences, whereas 9 homologous nucleotides divided into two stretches of 4 and 5 nucleotides, were observed in MH2-PA201. This suggested a similar mechanism of recombination for these two viruses.

The mil gene of the molecularly cloned MH2-PA200 is biologically active

We examined whether the molecularly cloned MH2-PA200 was biologically active. Lambda MH2-PA200 DNA was used to perform transfection on QNR cells. DNA (30 ug) was transfected together with RAV-1 plasmid DNA (5 ug) onto 10<sup>7</sup> QNR cells . Ten days later, growing cells were detected and propagated. These cells were checked for the presence of MH2-PA200 by protein analysis using specific antisera derived from bacterially expressed <u>v-mil</u> polypeptide. <sup>35</sup>S Met labelled total cellular extracts were challenged with rabbit anti-<u>mil</u> as well as rabbit anti-<u>gag</u> sera. Immunoprecipitated proteins characterized by their apparent molecular weight in SDS polyacrylamide gels are shown in Figure 5. The P100<u>gag-mil</u> fusion protein was detected in these growing NR cells. Virus produced by the cultures induced the growth of fresh CNR cells (data not shown). Thus we concluded that cloned MH2-PA200 provirus was biologically active.

### DISCUSSION

We reported previously that defined biological systems allowed to reveal distinct activities for the two oncogenes v-mil and v-myc of wt-MH2 (BECHADE et al., 1985) and to isolate mutants expressing only one or the other oncogene product. We have described mutants expressing the p61/63<sup>v-myc</sup> protein that transform QEC but do not induce NR cells proliferation (MARTIN et al., 1986). We now report the characterization of mutants expressing the P100gag-mil gene product that induce the proliferation of NR cells, but not transformation of QEC. Two such mutants MH2-PA200 and MH2-PA201 were molecularly cloned and the 3' recombination points were sequenced. The mutants appear to have arisen through homologous recombination between wt-MH2 and the RAV-1 helper virus used. The mutants consist of RAV-1 molecules having acquired v-mil and 200-300 nucleotides of v-myc from wt-MH2 at the expense of  $\triangle$  gag-pol- $\triangle$ env helper sequences. In both cases, the 3' recombination points occurred between myc and env sequences, but at distinct location in both genes. Little information was obtained concerning the precise 5' recombination points that occurred probably within the gag sequences between the PstI restriction site in wt-MH2 at nucleotide 1542 (GALIBERT et al., 1984) and the beginning of mil since this Pst1 site is present in wt-MH2, absent in RAV-1 and also absent in both recombinants. Finally, both mutants are expected to still produce a subgenomic mRNA (ie 2.4 kb for MH2-PA200 in Figure 3). The smallest deduced protein (for MH2-PA201) would include 6 amino acids of gag joined to 16 amino acids of myc. Although unlikely, we cannot formally exclude a participation of such a product to mitogenicity. Recombinant viruses may have occurred through reverse transcription of viral RNA, as proposed by COFFIN (1979). The quite high frequency with which mutants seem to segregate in wt-MH2 transformed CNR cells could relate to two factors. First, CNR cells induced to proliferate by MH2-PA200 like viruses remain attached to cell-culture plates whereas wt-MH2 infected cells are transformed and easily released into the culture medium. They could have lost N-CAM-mediated adhesion as shown for CNR cells transformed by Rous Sarcoma Virus (BRACKENBURY et al., 1984). Second, recombinant mutants appear to propagate much more efficiently than wt-MH2, since titers were found to be over 10<sup>6</sup> mitogenic units for MH2-PA200 (RAV-1) as compared to only 10<sup>3</sup> focus forming units for wt-MH2 (RAV-1). These two factors concur, separately or together to favour the selection of MH2-PA200 like mutants in infected CNR cells . Such a selection does not occur in chicken fibroblasts which may explain why this type of mutant was not observed previously.

the second as the second second second

Finally, with its <u>mil</u> oncogene MH2-PA200 resembles the mammalian retrovirus MSV 3611 that includes the mouse analogue <u>raf</u> (JANSEN et al., 1984) of <u>v-mil</u> and has been shown to induce sarcomas in mice. We are thus currently testing the <u>in vivo</u> properties of our mutants.

a star in the second star

### ACKNOWLEDGMENTS

We thank C.LAGROU, A.BEGUE and M.BENAISSA for excellent technical assistance, B.VANDENBUNDER and K.BOULUKOS 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. CH is a fellow of Ligue Nationale Française contre le Cancer.

Figure 1 : Characterization of cloned MH2-PA200 proviral DNA

A) Lambda MH2-PA200 phage DNA was digested with EcoRI, EcoRI-PstI, PstI, BamHI-HindIII restriction enzymes. Digests (1 ug/lane) were separated on 1 % agarose gels, transferred onto nitrocellulose and hybridized with the nick-translated probes listed across the top of the figure. Sizes of significant hybridization positive MH2-PA200 bands are indicated (arrows). B) Organization of MH2-PA200 DNA : a restriction map of the recombinant virus can be compared with that of the cloned MH2 Hd (lane 3). Restriction endonucleases used were RI : EcoRI, K : KpnI, S1 : SstI, P1 : PstI, B1 : BamHI, X1 : XhoI, B2 : BglII, H2 : HincII, P2 : PvuII, H3 : HindIII. Only the restriction sites different from those of MH2-PA200 have been indicated on wt-MH2 provirus restriction map. The first HincII site present in MH2-PA200 was also a HpaI site. SD : splice donor site, SA : splice acceptor site. lambda arm DNA  $\neg$ ; cellular DNA $\sim$ ; LTR $\bigcirc$ .

# Figure 2 : Southern blot analysis of integrated proviruses from wt-MH2 and mutant infected cells

High molecular weight DNA from infected cells was digested with EcoRI, Pst1 and Xho1-HindIII endonucleases. Size separated cellular DNA fragments were transferred to nitrocellulose and hybridized with the BamHI-HpaI  $\underline{v-mil}$  probe. Cell types and viruses are listed across the top of the figure.  $\blacktriangleright$  indicates  $\underline{v-mil}$  containing DNA fragments.

Figure 3 : Size of viral transcripts in proliferating NR cells

Poly  $A^+$  containing RNA was denatured, separated on 1 % agarose gel and transferred to nitrocellulose. Blots were hybridized with the probes listed across the top. The size of the viral transcripts is indicated in the left and right hand columns of the figure. Bands at 8.4 and 3.2 kb with the 5' <u>myc</u> probe were unexpected and probably due to a small contamination of the <u>myc</u> fragment by other MH2 related sequences.

Figure 4 : Nucleotide sequence of the myc-env junction fragment

The determined nucleotide sequences of MH2-PA200 and MH2-PA201 (shown in Figure 2 in MH2 CNR lanes)  $\underline{myc}$  -env junction were compared to the  $\underline{myc}$ sequence of wt-MH2 (GALIBERT et al., 1984) and <u>env</u> sequence of RSV (SCHWARTZ et al., 1983). For both recombinants, we have indicated the structure of the BamHI-EcoRI fragment used to determine the sequence. For MH2-PA200 the nucleotide sequence was determined by the MAXAM and GILBERT procedure (1980) on both strands, whereas one strand was sequenced for MH2-PA201. Tepresents  $\underline{myc}$ ; asterisks represent nucleotides of  $\underline{myc}$ -MH2 (upper line) and/or <u>env-RSV</u> (lower line) homologous to the nucleotides of  $\underline{myc}$ -env junction of the mutants. Stretches of nucleotides common in the three sequences are boxed.

# Figure 5 : Immunoprecipitation of P1009ag-mil protein in QNR cells transfected with lambda MH2-PA200 DNA

Growing cells were labelled for 1 hour with <sup>35</sup>S methionine, lysed and incubated with : rabbit anti-gag serum prepared with the bacterially expressed xhoI-BamHI fragment of the gag gene (F.FERRE, unpublished data) (lane 1) ; rabbit anti-mil serum (lane 2) ; and the same serum preincubated with the corresponding polypeptide (lane 3). Cell types used are indicated on top of the figure.







Figure 2





Figure 4



Figure 5

### REFERENCES

01 - BECHADE,C., CALOTHY,G., PESSAC,B., MARTIN,M., COLL,J., DENHEZ,F, SAULE,S., GHYSDAEL,J. and STEHELIN,D. (1985). Induction of proliferation or transformation of neuroretina cells by the <u>mil</u> and <u>myc</u> viral oncogenes. Nature 316 : 559-562

O2 - BRACKENBURY,R., GREENBERG,M.E. and EDELMAN,M. (1984). Phenotypic changes and loss of N-CAM mediated adhesion in transformed embryonic chicken retinal cells. J.Cell.Biol. 99 : 1944-1954

03 - COFFIN, J.M. (1979). Structure, replication, and recombination of retrovirus genomes : some unifying hypotheses. J. Gen. Virol. 42 : 1-26

04 - COLL,J., RIGHI,M., 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 (<u>v-mil</u>) in addition to the <u>myc</u> oncogene. The EMBO J. 2 : 2189-2194

05 - GALIBERT, F., S.DUPONT DE DINECHIN, M.RIGHI and D.STEHELIN (1984). The second oncogene <u>mil</u> of avian retrovirus MH2 is related to the <u>src</u> gene family. The EMBO J. 3 : 1333-1338

06 - GRAF,T. and BEUG,H. (1978). Avian leukemia viruses : interaction with their target cells in vivo and in vitro. Biochim. Biophys. Acta 516 : 269-299

07 - GRAHAM, F.L. and Van der EB, J. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. Virology 52 : 456-461

08 - HANN,S.R., ABRAMS,H.D., ROHRSCHNEIDER,L.R. and EISENMAN,R.N. (1983). Proteins encoded by <u>v-myc</u> and <u>c-myc</u> oncogenes : identification and localization in acute leukemia virus transformants and bursal lymphoma cell lines. Cell 34 : 789-798

09 - HAYASHI,K. (1980). A cloning vehicle suitable for strand separation. Gene 11 : 109-115

10 - HERISSE, J., COURTOIS, G. and GALIBERT, F. (1980). Nucleotide sequence of the EcoRI D fragment of adenovirus 2 genome. Nucleic Acids Research 8 : 2173-2191

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., LURZ, R., BISTER, K., BONNER, T.I., MARK, G.E. and RAPP, V.R. (1984). Homologous cell-derived oncogenes in avian carcinoma virus MH2 and murine sarcoma virus 3611. Nature 307 : 281–284

13 - 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. The EMBO J. 2 : 1969–1975

BU

14 - 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. 81 : 3000-3004 15 - MARTIN,P., HENRY,C., FERRE,F., BECHADE,C., BEGUE,A., CALOTHY,C.,

DEBUIRE, B., STEHELIN, D. and SAULE, S. (1986). Characterization of a <u>myc</u> containing retrovirus generated by propagation of the MH2 subgenomic RNA. J.Virol. (in press)

16 - MAXAM, A.M. and GILBERT, W. (1980). Sequencing end labeled DNA with base specific chemical cleavages. Methods Enzymol. 65 : 499-560

17 - MOELLING,K., HEIMANN,B., BERMLING,P., RAPP,V.R. and SANDER,T. (1984). Serine and threonine-specific protein kinase activities of purified <u>gag-mil</u> and gag-raf proteins. Nature 312 : 558-561

18 - 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

19 - SAULE,S., P.MARTIN, A.GEGONNE, A.BEGUE, C.LAGROU, and D.STEHELIN. (1984). Increased transcription of the <u>c-myc</u> oncogene in two methylcholanthrene-induced quail fibroblastic cell lines. Exp. Cell. Res. 155 : 496-506

20 - SCHWARTZ, D.E., TIZARD, R. and GILBERT, W. (1983). Nucleotide sequence of Rous sarcoma virus. Cell 32 : 853-869

21 - SOUTHERN, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J.Mol.Biol. 98 : 503-517

# ARTICLE Nº 4

Accepté à l'EMBO Journal

TRANSFORMATION OF QUAIL EMBRYO FIBROBLASTS BY A RETROVIRUS CARRYING A NORMAL HUMAN C-myc GENE

P.MARTIN, C.HENRY\*, F.FERRE, M.DUTERQUE-COQUILLAUD\*, C.LAGROU, J.GHYSDAEL, B.DEBUIRE\*, D.STEHELIN and S.SAULE

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

\* INSERM UNITE 124 - I.R.C.L. - Place de VERDUN - 59045 LILLE Cédex -FRANCE

and a manual solar

### ABSTRACT

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

Two types of mechanisms, not mutually exclusive, have been shown to The first one involved in activation of cellular oncogenes (c-onc). be refers to disorders inducing an overexpression of these genes by insertion of promotor/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 : 1) transcriptional activation of c-myc by viral promotors/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 (Rabbitts et al., 1983 a and b ; Westaway et al., 1984 ; Rabbitts et al., 1984 ; Showe et al., 1985 ; Battey et al., 1983) 2) 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 c-myc (Murray et al., 1983 ; Wiman et al., 1984) 3) the v-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). In order 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 promotors 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 comparatively 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

In order to express the normal human <u>c-myc</u> gene into avian cells we used two distinct strategies. First we introduced human <u>c-myc</u> into the genome of an avian retrovirus so that the expression of <u>c-myc</u> was under the control of, and initiated at, a viral promotor ; 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 promotors.

Using a pKH47 vector we constructed four recombinant plasmids containing human  $\underline{c-myc}$  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 promotor. 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 (Samarut J. and Xhio J.H., 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 promotors 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 promotors (PvuII site).

The transforming activity of these recombinant plasmids was assayed by transfection on quail embryo cells (QEC) using the Ca PO4 coprecipitation method (these cells are known to be efficiently transformed upon infection by  $\underline{v-myc}$  containing retroviruses or transfection with the corresponding proviral DNAs).

# Biological activity of the activated human c-myc gene

The four <u>c-myc</u> recombinants were found to induce transformation of QEC at levels (0.2 -0.5 transformants per ug 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 <u>c-myc</u> gene. When the pX-AHM, pSX-AHM or pSm-AHM <u>c-myc</u> inserts were purified after Bcl1 endonuclease digestion (in order to remove the two cellular polyadenylation sites of the c-myc gene

(Gazin et al., 1984) and allow the retroviral propagation of <u>c-myc</u> RNA) and transfected together with pRAV-1 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 <u>c-myc</u> 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 of 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 vX-AHM transformed cells synthesized a 3.4 kb genomic RNA recombinants. 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 occured 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 suggest 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 promotors located in exon 1 as deduced from S1 mapping experiments (data not shown).

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

We determined whether cells transformed by our <u>c-myc</u> recombinants synthesized the previously described  $p64/67^{c-myc}$  proteins (Hann and Eisenman, 1984) . Extracts of ( $^{35}$ S) methionine labelled cells were immunoprecipitated with a rabbit anti-<u>myc</u> serum. 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 kilodaltons (kd) protein was observed. This difference in size can be explained by the fact that these cells synthesize a <u>c-myc</u> containing mRNA which can promote translation of a p66 protein initiated at the <u>gag</u> AUG instead of the <u>c-myc</u> AUG (Figure 1). In addition, Figure 4 shows immunoprecipitation of the endogenous QEC <u>c-myc</u> protein in similar conditions. A single faint band of 58 kd molecular weight 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 <u>c-myc</u> 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 (RAV-1) 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 <u>c-myc</u> gene (Gazin et al., 1984) indicated that no mutation had occured within the <u>c-myc</u> coding sequence during the propagation of this virus.

### 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 Pvu1-Xho1 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 Pvu1 (plasmidial)-Xho1 (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 (when two enzymes are used, the first refers to the recombinant restriction site of the retroviral sequence, the second refers to the restriction site of the c-myc sequence) ; AHM refers to Activated Human The pSX-AHM DNA derived from the pX-AHM DNA by removing the Myc. Sst1-Xho1 gag-myc junction fragment. The following procedure was used : the pX-AHM DNA was digested with Sst1 endonuclease and treated with DNA polymerase I, large fragment (Klenow polymerase). The same amount of this plasmid was digested with Xho1 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 Smal-Smal 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 days-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 Eagle'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 ug of purified Bcl1 insert of <u>c-myc</u> recombinant and 5 ug of pRAV1 plasmid DNA (a gift of J.M.Bishop). In experiments without helper pRAV1 DNA, we used 30 ug 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 <sup>32</sup>p-labelled DNA, washed and subjected to autoradiography at - 70°C as previously described (Coll et al., 1983).

# Cloned DNA probes

DNA fragments for the preparation of  $^{32}P$  probes were obtained from suitable recombinant plasmids by endonuclease digestion and agarose gel purification. Human <u>c-myc</u> probes corresponding to exon 1 (Xho1-Sst1 fragment), exon 2 (Sst1-Sst1 fragment) and exon 3 (Cla1-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 <sup>35</sup>S Methionine for 45 minutes. These cells were lyzed in 3 ml of 0.1 % SDS, 1 % triton, 0.5 % deoxycholate and 1 % trasylol, Tris-HCl 10 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM buffer (RIPA) and clarified at 100.000 g for 1 hour. 0.25 ml of the supernatant was then incubated for 3 hours at 4°C with 5 ul 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 hours at 4°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 5 boiling in electrophoresis loading buffer (1 % SDS, 5 % minutes. 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).

> n inne heren. Nachtere State

- 109 -
### 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 <sup>32</sup>p ATP and polynucleotide kinase as described (Herisse et al., 1980). To separate the two labelled strands, fragments were denatured at 92°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.

and the second

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 (Papas and Lautenberger, 1985) or to the overexpression of this gene by retroviral promotors 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 (Mougneau 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 <u>c-myc</u> 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 <u>c-myc</u> gene was sufficient for cotransformation of rat embryo cells with an activated <u>ras</u> gene. Our results clearly support the idea that in appropriate biological systems an overexpression of the normal <u>c-myc</u> gene is sufficient to induce cellular transformation since we did not find any mutation in the <u>c-myc</u> 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 <u>myc</u> doublet p64-67 found in SX-AHM and pEP-AHM transformed cells probably initiates at the <u>c-myc</u> AUG because these recombinants do not contain any <u>gag</u> sequence. The second type of <u>myc</u> protein, the p66 protein found in vX-AHM and vSm-AHM transformed cells is probably translated from the <u>gag</u> AUG, first AUG codon in phase with the <u>myc</u> gene sequence in these viruses. As a result, the p66 protein probably has six <u>gag</u> 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 6 amino acids derived from the <u>gag</u> 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 <u>gag</u> sequences are not required for fibroblast transformation by v or c-myc.

Tumorigenesis <u>in vivo</u> is probably a more complex process than transformation of a cultured cell <u>in vitro</u> and it is likely that diverse alterations of <u>c-myc</u> can confer a growth advantage to cells <u>in vivo</u>. 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 <u>c-myc</u> gene product is sufficient to induce avian primary embryo cells transformation and tumor formation.

### ACKNOWLEDGMENTS

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). 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 : Construction of human c-myc recombinants

The restriction map of the human  $\underline{c-myc}$  genomic DNA used is depicted on top of the figure.

For each human <u>c-myc</u> recombinant we successively depicted the structure of the construction (retroviral LTR as an open box) and the structure of the ligated Bcl1 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 promotors present in the LTR sequences and correspond to spliced RNAs able to be virally propagated ; pEP-AHM mRNAs initiates at the <u>c-myc</u> promotors. Pr, promotor sequence ; L transcriptional direction ; SD, Splice donor site ; SA : splice acceptor site ; P.A.S, polyadenylation site ; exon ; — intron ; LTR, retroviral sequence ; w, pKH 47 ; ex1 delineates the extent of the probe corresponding to exon1 (Xho1-Sst1), ex2 (Sst1-Sst1) the probe corresponding to exon2, ex 3 (ClaI-EcoRI) the probe corresponding to the third exon ; <u>AUG</u>, AUG in phase with the <u>c-myc</u> sequence ; (brackets) in (Sst1-Xho1) and (EcoRI-PvuII), means that the restriction sites were filled-in with DNA polymerase I (Klenow fragment) prior to ligation.

### FIGURE 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 (<u>v-myc</u>) and pRAV-1, c,d,e,: QEC transformed upon cotransfection with pRAV1 and respectively X-AHM, SX-AHM and Sm-AHM Bcl1 inserts ; f : QEC transformed upon transfection with pEP-AHM DNA (magnification X200).

# FIGURE 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 32p 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.

## FIGURE 4 : Immunoprecipitation of human myc proteins in QEC transformed by c-myc recombinant

Labelling was performed on semi confluent cultures seeded in 100mm 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 ;  $\rightarrow$  standard molecular weight markers from BRL Inc. are listed on left of the figure.

### FIGURE 5 : Restriction map and strategy of sequencing of the c-myc insert of vX-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 labeled at their 5' termini using  $(^{32}P)$  & 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.



Figure 1



Figure 2







Figure 5

#### REFERENCES

ALITALO, K., BISHOP, J.M., SMITH, D.H., CHEN, E.Y., COLBY, W.W. and

LEVINSON, D. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. 80, 100-104

BATTEY, 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., Mc GROTH, 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 GWOL,D. (1983) Nature, 306, 797-799

COLL, J., RIGHI, M., de TAISNE, C., DISSOUS, C., GEGONNE, 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) The 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 HERISSE, J., COURTOIS, G. and GALIBERT, F. (1980) Nucleic Acid Research

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., WENSTAWAY, 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

MOUGNEAU, 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., LEBOWIT, Z, 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
PAYNE,G.S., BISHOP,J.M. and VARMUS,H.E., (1982) Nature 295,
209–213
RABBITTS,T.H., HAMLYN,P.H. and BAER,R. (1983) Nature 306, 22-29
RABBITTS,T.H., HAMLYN,P.H. and BAER,R. (1983) Nature 306, 760-765
RABBITTS, 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) The EMBO J. 3, 3223-3229
WATSON, D.K., PREMKUMAT-REDDY, E., DUESBERG, P.H. and PAPAS, T.S.
(1983) Proc. Natl. Acad. Sci. 80, 2146-2150
WESTAWAY, D., PAYNE, G. and VARMUS, H.E. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81,
843-847
WIMAN, G.K., CLARKSON, B., HAYDAY, A.C., SAITO, H., TONEGAWA, S.

and HAYWARD, W.S. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81, 6798-6802



036 121673

RESUME

Le rétrovirus oncogène MH2 (Mill Hill N°2) contient deux gènes, <u>v-mil</u> et <u>v-myc</u>, qu'il a transduit dans son génome à partir des séquences cellulaires distinctes c-mil et <u>c-myc</u> conservées phylogénétiquement.

Nous avons déterminé une propriété spécifique à chacun des gènes de ce virus et montré que ces gènes étaient capables de coopérer pour la transformation de cellules d'origine nerveuse.

Pour réaliser ce travail, des mutants du virus MH2 n'exprimant que le gène  $\underline{v-mil}$  ou que le gène  $\underline{v-myc}$  étaient nécessaires et ils ont été obtenus par deux voies différentes: nous avons fabriqué de tels mutants à partir du provirus cloné de MH2 et parallèlement, à partir du virus MH2 sauvage, ont été sélectionnés des mutants dont nous avons ensuite caractérisé le génome.

Enfin nous avons déterminé un type de modification capable de conférer au gène <u>myc</u> humain cloné un pouvoir transformant in vitro semblable à celui du gène v-myc du virus MH2.

Il est bien établi que l'apparition des cancers spontanés est un processus multi-étape. La mise en évidence de la coopération des gènes v-mil et v-myc dans la transformation pourrait suggérer que leurs homologues cellulaires humains, s'ils étaient activés ensembles dans une même cellule, seraient susceptibles de coopérer et participer de cette façon à l'apparition de cancers chez l'homme. La détermination de modes d'activation des gènes <u>c-mil</u> et <u>c-myc</u> clonés pourrait faciliter la mise en évidence de tumeurs où ces gènes cellulaires seraient activés ensembles.