50376
1987
47

50376
1987
47

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

N° D'ordre: 82

THESE

présentée pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

par

Anne GEGONNE

BIBLIOTHEQUE INTERUNIVERSITAIRE
SECTION DE SCIENCES
LILLE

CARACTERISATION DE LA SEQUENCE V-ETS SPECIFIQUE DU VIRUS DE L'ERYTHROBLASTOSE AVIAIRE E26. STRUCTURE ET PRODUIT DE SON HOMOLOGUE CELLULAIRE C-ETS CHEZ LE POULET

Exemplaire corrigé après avis du jury

soutenue le 22 janvier 1987 devant la commission d'examen

Président : J. MONTREUIL

Rapporteurs : J. KREMBEL
J. SAMARUT

Examinateur : D. STEHELIN

VERSITE DES SCIENCES
TECHNIQUES DE LILLE

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, CORDONNIER, 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

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

PROFESSEURS - 1ère CLASSE

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

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

PROFESSEURS - 2ème Classe

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

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

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

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé dans le laboratoire d'Oncologie Moléculaire dirigé par Dominique Stéhelin.

Il est en partie le résultat de l'effort de plusieurs collaborateurs avec lesquels j'ai eu un immense plaisir à travailler, les docteurs Roland Berger, Brigitte Debuire, Mark Israel, Charles de Taisne et Martine Dutherque Coquillaud.

Je suis très reconnaissante à Dominique Stéhelin de m'avoir accueillie dans son laboratoire et d'avoir toujours été présent dans les moments délicats de mon apprentissage scientifique.

Je suis également reconnaissante à Monsieur le Professeur Jean Montreuil d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse ainsi qu'à Messieurs Jean Krembel et Jacques Samarut qui ont bien voulu assumer le rôle de rapporteurs.

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

Je remercie Agnès Bègue qui m'a appris à brosser les bactéries dans le sens du pili et Christian Lagrou qui m'a transmis les quelques mots gentils auxquels une cellule ne résiste pas. Merci à tous les deux, je ne pouvais pas avoir de meilleurs maîtres.

Je remercie Simon Saule pour le temps précieux qu'il m'accorde si généreusement lorsque je lui pose une question et pour les conseils qu'il m'a apportés tout au long de cette thèse.

Je remerice Dominique Leprince "Mon Bichounet" pour nos cinq ans de vie commune, pour ses sautes d'humeur et pour m'avoir appris tout ce que je voulais savoir sur le virus E26 sans jamais oser le demander.

Je remercie infiniment Jacques Ghysdael pour la rigueur scientifique qu'il m'a inculquée.

Je remercie Anne Flourens, Marie Berthe Raes, Patrick Cogez et Dominique Dernis pour leur enthousiasme et leur collaboration aussi efficace que sympathique sur le projet E26.

Je remercie Claude Dissous pour ses précieux conseils et Bernard Vandenbunder pour son constant désir d'améliorer notre "mieux vivre" dans la chambre radioactive et pour sa philosophie de la recherche.

Je remercie tous les membres actifs ou honoraires de la S.A.R.L. "Crouillats" et tout particulièrement Patrick Martin pour sa présence constante à tous les créneaux et Fabienne Denhez qui tremble ou s'enthousiasme avec moi.

Je remercie Thierry Dupressoir pour ses utiles conseils lors de la rédaction de ce mémoire.

Je remercie Nicole Devassine qui, de ses doigts de fée, aligne des kilomètres de mots et qui s'est toujours montrée disponible même lorsque son chef l'accapare.

Je remercie Malika Ait-Bouaoune qui pour ses débuts au secrétariat s'est vu attribuer la meilleure part du gâteau : la bibliographie.

Enfin, je remercie tous les membres de l'U186 que je n'ai pas encore nommés pour leur aide constante et leur sympathie.

PRINCIPALES PUBLICATIONS

1987 : GEGONNE,A., LEPRINCE,D., COQUILLAUD,M., VANDENBUNDER,B., FLOURENS,A., GHYSDAEL,J., DEBUIRE,B. and STEHELIN,D.
Multiple domains for the chicken cellular sequences homologous to the v-ets oncogene of E26 retrovirus
Molecular and Cellular Biology (1987) 7 : 806-812

GEGONNE,A., LEPRINCE,D., POGNONEC,P., DERNIS,D., RAES, M.B., STEHELIN,D. and GHYSDAEL,J.
The 5' and 3' extremities of the v-ets oncogene of avian leukemia virus E26 encode amino-acid sequences not derived from the c-ets-encoded cellular proteins
Virology (1987) 156 : 177-180

1986 : GEGONNE,A., POGNONEC,P., LEPRINCE,D., DERNIS,D., REMAUT, E., STEHELIN,D. and GHYSDAEL,J.
Preparation and characterization of specific antisera directed against different polypeptidic domains encoded by the v-ets oncogene of the avian acute leukemia virus E26
C.R. Acad. Sc. Paris (1986) t. 303, Série III, n°7, 1986

GHYSDAEL,J., GEGONNE,A., POGNONEC,P., DERNIS,D., LEPRINCE,D. and STEHELIN, D.
Identification and preferential expression in thymic and bursal lymphocytes of a c-ets oncogene encoded 54000 Mr cytoplasmic protein
Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. (1986) 83 : 1714-1718

GHYSDAEL,J.,GEGONNE,A.,POGNONEC,P.,BOULUKOS,K.E., LEPRINCE,D., DERNIS,D.,LAGROU, C. and STEHELIN,D.
Identification in chicken macrophages of a set of proteins related to, but distinct from, the chicken cellular c-ets-encoded protein $p54^{c\text{-}ets}$
The EMBO Journal (1986) 5 : 2251-2256

CAUBET, J.F., GEGONNE,A., STEHELIN, D. et BERGER, R.
Abnormal localization of proto-oncogene c-ets 1 in an acute leukemia with t (1;11) translocation
C.R. Acad. Sc. Paris (1986) t. 302, Série III, N°16

GRIFFIN, C.A., McKEON, C., ISRAEL, M.A., GEGONNE,A., GHYSDAEL,J., STEHELIN, D., DOUGLASS, E.C., GREEN, A.A. and EMANUEL, B.S.
Comparison of constitutional and tumor-associated 11;22 translocations : Nonidentical breakpoints on chromosomes 11 and 22
Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. (1986) 83 : 6122-6126

1984 : de TAISNE,C., GEGONNE,A., STEHELIN,D., BERHEIM,A. and BERGER,R.
Chromosomal localization of the human proto-oncogene c-ets
Nature (1984) 310 : 581-583

SAULE,S., MARTIN,P., GEGONNE,A., BEGUE,A., LAGROU,C. and STEHELIN,D.
Elevated transcription of the c-myc oncogene in two methyl cholanthrene-induced quail fibroblastic cell lines
Exp. Cell. Res. (1984) 155 : 496-506

1983 : LEPRINCE,D., GEGONNE,A., COLL,J., de TAISNE,C., SCHNEEBERGER,A., LAGROU,C. and STEHELIN,D.
A putative second cell-derived oncogene of the avian leukaemia retrovirus E26.
Nature (1983) 306 : 395-397

LEPRINCE,D., SAULE,S., de TAISNE,C., GEGONNE,A., BEGUE,A., RIGHI,M. and STEHELIN,D.
The human DNA locus related to the oncogene myb and avian myeloblastosis virus (AMV) : molecular cloning and structural characterization
The EMBO Journal (1983) 2 (7) : 1073-1078

COLL,J., RIGHI,M., de TAISNE,C., DISSOUS,C., GEGONNE,A., and STEHELIN,D.
Molecular cloning of the avian acute transforming retrovirus MH2 reveals a novel cell-derived sequence (v-mil) in addition to the myc oncogene
The EMBO Journal (1983) 2 (12) : 2189-2194

TABLE DES MATIERES.

PRESENTATION DU MEMOIRE..... p12

INTRODUCTION..... p14

I-LES RETROVIRUS **p17**

A) Les rétrovirus peu ou non transformants

1) Biologie

2) Structure du génome

3) Réplication des rétrovirus non défectifs

B) Les rétrovirus transformants

1) Présentation

2) Expression des oncogènes viraux

3) origine des oncogènes viraux

4) Différences entre oncogènes viraux et cellulaires

II - ACTION DES ONCOGENES VIRAUX..... **p31**

A) Les oncogènes viraux codant pour un facteur de croissance

B) Les oncogènes viraux codant pour des protéines kinases

1) Les oncogènes viraux codant pour des récepteurs membranaires

2) Les oncogènes viraux codant pour des protéines kinases associées à la surface interne de la membrane plasmique

C) Les oncogènes viraux régulateurs de l'adényl cyclase ou les oncogènes ras

D) Les oncogènes viraux codant pour des protéines sérine/thréonine kinases

E) Les oncogènes viraux codant pour des produits nucléaires

III - ONCOGENES CELLULAIRES ET CANCERS..... **p43**

A) Transfection sur NIH3T3 et essai de tumorigénicité

B) Points de mutations dans les proto-oncogènes

C) Attachement de promoteurs/activateurs forts aux proto-oncogènes

D) Insertion d'un promoteur et/ou d'un activateur à proximité des proto-oncogènes.

E) Amplification des oncogènes cellulaires

IV - COOPERATION D'ONCOGENES p50

A) Le virus AEV ES4

B) v-erb A et les oncogènes sarcomatogènes leucémogénes

C) Le virus MH2

V - SYSTEME EXPERIMENTAL p54

A) Biologie des virus AMV et E26

1) Biologie du virus AMV

2) Biologie du virus E26

B) Le virus AMV : caractérisation de son génome et de la séquence v-myb qu'il contient..

1) Structure du génome du virus AMV

2) L'oncogène v-myb

3) Structure des homologues c-myb chez le poulet, la souris, l'homme et la drosophile

4) Expression du gène c-myb

5) Les produits myb

C) L'oncogène c-myb et les cancers

1) LTR activation du gène c-myb

2) Amplification du gène c-myb

3) Expression accrue du gène c-myb dans certains cancers

4) Altération du gène c-myb par délétion

D) le virus E26

1) La protéine virale

2) Présentation du travail

RESULTATS, DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS..... p68

I - CARACTERISATION D'UN NOUVEL ONCOGENE V-ETS AU SEIN DU VIRUS E26. **p70**

Résumé de l'article 1

Discussions et conclusions

II - LOCALISATION CHROMOSOMIQUE DE C-ETS CHEZ L'HOMME ET APPLICATIONS EN CANCEROLOGIE..... **p74**

Résumé de l'article 2

Discussions et conclusions

III - CARACTERISATION DE L'HOMOLOGUE CELLULAIRE POULET DE V-ETS..... **p77**

Résumé de l'article 3

Discussions et conclusions

IV - LES PRODUITS C-ETS CHEZ LE POULET..... **p83**

Résumé des articles 4 et 5

Discussions et conclusions

Résumé de l'article 6

Discussions et conclusions

DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION..... p87

BIBLIOGRAPHIE..... p91

ANNEXE : Articles 1 à 6..... p114

PRESENTATION DU MEMOIRE.

Il y a dix ans, le premier oncogène rétroviral était découvert et montré dériver d'un gène cellulaire normal. Aujourd'hui, plus d'une vingtaine d'oncogènes rétroviraux ont été mis en évidence, tous dérivés d'homologues cellulaires retrouvés chez les vertébrés supérieurs. Ces oncogènes peuvent induire à eux seuls un cancer, alors que tout indique que les cancers naturels impliquent des processus multi-étapes.

Pour passer d'un gène cellulaire à un oncogène rétroviral actif, il est possible que dans certains cas il suffise d'une surexpression du gène transduit, liée à la présence du promoteur viral. Il est cependant probable que dans la plupart des cas, plusieurs modifications soient requises (transcription accrue, gène tronqué, mutations spécifiques, délétions, insertions, modes de transmission virale). On peut alors considérer l'oncogène viral comme un seul gène ayant accumulé successivement plusieurs modifications au cours de nombreux cycles de réplication. Ce processus a peu de chance de se produire pour un gène cellulaire donné. Pourtant, des oncogènes cellulaires ont été impliqués dans des cancers humains ; ils ont alors subi une mutation spécifique ou une rupture chromosomique ou encore d'autres types d'activations. Ces oncogènes activés ne peuvent généralement pas à eux seuls transformer des cellules primaires normales. Ainsi, les cancers naturels impliquent probablement la coopération de plusieurs oncogènes distincts. Diverses observations vont dans ce sens : d'une part, les oncogènes activés ras et myc sont, ensemble, capables de transformer des fibroblastes embryonnaires de rat ce que ne peut faire l'un ou l'autre oncogène utilisé seul, d'autre part, deux oncogènes cellulaires peuvent être activés ensemble dans certaines lignées dérivées de tumeurs humaines.

Les rétrovirus s'avèrent être encore de précieux outils pour découvrir de nouveaux oncogènes coopératifs. En 1979, des expériences faites au laboratoire proposaient que certains rétrovirus pouvaient avoir transduit deux oncogènes cellulaires susceptibles de coopérer dans le mécanisme de transformation virale. Nous nous sommes intéressés à l'un d'entre eux, le virus E26, induisant des leucémies érythroïdes chez le poulet. Dans la première partie des résultats, nous montrerons que le génome de ce rétrovirus contient deux oncogènes myb et ets exprimés dans les cellules infectées sous forme d'une protéine de fusion $P135^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$. En espérant que l'homologue c-ets humain puisse être impliqué dans certains cancers naturels comme le sont déjà certains oncogènes cellulaires, nous localiserons, dans la seconde partie, une portion de l'homologue c-ets humain sur le chromosome 11. Dans la troisième partie des résultats, nous décrirons la structure du locus c-ets chez le poulet et les modifications subies par le gène c-ets transduit. Enfin, dans la dernière partie, nous préparerons des séra dirigés contre différentes portions du produit du gène v-ets et nous identifierons deux familles de protéines cellulaires immunoprécipitées spécifiquement par ces séra.

INTRODUCTION.

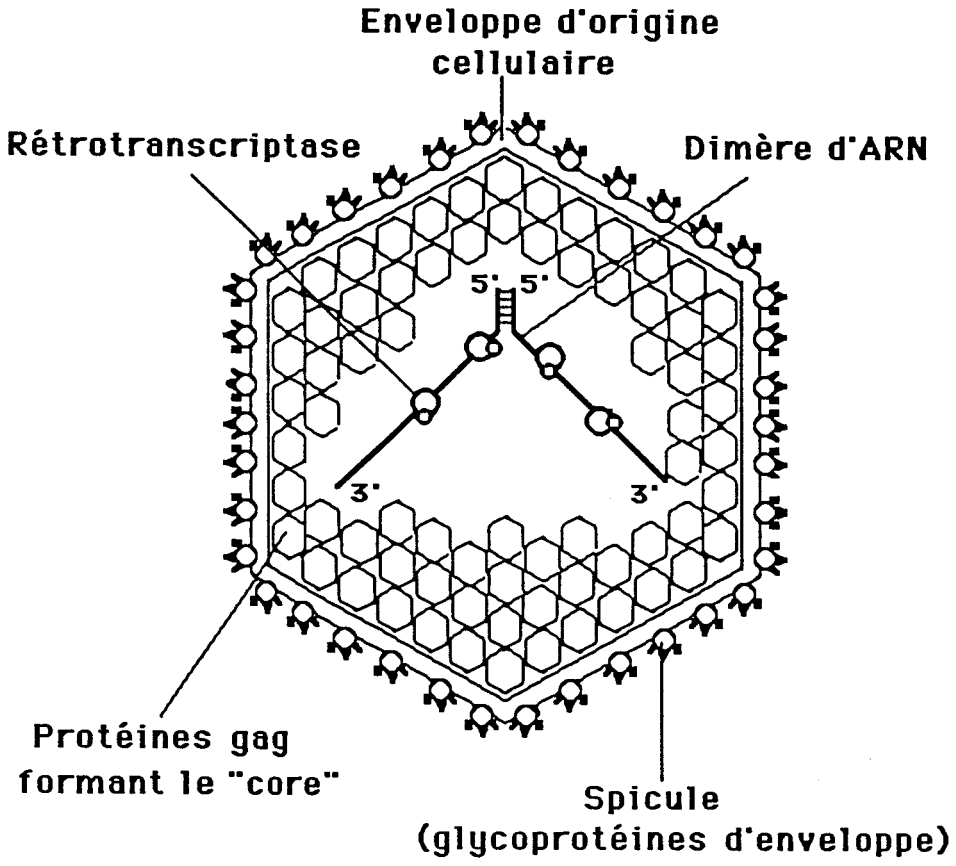


Schéma 1 : Morphologie d'une particule virale

BU LILLE

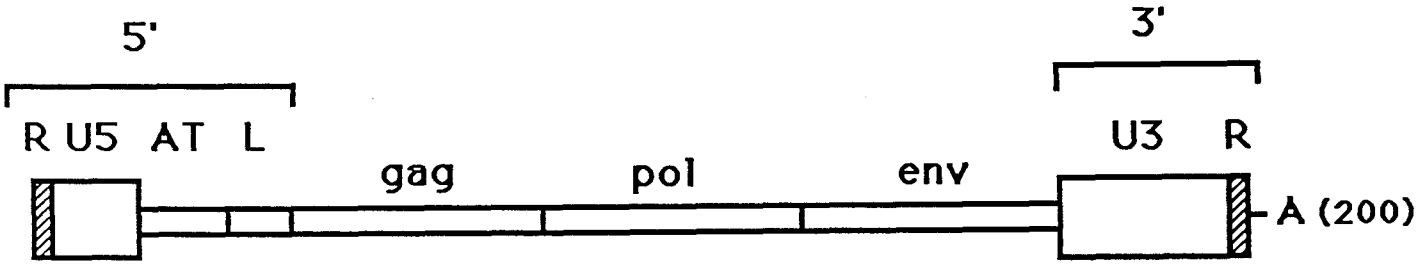


Schéma 2 : Structure du génome viral

R - séquence répétitive
U5 - séquence unique 5'
AT - site d'attachement du tARN amorce
L - séquence "leader"
U3 - séquence unique 3'
A200 - 200 résidus adénosine

BU LILLE

I - LES RETROVIRUS

Les rétrovirus appartiennent à une famille de virus dont le génome diploïde est constitué d'ARN. Ils utilisent tous le même mode de propagation. La particule virale (schéma 1) s'adsorbe sur les récepteurs de la cellule hôte et pénètre dans le cytoplasme. Son ARN, associé à la rétrotranscriptase (Baltimore, 1970 ; Temin et Mizutani, 1970), est aussitôt transcrit en ADN double brin. Cet ADN s'intègre dans le génome de la cellule et passe sous le contrôle de l'appareil cellulaire. Les gènes viraux sont alors répliqués, transcrits et traduits comme des gènes cellulaires. Les rétrovirus, possèdant tous les gènes nécessaires à leur réplication sont reconstitués dans la cellule (maturation des protéines, assemblage de la capside virale, encapsidation de l'ARN viral) et la quittent par bourgeonnement.

Les rétrovirus sont divisés en deux groupes : les rétrovirus peu ou non transformants et les rétrovirus transformants.

A - les rétrovirus peu ou non transformants

1) Biologie

Ces rétrovirus ne modifient pas ou peu les propriétés des cellules infectées *in vitro*. En revanche, ils peuvent induire chez l'animal, des lymphomes dont le temps d'apparition est généralement de plusieurs mois. Comme exemple de tels virus, on peut citer le virus de la lymphomatose aviaire (ALV) ou les virus de lymphomes murins (MuLV).

2) Structure du génome

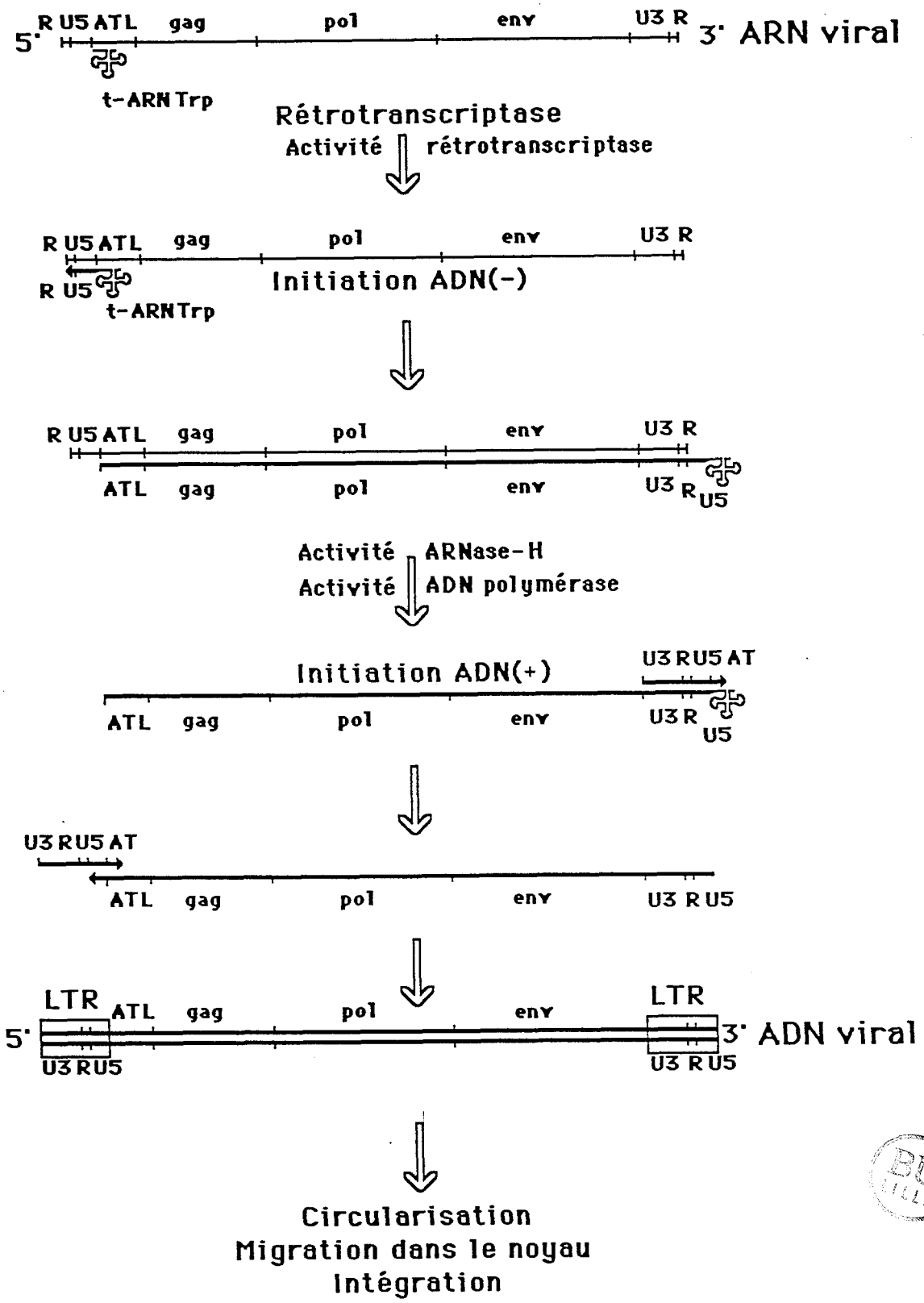
Le génome de ces rétrovirus compétents pour la réplication est constitué de trois gènes de structure, le gène gag codant pour les protéines de la nucléocapside virale, le gène pol codant pour la rétrotranscriptase, le gène env codant pour les protéines d'enveloppe. L'ordre de lecture de ces trois gènes est de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3' : 5' gag - pol - env 3' (schéma 2). Le génome viral possède, en plus de ces gènes structuraux, différentes séquences de régulation localisées à ses extrémités 5' et 3' (pour revues, Coffin, 1979 ; RNA Tumor Viruses, 1982).

L'extrémité 5' du génome viral peut être divisée en quatre régions fonctionnelles (schéma 2) qui précédent le gène gag et qui sont, de 5' vers 3' : R - U5 - AT - L.

i) La séquence R (60 et 80 nucléotides (nt) selon les virus) possède comme la plupart des ARN messagers eucaryotes un groupe méthylé ou cap (capuchon) de structure m^7 5' Gppp 5' Gm (Furuichi et al., 1975) et a un rôle clé lors de la rétropolymérisation de l'ARN en ADN.

ii) La séquence U5 (60 à 120 nt) est très conservée au sein des virus d'une même espèce et a permis une classification des virus en fonction de leur homologie au sein de cette séquence. Son rôle est cependant inconnu.

iii) La séquence AT représente le site d'attachement du tARNTrp sur la molécule génomique. L'extrémité de ce tARN sert d'initiateur pour la rétrotranscriptase.



BU LILLE

Schéma 3 : Rétrotranscription de l'ARN viral
(d'après Gilboa et al., 1979)

iv) La séquence L (250 à 300 nt) représente une séquence non traduite de l'ARN viral et serait impliquée dans l'encapsidation des ARN viraux (Shank et Linial, 1980 ; Nishizawa, 1985 ; Darlix, 1986). Elle participe à la formation de dimères d'ARN par l'intermédiaire de ponts hydrogènes (Haseltine et al., 1977 ; Dhar et al., 1980). Enfin, elle contient les signaux permettant aux ribosomes de se fixer sur la molécule d'ARN (Peterson et Hackett, 1985).

L'extrémité 3' commence à la fin du gène env. Elle inclut une séquence U3 et une séquence poly A de 200 à 500 résidus (schéma 2). La séquence U3 (250 à 1200 nt) contient deux types de signaux essentiels : le signal de polyadénylation de l'ARN viral AAUAAA (Chen et Barker, 1984 ; Montell et al, 1983) et des signaux impliqués dans la promotion de la transcription de l'ARN viral à partir de l'ADN proviral.

Schématiquement, le génome viral peut donc être représenté de la manière suivante :

5' - pm7 G - R - U5 - AT - L - gag - pol - env - U3 - poly A - 3'

3) Réplication des rétrovirus non défectifs

Le cycle réplicatif de ces virus peut être divisé en deux phases principales (pour revue, Coffin, 1979) :

- adsorption du virus, pénétration du génome viral dans la cellule hôte, synthèse d'une copie double brin d'ADN viral à partir de ce génome viral, enfin intégration du provirus.
- transcription de l'information génétique virale, synthèse des protéines virales et formation des particules infectieuses.

a) synthèse d'ADN viral

Immédiatement après sa pénétration dans la cellule, l'ARN viral sert de matrice à la synthèse d'un ADN viral par la rétrotranscriptase (Taylor et al., 1976). Les étapes de la rétrotranscription peuvent être décrites de la manière suivante (schéma 3) :

- Une amorce tARN Trp fixée de façon non covalente au site AT du génome viral sert d'initiateur à la synthèse d'un fragment d'ADN de polarité négative (-) qui contient l'information 5': R-U5 (Dahlberg et al., 1974 ; Haseltine et al., 1976).
- L'ADN R-U5 (-) saute de sa position d'origine de l'extrémité 5' du génome à l'extrémité 3' de la même sous-unité ou d'une sous-unité différente grâce à la présence de la séquence R aux extrémités 5' et 3' du génome viral (Haseltine et al., 1977 ; Schwartz et al., 1977). Ni le capuchon ni les séquences poly A ne sont copiés par la rétrotranscriptase.
- Le fragment d'ADN (-) en position 3' sert d'initiateur à la synthèse d'une copie d'ADN simple brin (-) qui s'arrête après le site AT en 5' de la molécule.
- Après digestion de l'ARN viral, l'initiation de la synthèse du brin d'ADN de polarité positive (+), commence à la jonction entre le gène env et la région U3 et débouche sur la synthèse d'un fragment U3 - R - U5 - AT (+).
- Ce fragment qui contient la séquence AT peut à son tour effectuer un saut d'une extrémité à l'autre de la matrice et rejoint ainsi la région 5' de l'ADN (-).
- Le fragment U3 R U5 AT (+) sert alors d'amorce pour la complémentation du brin (-).
- L'ADN linéaire double brin synthétisé acquiert donc deux extrémités identiques (U3 -

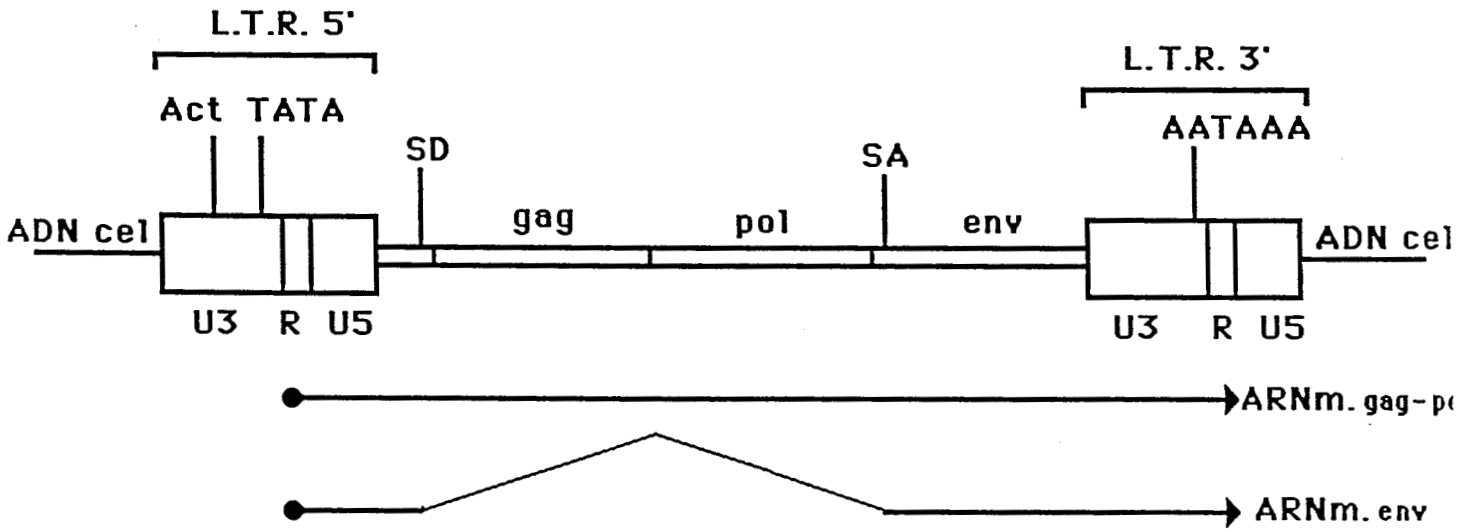


Schéma 4 : Transcription de l'ADN proviral

Act. - activateur
TATA - séquence promotrice
U3 - séquence unique 3'
R - séquence répétée
U5 - séquence unique 5'
SD - site donneur d'épissure
SA -site accepteur d'épissure
AATAAA - signal de polyadénylation

BU LILLE

R - U5) appelées LTR (pour Long Terminal Repeat). L'ordre des séquences dans l'ADN linéaire intermédiaire par rapport à l'ARN viral est donc :

U3 - R - U5 - AT - L - gag - pol - env - U3 - R - U5

Cet ADN linéaire passe ensuite sous une forme circulaire dans le noyau de la cellule infectée puis est intégré dans le génome cellulaire. Cette intégration est la conséquence d'une recombinaison entre l'ADN viral circulaire et l'ADN cellulaire aux extrémités des LTR (Shoemaker et al., 1980 ; Hishinuma et al., 1981).

b) transcription de l'ADN proviral

La transcription des ARN messagers viraux par l'ARN polymérase II cellulaire est initiée dans la région R de l'extrémité 5' et est terminée dans la région R de l'extrémité 3' (Yamamoto et al., 1980). Les séquences promotrices requises pour la transcription sont situées dans la région U3 (Blair et al., 1980 ; Dhar et al., 1980). Elles comprennent une séquence activatrice de la transcription (activatrice de transcription quelle que soit son orientation) et une séquence promotrice (TATA box) située 24 nucléotides en amont du point d'initiation de la synthèse d'ARN (Benoist et Chambon, 1981 ; Mathis et Chambon, 1981). La région U3 contrôle également la terminaison de la transcription puisqu'elle contient le signal de polyadénylation.

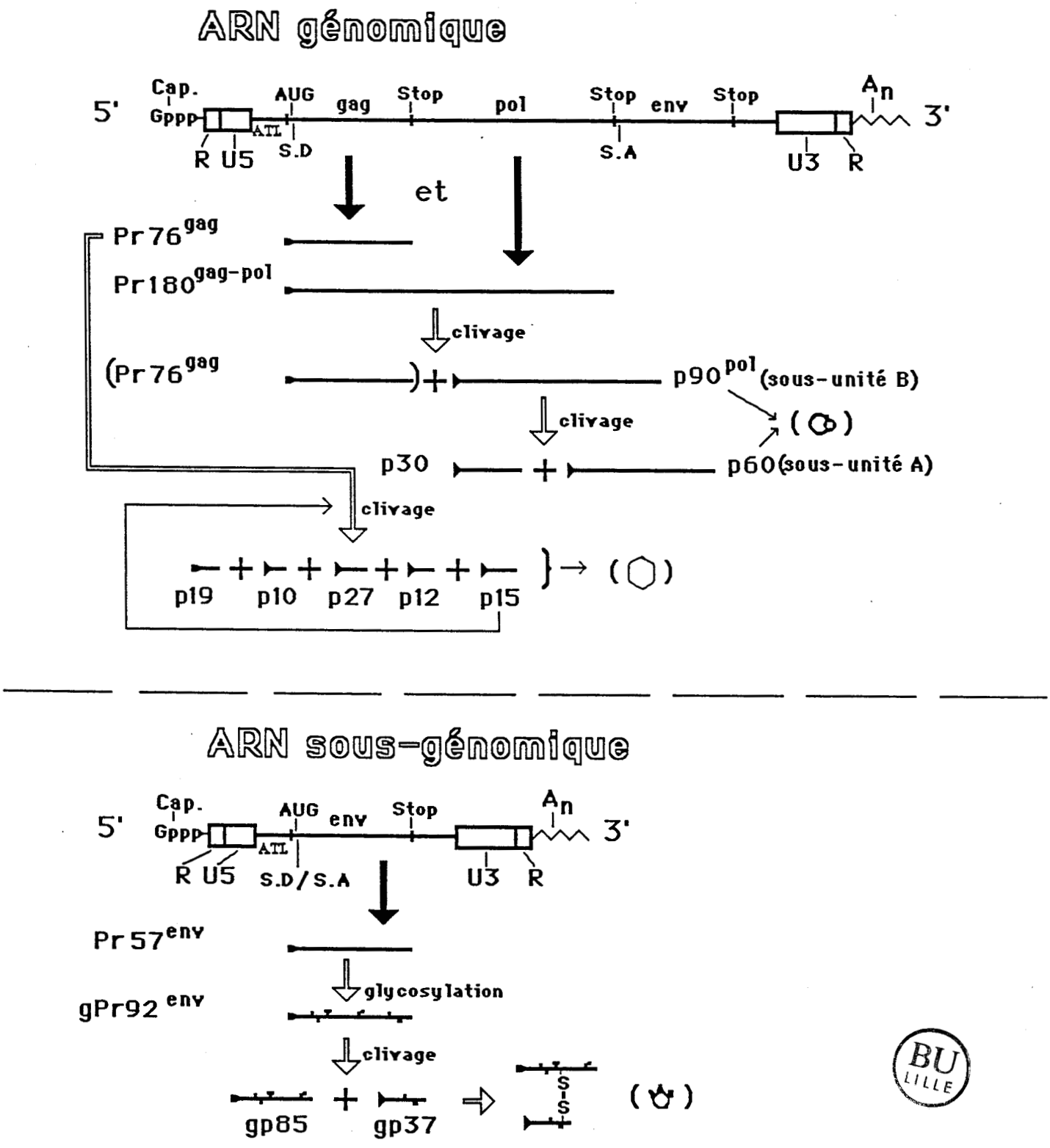
L'analyse des ARN viraux messagers dans les cellules de poulet infectées par un virus ALV révèle deux espèces d'ARN messagers de polarités identiques à celle du génome viral (Hayward, 1977 ; Weiss et al., 1977), l'une représentant la totalité du génome viral et l'autre le produit de transcription du gène env (schéma 4).

La séquence nucléotidique du génome d'un ALV a permis d'identifier un site donneur d'épissage approximativement 18 nucléotides après l'extrémité 5' du gène gag et un site accepteur d'épissage à 24 nucléotides de l'extrémité 5' du gène env. Ainsi, l'ARN messager env est constitué par épissage de six codons gag et de la séquence env privée de ses huit premiers codons.

c) traduction des ARN messagers

i) les produits du gène gag (schéma 5)

Le gène gag d'un virus ALV code pour une polyprotéine de 76 kilodaltons (kd) $Pr76^{gag}$, précurseur des protéines du nucléoïde viral (pour les autres rétrovirus, le poids moléculaire de cette protéine précurseur se situe toujours autour de 70 à 80 kd). Cette protéine est traduite à partir de l'ARN génomique et initiée à partir d'un codon AUG présent au début du gène gag. Après synthèse, la protéine précurseur gag est phosphorylée et généralement associée à la membrane cellulaire. Une protéase cellulaire interviendrait ensuite pour libérer de l'extrémité carboxyterminale de Pr76, une protéase virale P15 qui scinderait la molécule résiduelle en différentes protéines de la capside virale (P19, P10, P27, P12) (Von der Helm, 1977 ; Dittmar et Moelling, 1978 ; Vogt et al., 1979). Dans le virion, la protéine P19 (ou sa forme phosphorylée pP19) est associée à la fois à l'ARN viral et à l'enveloppe lipidique. Elle pourrait être associée physiquement avec une glycoprotéine d'enveloppe gP37 (Schlesinger, 1976 ; Montelaro et al., 1978). La protéine P12 est le constituant principal du complexe ARN-Protéine (RNP) (Bolognesi et al., 1973 ; Fleissner and Tress, 1973) . Sa fixation à l'ARN viral, contrairement à celle de P19 est apparemment non spécifique. La protéine P27 n'est pas trouvée dans le complexe RNP mais est un



BU LILLE

Schéma 5: -Structure des ARN génomique et sous-génomique d'un ALV
-Les protéines virales et leur maturation

des constituants majeurs de la capside (Bolognesi et al., 1973 ; Stromberg et al., 1974). La protéine P15 pourrait se situer entre la capside et l'intérieur de l'enveloppe (Bolognesi et al., 1973 ; Stromberg et al., 1974). Elle est capable de cliver la grande sous-unité de la rétrotranscriptase. P10 n'a jusqu'à maintenant pas de fonction définie.

ii) le produit du gène pol (schéma 5)

La rétrotranscriptase est synthétisée à partir d'une protéine précurseur de 180 kd (Pr $180^{gag-pol}$) qui est un produit de fusion des gènes gag et pol (ces deux gènes ne sont pourtant pas dans le même cadre de lecture). Certains auteurs proposent que cette protéine est synthétisée à partir d'un ARN dont la structure est proche de celle de l'ARN génomique : l'ARN en question serait synthétisé par épissure de 50 à 60 nucléotides situés à la jonction des gènes gag et pol et joindrait ainsi les deux gènes dans le même cadre de lecture. D'autres auteurs postulent que c'est le ribosome lui même qui change de cadre de lecture et synthétise alors la protéine correcte (RNA Tumor Viruses, 1982). Après, traduction $Pr180^{gag-pol}$ est clivée dans la région polypeptidique de gag entre P12 et P15. Cette coupure libère une P130 $^{p15-pol}$ (Eisenman et al., 1980) qui perd ensuite sa région P15 pour donner naissance à la sous-unité β de la rétrotranscriptase. Ces deux étapes de clivage ont lieu dans la cellule infectée. Par contre la sous unité β sera scindée en une sous-unité α et une endonucléase P32 dans le virion. Les polypeptides relatifs à la rétrotranscriptase (α, β, P32) sont présents dans la capside virale et sont copurifiés avec le complexe RNP (Stromberg et al., 1974). La rétrotranscriptase est associée à l'ARN viral et se fixe notamment au tARNTrp amorce (Panet et al., 1975).

iii) les produits du gène env (schéma 5)

L'ARN messager env permet d'obtenir par traduction *in vitro* un polypeptide de 63 kd ($P63^{env}$). Cette protéine semble être clivée immédiatement après insertion dans le réticulum endoplasmique car, dans les cellules infectées, traitées aux inhibiteurs de glycosylation, on ne détecte qu'une protéine de 57 kd ($P57^{env}$) (Diggelman, 1979). P57 est ensuite glycosylée pour donner une protéine gPr92. Le clivage, la formation de ponts di-sulfures et la glycosylation de gPr92 donnent naissance aux glycoprotéines virales (VGP) gP85 et gP37 (England et al., 1977 ; Moelling et Hayami, 1977).

B - Les rétrovirus transformants

1) Présentation

Ces rétrovirus sont capables de modifier plusieurs propriétés des cellules infectées : phénotype, propriétés de croissance, antigènes de surface et métabolisme . *In vivo*, les rétrovirus transformants induisent des leucémies aigües, des sarcomes, des carcinomes dont les temps d'apparition sont très courts (de l'ordre de quelques semaines). Le premier rétrovirus transformant mis en évidence fut le virus du sarcome de Rous (RSV) isolé à partir d'un sarcome spontané de poulet en 1911. Depuis, beaucoup d'autres rétrovirus ont été isolés à partir de tumeurs observées

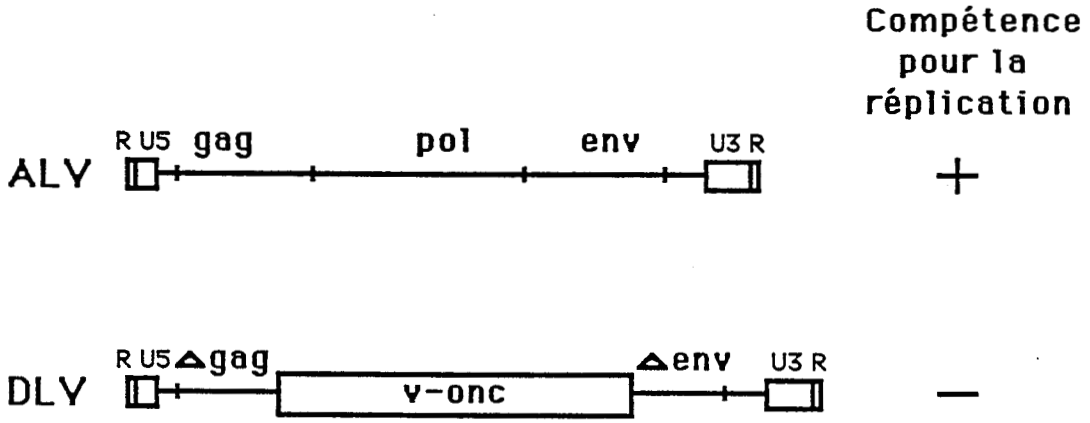
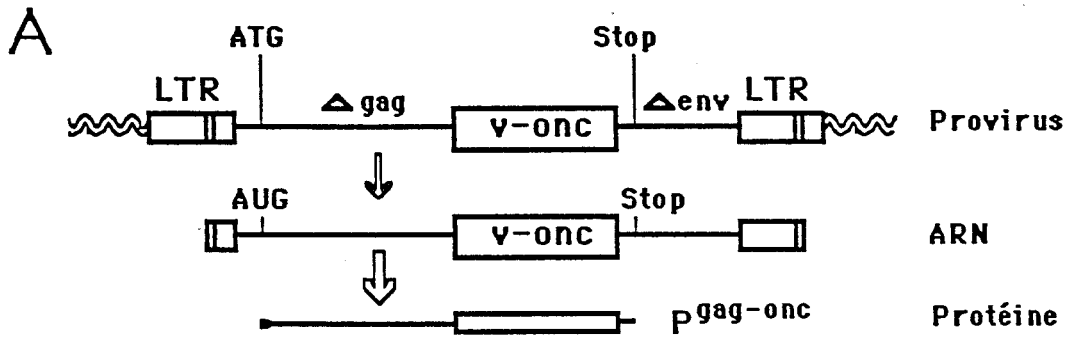
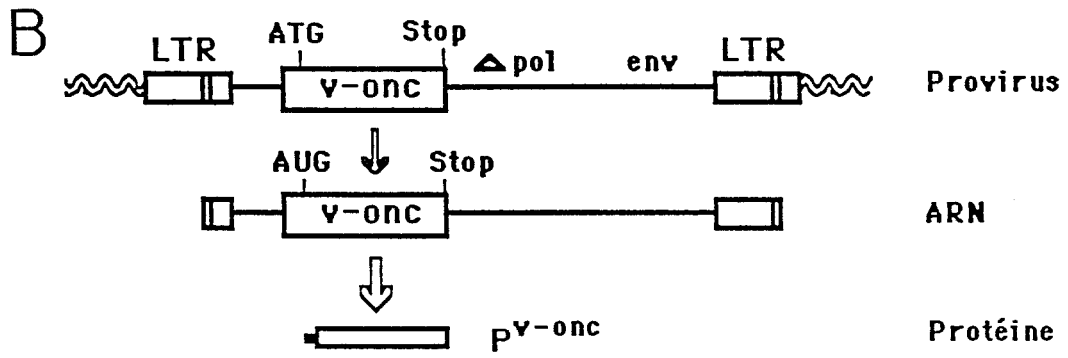
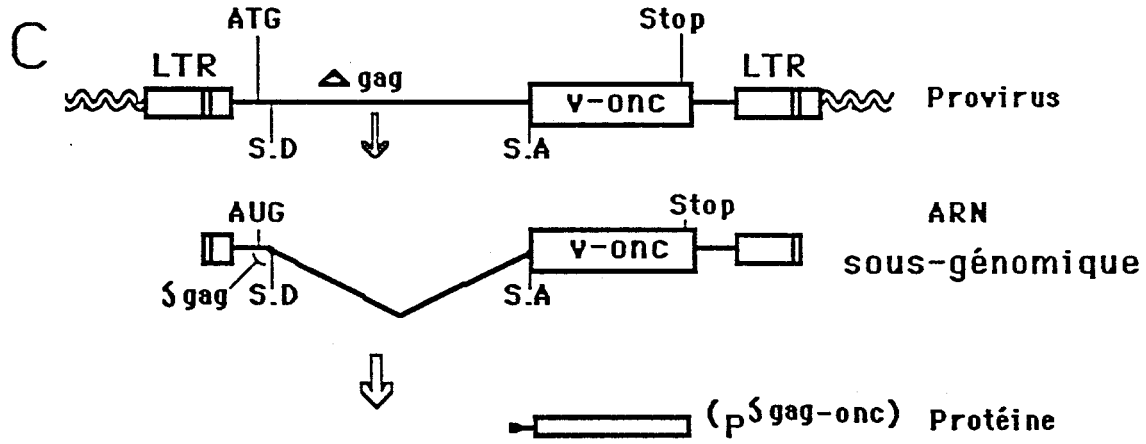


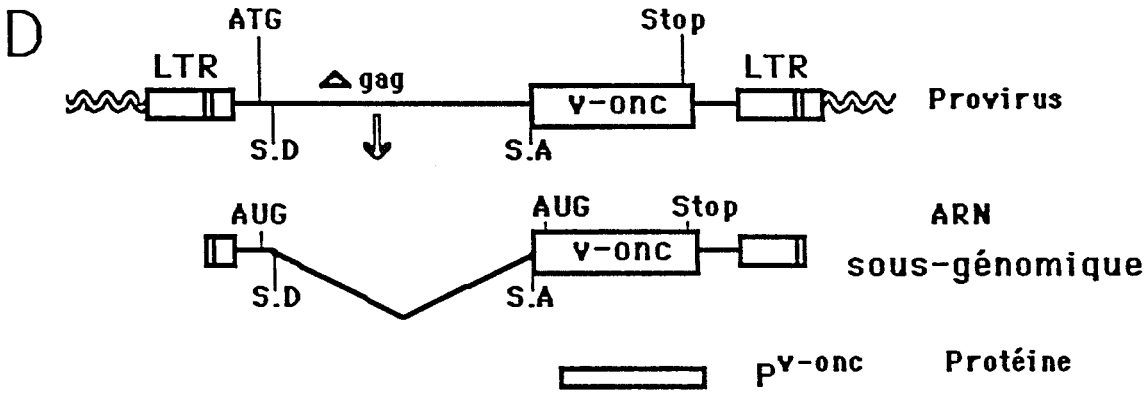
Schéma 6 : Structure du génome d'un virus leucémogène défectif pour sa réplication DLV

BU LILLE









BU LILLE

schéma 7 : Différents modes d'expression d'un v-onc

chez différents vertébrés (oiseau, souris, rat, chat, singe). Le génome de ces rétrovirus est le fruit d'une recombinaison entre le génome d'un rétrovirus non transformant et une portion du matériel génétique de la cellule hôte (schéma 6). L'acquisition de cette portion d'ADN cellulaire leur confère un pouvoir tumorigène *in vivo* et transformant *in vitro* d'où le nom d'oncogène viral (v-onc) donné à la séquence cellulaire transduite. Cette acquisition peut se faire par addition de cette séquence cellulaire aux gènes structuraux déjà présents (c'est le cas observé chez le virus RSV où la séquence v-src est intégrée derrière le gène env) ou par substitution d'une plus ou moins grande partie des gènes structuraux. L'amputation des gènes de structure rend ces virus défectifs pour leur réplication. Pour se propager, ceux-ci ont alors besoin d'un virus auxilliaire ou "helper". Le virus auxilliaire est le plus souvent un virus peu ou non transformant et apporte les constituants structuraux nécessaires pour la propagation du virus transformant.

2) Expression des oncogènes viraux (table 1, schéma 7)

Lors de la recombinaison, les séquences régulatrices ainsi que le début du gène gag sont toujours conservés. Le point d'insertion de l'oncogène viral a une influence sur sa transcription et sur la structure de son produit :

- l'oncogène viral peut être exprimé à partir de l'ARN génomique. Dans ce cas, l'insertion ou la substitution de l'oncogène viral conduit soit à la synthèse de protéines de fusion ($P^{gag\text{-}v\text{-}onc}$) qui sont composées d'une part de peptides codés par les séquences gag virales et d'autre part de peptides codés par le v-onc (schéma 7A), soit à la synthèse d'une protéine $P^{v\text{-}onc}$ (schéma 7B).

- l'oncogène viral peut également être exprimé à partir d'un ARN sous-génomique. Celui ci profite de la présence en début du gène gag d'un site donneur d'épissure et de la présence en début du gène env ou de l'oncogène viral d'un site accepteur d'épissure. L'ARN sous-génomique synthétisé joint alors les six premiers codons du gène gag aux séquences env et v-onc ou aux séquences oncogènes uniquement. L'oncogène viral peut apporter tout ou partie de ses propres signaux d'initiation et de terminaison de lecture .

3) Origine des oncogènes viraux

En 1976, Stéhelin et al. montrent l'existence de séquences homologues au gène v-src dans le génome de poulets non infectés. Aujourd'hui tous les oncogènes rétroviraux sont caractérisés par l'existence de séquences cellulaires homologues ou proto-oncogènes (c-onc).

Ces séquences sont conservées au cours de l'évolution du règne animal et se retrouvent dans l'ADN humain (Bishop, 1983).

- Leur conservation peut être très importante. Ainsi, 75 % des séquences en acides aminés des régions codantes des gènes c-mos chez la souris et chez l'homme sont communes (Watson et al., 1982). Les protéines c-fos humaines ou de souris ne diffèrent que par 24 acides aminés (Van Straaten et al., 1983). Les gènes c-myc, aviaires, murins et humains présentent de fortes similitudes (Battey et al., 1983 ; Colby et al., 1983 ; Stanton et al., 1983 ; Watson et al., 1983 ; Watt et al., 1983).

onc	virus	maladie	hôte	protéine v-onc	activité	localis.	prot. c-onc	activité	localis.	Références
sis	SSV	Sarcome	Singe	$P28^{env-sis}$	PDGF (chaine β)	Excrétée (1)	p30	PDGF (chaine β)	Excrétée	1) Huang et al., 1984
	Pi-FeSV	Sarcome	Chat	$P76^{gag-sis}$						
erbB	AEV-ES4	Sarcome Erythro.	Poulet	$gp74^{v-erbB}$	Tyr. Kin.	Membrane plasmique	gp170 (Homme)	Tyr. Kin. Réc. EGF	Tran. Mbr.	
fms	SM-FeSV	Sarcome	Chat	$gP180^{gag-fms}$	Tyr. Kin.	Membrane plasmique	(2) gp165	Tyr. Kin. Réc. CSF-1	Tran. Mbr.	2) Sherr et al., 1985
ros	UR2	Sarcome	Poulet	$P68^{gag-ros}$	Tyr. Kin.	Membranes				
src	RSV S1 S2	Sarcome	Poulet	$pp60^{v-src}$ (3) $pp62^{s-src}$	Tyr. Kin.	Face. int. du Plasmaleme	pp60	Tyr. Kin.	Mbr. et Cytosquel.	3) Ikawa et al., 1986
fps/fes	Fu-ASV	Sarcome	Poulet	$P130^{gag-fps}$	Tyr. Kin.	Membrane plasmique	p98	Tyr. Kin.		
	ST-FeSV	Sarcome	Chat	$P85^{gag-fes}$	Tyr. Kin.	Membrane plasmique	p92			
yes	Y73-ASV	Sarcome	Poulet	$P90^{gag-yes}$	Tyr. Kin.	Membrane plasmique	(4) p59-62	Tyr. Kin.		4) Sudol et Hanafusa 1986
fgr	GR-FeSV	Sarcome	Chat	$P70^{gag-actin-fgr}$	Tyr. Kin.					
abl	Ab-MLV	Leuc. pré B	Souris	$P160^{gag-abl}$	Tyr. Kin.	Membrane plasmique	p150		(5) Cytoplasme	5) Hunter et Cooper, 1985
	HZ2-FeSV	Sarcome	Chat	$P98^{gag-abl}$	Tyr. Kin.	Membrane plasmique				
kit	HZ4-FeSV	Sarcome	Chat	$P80^{gag-kit}$	(6) Tyr. Kin.					6) Besmer et al., 1986
sea	S13	Sarcome Erythro.	Poulet	$gP155^{env-sea}$ → gP85+gP70	Tyr. Kin. (gP70) (7)	(7) Cytoplasme				7) Hayman et al., 1985
——	TP_1-FeSV	Sarcome	Chat	$gP83^{gag-onc}$	Tyr. Kin.					

TABLE I: Oncogènes viraux et leurs homologues cellulaires
(RNA Tumor Viruses, 1985).

BU LILLE

onc	virus	maladie	hôte	protéine v-onc	activité	localis.	prot. c-onc	activité	localis.	Références
Ha-ras	Ha-MSV	Sarcome Erythro.	Rat	$p21^{v\text{-}Ha\text{-}ras}$	Thr. Kin. fixe GTP GTPase	Mbr. face int.	Ha-ras p21	Thr. Kin. fixe GTP GTPase	Mbr. face int.	
	BalB-MSV	Hémangio-sarcome	Souris							
Ki-ras	Ki-MSV	Sarcome Erythro.	Rat	$p21^{v\text{-}Ki\text{-}ras}$			Ki-ras p21			
mos	Mo-MSV	Sarcome	Souris	$P37^{env\text{-}mos}$	Thr/Ser. Kin.	Cytoplasme				
mil/raf	MH2	Carcinome	Poulet	$P100^{gag\text{-}mil}$	Thr/Ser. Kin.	Cytoplasme	p71 (8)			8)Patshinsky et al., 1986
	MSV-3611	Sarcome	Souris	$gP90^{gag\text{-}raf}$ $P75^{gag\text{-}raf}$	Thr/Ser. Kin.					
fos	FBj-MSV	Ostéo-sarcome	Souris	$p55^{v\text{-}fos}$		Noyau	p55 (9)		Noyau	9)Curran et al., 1984
myc	MC29	Myélocyto. Carcinome	Poulet	$P110^{gag\text{-}myc}$	Affinité pour l'ADN	Noyau	p58	Affinité pour l'ADN	Noyau	
	MH2	Carcinome	Poulet	$p61/63^{v\text{-}myc}$						
myb	AMV	Myélobl.	Poulet	$p45^{v\text{-}myb}$	Affinité pour l'ADN	Noyau	p75 (10)	Affinité pour l'ADN	Noyau	10)Klempnauer et al., 1984
	E26	Myélobl. Erythro.	Poulet	$P135^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$						
ski	SKV-ASV	Carcinome	Poulet	$P110^{gag\text{-}ski\text{-}pol}$		Noyau				
ets	E26	Erythro.	Poulet	$P135^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$		Noyau	p54 (11)		Cytoplasme	11) Ghysdael et al., 1986
erbA	AEV-ES4	Sarcome Erythro.	Poulet	$P75^{gag\text{-}erbA}$		Noyau	p40-46 (12)			12) Sap et al., 1986
rel	REV-T	Réticulo-endothél.	Dinde	$P59^{env\text{-}rel}$		Noyau (13) Cytoplasme				13)Gilmore et Temin, 1986

BU LILLE

TABLE I (suite)

- Certains de ces proto-oncogènes sont apparus très tôt dans l'évolution de la cellule eucaryote. Sept loci homologues respectivement aux gènes c-abl, c-erbB, c-raf, c-Ha-ras, c-src, c-myb,c-ets 2 ont été isolés de l'ADN de D. melanogaster (Hoffman et al., 1983 ; Hoffman-Falk et al., 1983 ; Simon et al., 1983 ; Neuman-Silberberg et al., 1984 ; Pribyl et al., 1986). Certains oncogènes cellulaires ont leur équivalent chez la levure S. cerevisiae. C'est le cas des gènes ras qui ont deux homologues (RAS1, RAS2) chez la levure (De Feo Jones et al., 1983 ; Gallwitz et al., 1983).

Les proto-oncogènes sont exprimés dans des cellules normales. Leur taux d'expression peut varier en fonction du type de cellule et du stade de différenciation (ainsi c-myc est exprimé dans une large variété de cellules mais de façon prédominante dans les tissus hématopoïétiques (Eva et al., 1982 ; Gonda et al., 1982 ; Westin et al., 1982 ; Coll et al., 1983a)). Il peut également varier en fonction du stade de prolifération où se trouve la cellule. Il a été montré que c-fos pouvait être exprimé quelques minutes après stimulation des fibroblastes de souris par un mitogène (Greenberg and Ziff, 1984) et c-myc exprimé quelques heures après stimulation des fibroblastes de souris ou des lymphocytes B (Kelly et al., 1983).

Leur stabilité phylogénétique, leur expression dans les cellules normales et le fait que les rétrovirus qui les ont transduits acquièrent un potentiel transformant suggèrent que ces oncogènes cellulaires ont un rôle important à jouer dans la vie de la cellule. Cette hypothèse est confirmée pour certains d'entre eux à qui l'on a déjà attribué une activité enzymatique -les oncogènes c-src, c-erb B, c-fps et c-fms ont une activité tyrosine kinase (Collet et al., 1979 ; Opperman et al., 1979 ; Rohrschneider et al., 1979 ; Hunter et Sefton, 1980 ; Levinson et al., 1981 ; Carpenter, 1984 ; Mathey Prévost et al., 1982 ; Sherr et al., 1985) - ou qui présentent de fortes homologies de structure avec des produits cellulaires connus - l'oncogène c-sis code pour la chaîne β du facteur de croissance PDGF (Platelet-Derived Growth Factor)(Johnsson et al., 1984), l'oncogène c-fms code pour le récepteur du facteur de croissance CSF 1 ou M-CSF spécifique des macrophages (Sherr et al., 1985), l'oncogène c-erb B est une version tronquée du récepteur du facteur EGF (Epidermal Growth Factor) (Downward et al., 1984) et l'oncogène c-erb A code pour un récepteur d'hormone thyroïdienne (Sap et al., 1986 ; Weinberger et al., 1986) -.

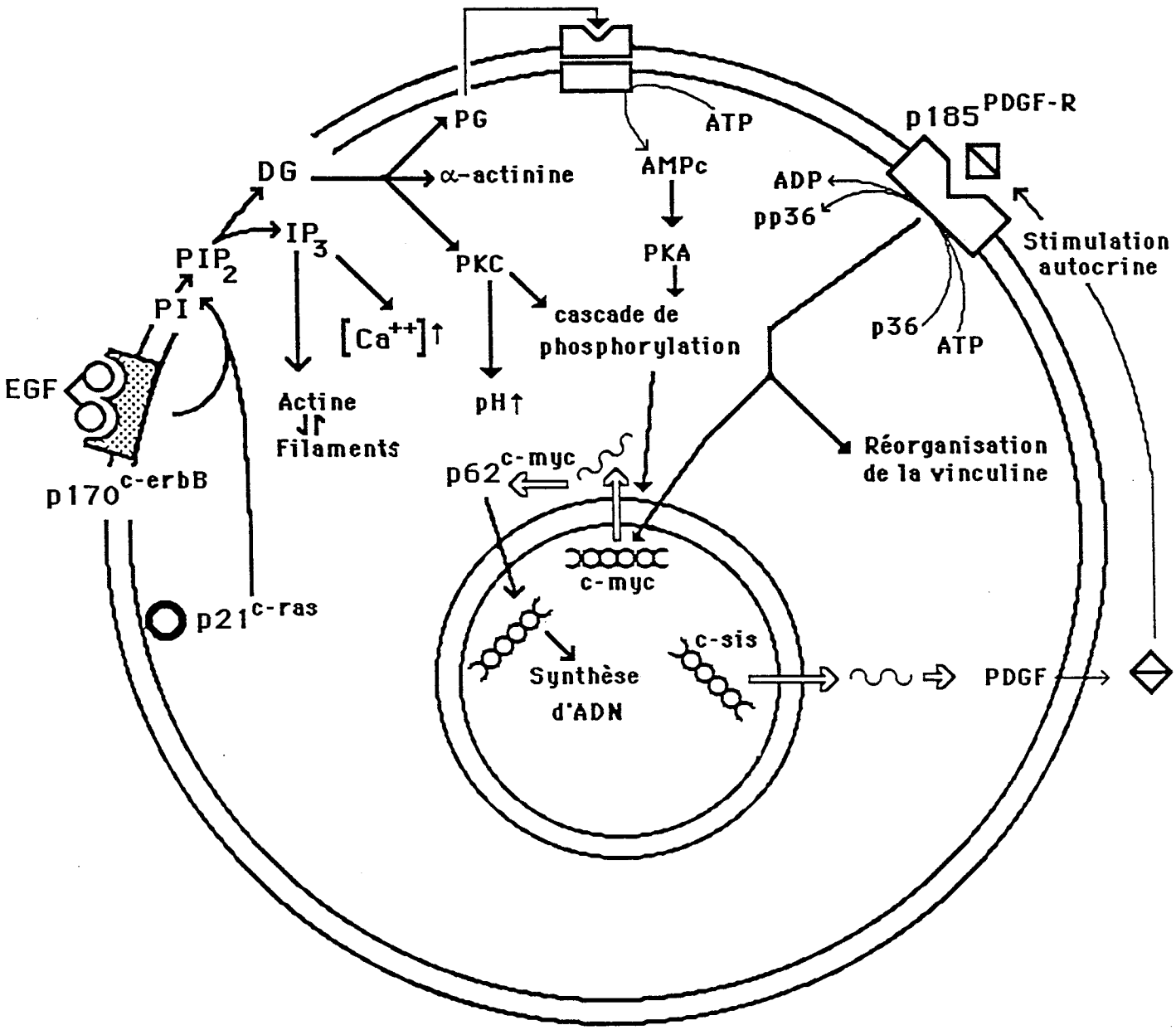
4) Différences entre oncogènes viraux et cellulaires

a)d'un point du vue structural

Les oncogènes cellulaires présentent généralement une structure mosaïque (exon-intron) qui caractérise les gènes eucaryotes. Les oncogènes viraux ont par contre une structure compacte (exons seuls).

L'unité codante du gène viral est généralement une version tronquée du gène cellulaire. Ainsi, il a été démontré que le gène c-myb de poulet contient au moins deux exons supplémentaires par rapport à ceux transduits dans le virus AMV sous forme du gène v-myb (Rosson et Reddy, 1986).

Les gènes transduits peuvent subir des mutations ponctuelles. L'exemple le plus connu est celui des gènes ras : les gènes v-Ha-ras et v-Ki-ras sont mutés en position 12, 59 et 61 par rapport à leurs homologues respectifs c-Ha-ras et c-Ki-ras (Yasuda et al., 1984). Ces mutations confèrent aux gènes viraux une capacité transformante accrue sur des cellules en culture.



BU LILLE

Schéma 8 : Hypothèses sur le mode d'action des oncogènes.

(Goustin et al., 1986 ; Rozengurt et al, 1986)

Le proto-oncogène peut avoir subi au cours de sa transduction des amputations, - c'est le cas du gène c-fos (Van Beveren et al., 1983) -, ou des substitutions - les dix-neuf acides aminés de l'extrêmité carboxyterminale du produit du gène c-src sont remplacés dans le produit du gène v-src par douze acides aminés provenant d'une autre séquence (Takeya et Hanafusa, 1983).

Il résulte de ces différences que le pouvoir transformant acquis par l'oncogène viral pourrait provenir des modifications intervenues dans la structure primaire de son produit par rapport à celle du produit du proto-oncogène cellulaire.

b) du point de vue de leur expression

Les oncogènes cellulaires sont généralement exprimés à des taux modérés et régulés par la cellule. Par contre, dans l'animal infecté, les rétrovirus sont capables d'exprimer, à haut taux et dans différents tissus, les oncogènes viraux qu'ils contiennent. La transformation cellulaire pourrait donc également dériver d'une surexpression de produits oncogènes, à une période du cycle cellulaire ou dans un type de cellule non adéquats.

II - ACTION DES ONCOGENES VIRAUX

Le cycle de croissance de la cellule débute par la phase G1 au cours de laquelle la cellule augmente de taille. En phase S, elle réplique ses chromosomes, se prépare à la division en phase G2 et se divise en phase M. Juste après la mitose, chaque cellule fille a la possibilité soit d'entamer un nouveau cycle cellulaire et de se diviser à son tour, soit d'entrer en phase Go au cours de laquelle elle peut se différencier. La cellule reprend un cycle cellulaire lorsqu'elle est stimulée par des facteurs de croissance.

L'action précise de ces facteurs est mal connue mais elle est à l'origine d'un signal qui , par l'intermédiaire d'une cascade d'événements, se transmet de la surface de la cellule au noyau . Une des possibilités de cascade peut être schématisée comme suit (pour revues : Goustin et al., 1986 ; Rozengurt, 1986) (schéma 8).

1. Le facteur de croissance se fixe sur son récepteur disposé à la surface de la cellule cible. Le récepteur une fois occupé, s'internalise et active son propre domaine tyrosine kinase.
2. Le récepteur activé peut phosphoryler différentes protéines cellulaires.
3. Il peut également stimuler la phospholipase C (phosphodiestérase PDE) qui permet l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4, 5 diphosphate (PIP2) en inositol triphosphate (IP3) et en diacylglycérol (DG). L'augmentation des taux d'inositol triphosphate et de diacylglycérol est suivie d'une augmentation transitoire du taux de calcium intra-cellulaire, d'une activation de la protéine kinase C (PKC) et de l'adényl cyclase (AC), enfin d'une réorganisation du cytosquelette.
4. Par différents effecteurs cytosoliques (non encore identifiés), le signal mitotique est acheminé jusqu'au noyau. Certains gènes sont alors transcrits abondamment. Ainsi, après traitement au PDGF, les fibroblastes expriment successivement de très hauts taux d'ARN messagers du gène c-fos et du gène c-myc.
5. Enfin, plusieurs protéines dont la synthèse est stimulée par l'exposition des cellules au facteur de croissance, sont localisées dans le noyau et pourraient être impliquées dans l'activation des gènes de croissance.

Il a été récemment démontré que les produits des oncogènes viraux pouvaient intervenir à tous les niveaux de cette cascade d'événements : ils peuvent mimer le facteur de croissance (v-sis), ou présenter de fortes homologies structurales avec des récepteurs membranaires (v-erb B, v-fms, v-kit), ou encore être des transducteurs membranaires (v-src, v-ras), des effecteurs cytosoliques (v-mil, v-mos) ou enfin intervenir directement au niveau du noyau (v-myb, v-myc, v-fos).

A) Les oncogènes viraux codant pour un facteur de croissance

L'oncogène v-sis trouvé dans deux rétrovirus, le virus du sarcome simien SSV et le virus du sarcome félin souche Parodi Irgens PI FeSV est exprimé dans ces deux espèces respectivement sous forme d'une protéine de fusion de 28 kd P28 $^{env-sis}$ et d'une protéine de fusion de 76 kd P76$^{gag-sis}$. Son homologue c-sis code pour la sous-unité β du PDGF (le PDGF est composé de deux sous-unités α et β présentant des homologies (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 β (Robbins et al., 1983). Les différences entre les oncogènes v-sis et c-sis sont quelques mutations ponctuelles qui ne peuvent pas être directement impliquées dans le mécanisme de transformation par v-sis. En effet, les clones génomiques c-sis ou les clones d'ADN complémentaires de l'ARN messager du gène c-sis (c-DNA c-sis) peuvent transformer des cellules mammifères lorsqu'ils sont exprimés à des taux efficaces (Clarke et al., 1984 ; Gazzit, 1984). Les cellules transformées par le virus SSV relarguent des peptides qui se comportent comme le PDGF : ils se fixent sur les récepteurs du PDGF, induisent la phosphorylation des résidus tyrosine du recepteur et une régulation du récepteur similaire à celle provoquée par la fixation du PDGF (Williams et al., 1985). Ils stimulent la synthèse d'ADN de cellules normales quand ils sont ajoutés à leur milieu de culture. De plus, la capacité d'une série de cellules transformées par le virus SSV à croître dans des souris nude est corrélée avec leur capacité à produire des peptides v-sis. Ainsi, la transformation par le virus SSV semble modulée par un facteur de croissance P28^{v-sis} secrété qui mime le PDGF et stimule la croissance autocrine des cellules transformées par le virus SSV (Williams et al.,1985 ; Johnsson et al., 1986).

B) Les oncogènes viraux codant pour des protéines tyrosine kinases

Cette famille d'oncogènes a pour chef de file le gène v-src auquel il a été attribué pour la première fois, une activité biochimique (Brugge et Erikson, 1977 ; Levinson et al., 1981). Tous les produits de ces gènes présentent de fortes homologies de séquences sur une portion continue de 260 aminoacides et sont plus ou moins différents sur le reste de leur séquence. Cette région d'homologie est située dans le cas du produit du gène v-src (pP60^{v-src}) dans sa moitié carboxyterminale, moitié qui porte l'activité phosphotransférase et qui présentent certaines homologies avec le domaine catalytique de la protéine kinase A. La famille des tyrosine kinases peut se diviser en deux grands groupes.

1) Les oncogènes viraux codant pour des récepteurs membranaires

Sur la base de caractéristiques structurales, il est possible de diviser ce groupe d'oncogènes en deux sous-groupes : le premier sous-groupe inclut v-erb B, homologue au gène qui code pour le récepteur de l'EGF, le second sous-groupe, v-fms et v-kit tous deux présentant des homologies avec le gène qui code pour le récepteur du PDGF.

a) l'oncogène v-erbB

v-erbB a été mis en évidence dans le virus de l'érythroblastose aviaire AEV ES4. Son produit est une version tronquée du récepteur de l'EGF. Le récepteur de l'EGF est constitué de trois régions : une région aminoterminale de 621 acides aminés exposée à l'extérieur de la cellule, une région hydrophobe transmembranaire de 26 acides aminés et une région carboxyterminale de 542 acides aminés exposée à l'intérieur de la cellule (Ullrich et al.,1984). L'homologie entre le produit de v-erbB et le récepteur de l'EGF commence au résidu 557 du récepteur de l'EGF (Xu et al., 1984). La région cytoplasmique présente une grande homologie avec le domaine catalytique des autres protéines tyrosine kinases de la famille src (schéma 9). Les 80 résidus de l'extrémité carboxyterminale du récepteur de l'EGF ne présentent aucune homologie avec des protéines connues. Il semble probable que le gène qui code pour le récepteur de l'EGF soit le gène c-erbB puisqu'ils ont été tous deux localisés indépendamment au même niveau sur le chromosome 7 (Spurr et al., 1984 ; Davies et al., 1980).

Le récepteur de l'EGF est phosphorylé constitutivement sur des résidus sérine et thréonine. Après exposition des cellules à l'EGF, l'ensemble des groupes phosphate associés au récepteur de l'EGF est doublé (Hunter et Cooper, 1981 ; Cochet et al., 1984). Cette phosphorylation touche le site majeur d'autophosphorylation du récepteur de l'EGF, le résidu tyrosine en position 1173 (Tyr 1173) (Downward et al., 1984) et plusieurs résidus sérine et thréonine, laissant entendre que plusieurs protéines sérine/thréonine kinases pourraient réguler l'activité du récepteur de l'EGF. Après traitement par les esters de phorbol (tétra-o-décanoyl phorbol 13 acétate ou TPA), plus de 30 % des récepteurs d'EGF des cellules A431 (cellules riches en récepteurs d'EGF) sont phosphorylés sur le résidu thréonine 654 (Cochet et al., 1984). Parallèlement, le taux de résidus tyrosine phosphorylés sur les récepteurs d'EGF ou sur d'autres protéines baisse par rapport au taux de résidus tyrosine phosphorylés dans les cellules exposées à l'EGF (Cochet et al., 1984). C'est la protéine kinase C qui semble gérer l'interaction entre ces deux activités kinases. La PKC, activée par les esters de phorbols (Parker et al., 1984), phosphoryle le récepteur d'EGF sur le résidu thréonine 654. Cette phosphorylation est suffisante pour que le récepteur s'internalise (Beguinot et al., 1985 ; Lin et al., 1986). Cette internalisation pourrait affecter l'activité tyrosine kinase du récepteur.

L'EGF sur les cellules A431 stimule le cycle des phospholipides et la production de diacylglycérol (Hunter et cooper, 1985) et donc pourrait stimuler la PKC. En effet, dans certaines conditions, le résidu thréonine 654 peut être phosphorylé après traitement à l'EGF. Cette phosphorylation pourrait faire partie d'un mécanisme permettant d'expliquer la régulation , en amont de la fixation de l'EGF, par l'EGF lui même ou par un autre facteur extracellulaire. Le fait

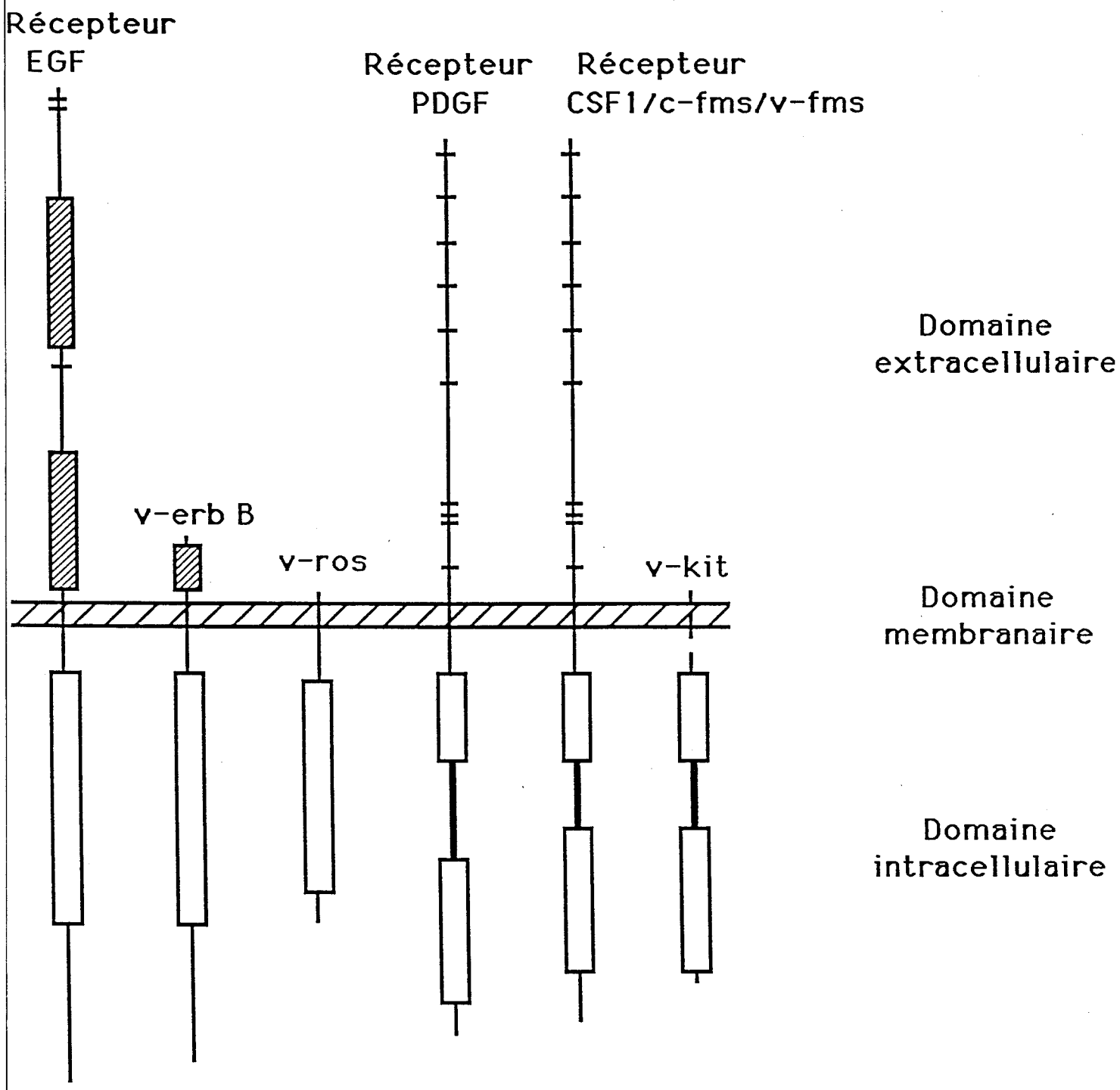


Schéma 9 : Comparaison entre les récepteurs de l'EGF, du PDGF et les produits de v-erb B, v-ros, v-fms et v-kit

- Domaine catalytique des tyrosine kinases
- Domaine riche en cystéines
- Résidus cystéines
- Région intermédiaire du domaine kinase

BU LILLE

que l'EGF induise également l'internalisation puis la dégradation de récepteurs mutés en position 654 suggère qu'il existe certainement au moins deux mécanismes capables d'éliminer les récepteurs d'EGF fonctionnels (Lin et al., 1986).

Le produit de v-erbB ne possède pas toute la région extracellulaire qui existe dans le récepteur de l'EGF et sa région carboxyterminale est généralement différente de celle du récepteur de l'EGF (schéma 9). Ces deux différences pourraient contribuer à la transformation néoplasique. Le fait que le produit v-erbB n'ait pas ou très peu de domaine extracellulaire sous-entend que le produit v-erbB lié à la membrane ne peut pas fixer de ligand et peut donc rester constamment tourné vers l'extérieur de la cellule alors que le récepteur de l'EGF qui a fixé l'EGF s'internalise. De plus, alors que l'activité tyrosine kinase du récepteur de l'EGF dépend de l'association EGF-récepteur, l'activité tyrosine kinase est constitutive dans le cas du produit v-erbB (Gilmore et al., 1985). Ainsi, la protéine erbB pourrait fonctionner comme relais mitotique même en absence de ligand.

Les différences de séquences entre le domaine carboxyterminal du récepteur de l'EGF et celui du produit erbB semblent également impliquées dans la transformation par v-erbB (Gamett et al., 1986). Différents isolats de virus ayant transduit erbB présentent des potentiels de transformation différents. Cette différence paraît liée à des variations de séquence dans le domaine carboxyterminal. Certains isolats (AEV ES4, H), qui causent des érythroblastoses chez le poulet et transforment les fibroblastes en culture, contiennent un produit v-erbB qui a perdu la partie carboxyterminale du récepteur de l'EGF. D'autres, causent des érythroblastoses uniquement chez des poulets de certaines races et contiennent un produit v-erbB qui a conservé toute l'extrémité carboxyterminale de récepteur de l'EGF. Enfin des isolats qui induisent des fibrosarcomes ou des angiosarcomes chez le poulet mais pas d'érythroblastoses présentent une extrémité carboxyterminale amputée d'une partie interne ou 3' par rapport à celle du récepteur de l'EGF.

b) les oncogènes v-fms et v-kit

La protéine cellulaire c-fms homologue aux produits codés par l'oncogène v-fms est le récepteur du facteur de croissance CSF1 ou M-CSF spécifique des macrophages (Sherr et al., 1985). Les oncogènes v-fms, c-fms, v-kit et le gène qui code pour le récepteur du PDGF présentent de fortes homologies de séquences. La plus forte homologie entre les quatre produits se situe au niveau de leur domaine tyrosine kinase. Ce domaine est homologue au site catalytique de $pP60^{v\text{-}src}$ mais divisé en deux régions (schéma 9). Dans les quatre produits, la division s'est effectuée au même endroit. Les séquences qui séparent le domaine catalytique en deux régions ne présentent pas d'homologie avec $pP60^{v\text{-}src}$ (Yarden et al., 1986), sont différentes selon le produit considéré mais plus ou moins homologues les unes par rapport aux autres. Les récepteurs du CSF1 (c-fms/v-fms) et du PDGF présentent également des similitudes dans leur domaine extracellulaire, tout particulièrement dans la distribution de leurs résidus cystéine. Ceci est en accord avec le fait que les deux facteurs de croissance ont des structures identiques (molécules dimériques).

Le mode d'action des oncogènes v-fms et v-kit dans la transformation est encore mal défini. Cependant, une partie du pouvoir transformant de v-fms pourrait être imputée à son extrémité 3'. L'analyse des séquences nucléotidiques du gène v-fms et de son homologue c-fms chez l'homme a indiqué que les quarante derniers acides aminés du produit c-fms sont remplacés dans le produit v-fms par onze acides aminés d'origine rétrovirale (Caussens et al., 1986 ;

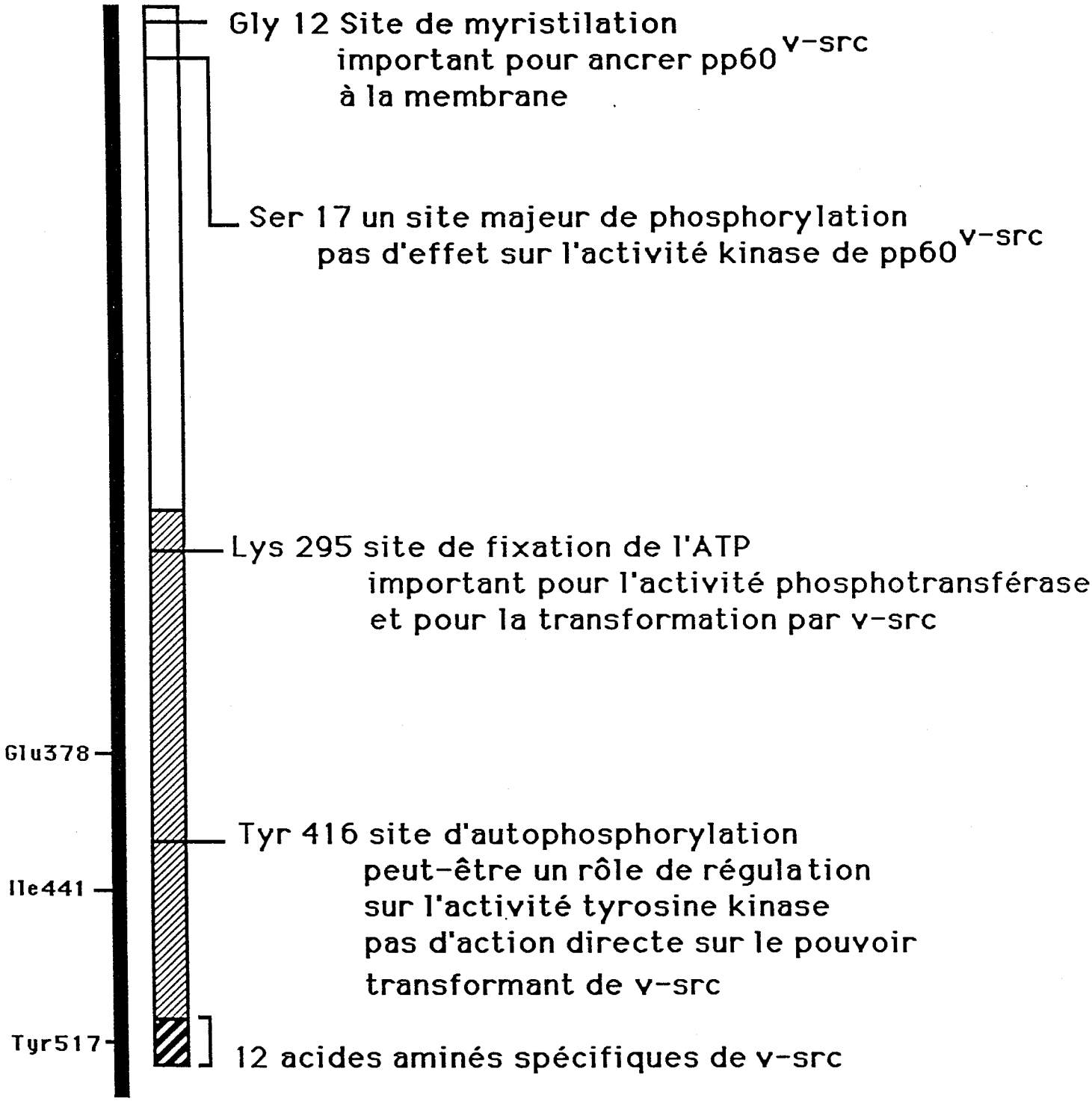


Schéma 10 : Structure de pp60 v-src

domaine catalytique
pp60 c-src

Browning et al., 1986). Un gène fms hybride obtenu en replaçant les séquences 3' du gène c-fms derrière le gène v-fms, a un potentiel de transformation sur les fibroblastes nettement plus faible que celui du gène v-fms. Il n'est plus capable d'induire la formation de tumeurs dans les souris nude. Cette réduction du pouvoir transformant apparaît même si les protéines hybrides sont encore exprimées à la surface de la cellule. Les modifications dans le domaine 3' du gène v-fms pourraient donc contribuer à son pouvoir transformant en altérant l'accès des substrats au domaine catalytique du produit v-fms ou en changeant la spécificité de ce produit pour un substrat.

2) Les oncogènes viraux codant pour des protéines tyrosine kinases associées à la surface interne de la membrane plasmique

L'oncogène le plus étudié est sans nul doute l'oncogène v-src qui code pour la protéine $P60^{v\text{-}src}$ (schéma 10). $P60^{v\text{-}src}$ est une protéine de 526 acides aminés qui est synthétisée dans les ribosomes libres (Courtneidge et Bishop 1982). Elle subit ensuite deux types de modifications post-traductionnelles.

$p60^{v\text{-}src}$ est tout d'abord myristylée à son extrémité aminoterminale (Sefton et al.,1982 ; Buss et al., 1984). Cette acylation lui permet de s'associer rapidement aux diverses membranes cellulaires et plus particulièrement à la membrane plasmique. Le groupement myristyl est directement impliqué dans cette association à la membrane car des molécules mutantes de $P60^{v\text{-}src}$ qui perdent la possibilité de se myristyler ne peuvent plus s'associer aux membranes (Cross et al., 1984). $P60^{c\text{-}src}$ qui a la même extrémité aminoterminale que $P60^{v\text{-}src}$ est myristylée et associée aux membranes (Buss et al., 1984 ; Cross et al., 1984). La localisation membranaire de $P60^{v\text{-}src}$ est indispensable pour la transformation. En effet ces mêmes protéines mutantes $P60^{v\text{-}src}$ non myristylées sont actives comme protéines kinases mais n'induisent plus la transformation.

$P60^{v\text{-}src}$ est ensuite phosphorylée ($pP60^{v\text{-}src}$). Elle possède deux sites majeurs de phosphorylation, un résidu tyrosine en position 416 (Tyr 416) et un résidu sérine en position 17 (Ser 17) et plusieurs sites mineurs dans sa moitié aminoterminale. 10 à 30 % des molécules $pP60^{v\text{-}src}$ sont phosphorylée sur la tyrosine 416. Cette tyrosine est localisée dans le domaine catalytique de $pP60^{v\text{-}src}$ et est phosphorylée par $pP60^{v\text{-}src}$ elle même. L'autophosphorylation de $pP60^{v\text{-}src}$ pourrait jouer un rôle de régulateur de l'activité tyrosine kinase. En effet la $pP60^{v\text{-}src}$ phosphorylée *in vitro* sur Tyr 416 en présence de GTP possède une activité tyrosine kinase deux à trois fois plus importante qu'une $pP60^{v\text{-}src}$ non phosphorylée. Dans les cellules de poulet transformées par RSV, environ 60 % des molécules $pP60^{v\text{-}src}$ sont phosphorylées sur la sérine 17. Les régions encadrant cette sérine ont peu d'effet sur l'activité kinase de $pP60^{v\text{-}src}$ et sur son effet tumorigène (Cross et Hanafusa, 1983). Les sites mineurs de phosphorylation sur la tyrosine présents dans la moitié carboxyterminale de $pP60^{v\text{-}src}$ pourraient réguler l'activité tyrosine kinase de $pP60^{v\text{-}src}$. De façon similaire, ils pourraient réguler l'activité tyrosine kinase de $pP60^{c\text{-}src}$ car leur phosphorylation est toujours corrélée avec une augmentation de l'activité tyrosine kinase de $pP60^{c\text{-}src}$. La moitié aminoterminale a un effet modulateur sur la moitié carboxyterminale qui contient le site catalytique puisque le fragment carboxyterminal de $pP60^{v\text{-}src}$ isolé, possède une plus grande activité spécifique que la molécule $pP60^{v\text{-}src}$ intacte.

Un certain nombre de résidus sont conservés dans toutes les protéines kinases. Parmi

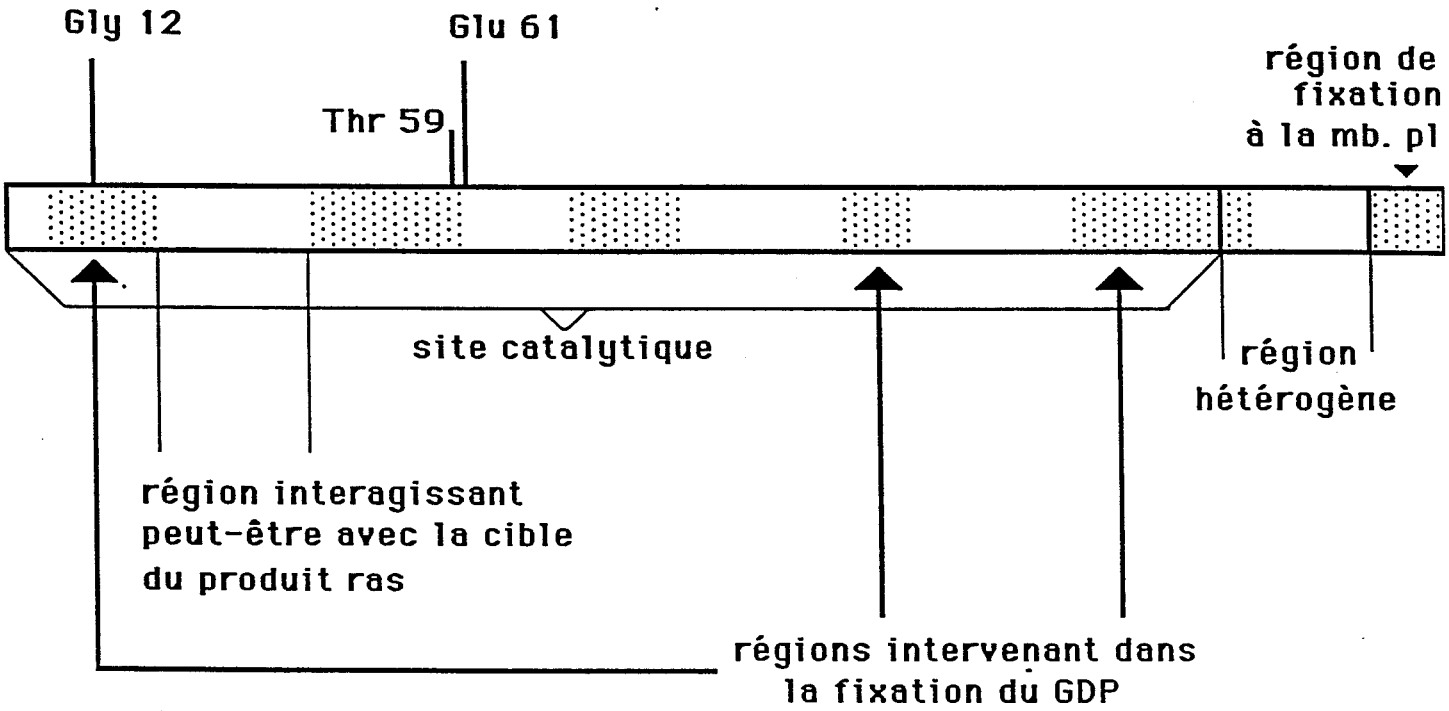
ceux-ci la lysine, en position 295 dans $pP60^{v-src}$. Cette lysine fait partie du site de fixation probable de l'adénosine tri-phosphate (ATP) (Kamps et al., 1984). Une altération au niveau de ce site abolit le pouvoir transformant de $pP60^{v-src}$.

La moitié carboxyterminale de $pP60^{v-src}$ semble être cruciale dans l'activité phosphotransférase de $pP60^{v-src}$. Ainsi des délétions de plus de onze résidus à partir de l'extrémité carboxyterminale font baisser à la fois l'activité tyrosine kinase et le potentiel transformant de $pP60^{v-src}$ (Hunter et Cooper, 1985). Ceci est intéressant puisque la séquence de $pP60^{v-src}$ diverge de celle de $pP60^{c-src}$ au niveau de cette extrémité. La substitution des dix neuf derniers acides aminés de c-src par douze acides aminés spécifiques de v-src est certainement impliquée dans la transformation par v-src. Cette substitution élimine le site majeur de phosphorylation de $pP60^{c-src}$ (résidu tyrosine 517). Or il a été récemmment démontré que lorsque ce résidu est muté, $pP60^{c-src}$ est phosphorylée sur Tyr 416, son activité tyrosine kinase augmente et elle induit la transformation des fibroblastes avec la même efficacité que $pP60^{v-src}$ (Kmiecik et al., 1986)· Il semble de plus que la seule surexpression du gène c-src ne soit pas suffisante pour induire la transformation. Des virus contenant le gène c-src entier à la place de v-src sont incapables de transformer les fibroblastes. Quelques transformants spontanés apparaissent (ils présentent une activité tyrosine kinase très importante) mais la séquence nucléotidique de ces variants indique que leurs propriétés sont dues à la substitution d'un acide aminé dans leur domaine kinase (substitution au niveau du résidu Glu378 ou Ile441) (Levy et al., 1986). Il n'y a pas d'évidence absolue que l'activité tyrosine kinase de $pP60^{v-src}$ et des autres protéines kinases module la transformation mais des mutations dans v-src qui affectent l'activité kinase affectent également le pouvoir transformant de v-src (Iba et al., 1984).

Dans les cellules transformées par le virus RSV, plusieurs protéines contenant des tyrosines phosphorylées ont été détectées : parmi celles-ci, trois protéines du squelette cortical membranaire : P35, P81 et la vinculine (Hunter et Cooper, 1985).

- D'une part, il s'est avéré récemment que la protéine P35 présente de fortes homologies structurales avec les lipocortines I et II. Ces enzymes serviraient de modulateurs de l'activité de la phospholipase A2 qui intervient dans le métabolisme des prostaglandines (Huang et al., 1986). La phosphorylation de P35 ne semble pas suffisante pour induire la transformation morphologique (Kamps et al., 1985 ; 1986) mais peut être nécessaire pour la tumorigénicité (Nawrocki et al.,1984; Nakamura et Weber, 1982).
- D'autre part, la phosphorylation de la vinculine pourrait être impliquée dans la rupture des filaments du cytosquelette observée dans les cellules dans lesquelles $pP60^{v-src}$ a été microinjectée (Maness et Levy, 1983).

Des protéines solubles sont également phosphorylées dans les cellules transformées par RSV (énolase, phosphoglycérate mutase, lactase déshydrogénase). $pP60^{v-src}$ peut également induire la phosphorylation du phosphatidylinositol, du 4 phosphophosphatidylinositol , du diacylglycérol *in vitro*. Ces phosphorylations sont plus actives dans les cellules transformées par v-src même si l'enzyme responsable n'a pas été directement identifiée (Sugimoto et al., 1984). Cette activité de $pP60^{v-src}$ mérite attention car l'augmentation du cycle du phosphatidyl inositol permet la mobilisation du calcium intracellulaire et active la PKC Ca^{++} et phospholipide dépendante (Berridge, 1981 ; Mitchell , 1984).



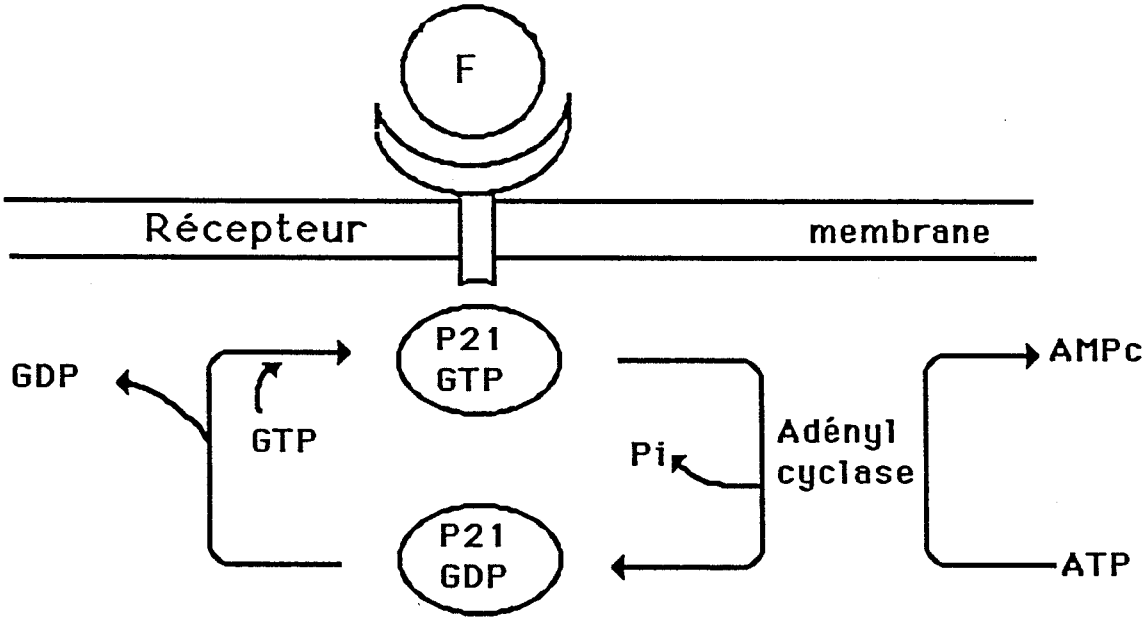


Schéma 11 : Structure de $P21^{ras}$ et hypothèse d'action chez la levure

(Willumsen et al, 1986 ; Spandidos, 1985)

régions hydrophobes

BU LILLE

C) Les oncogènes viraux régulateurs de l'adénylcyclase ou les oncogènes ras

Il existe deux types de gènes ras viraux (v-ras), trois types de gènes ras cellulaires (c-ras) et un gène homologue à ces derniers, le gène ral :
- les gènes v-ras dérivés du proto-oncogène c-Ha-ras. Le v-Ha-ras du virus Harvey MSV et le v-Ra-ras du virus Rasheed, induisant des sarcomes chez le rat, sont des versions transduites du c-Ha-ras1 de rat. Le v-Balb-ras du virus Balb MSV est une version tronquée du c-Ha-ras de souris
- le gène v-Ki-ras transduit dans le virus Kirsten MSV dérive du gène c-Ki-ras2 de rat.
- Aux deux proto-oncogènes c-Ha-ras et c-Ki-ras s'ajoute le gène transformant N-ras mis en évidence pour la première fois à partir d'une lignée de neuroblastome SK-N-SH et le gène ral isolé d'une banque de cDNA de cellules lymphoïdes B immortalisées par infection avec le virus Epstein Barr (EBV)(Chardin et Tavitian, 1986).

Tous les gènes ras sont traduits sous forme d'une protéine de 21 kd P21 (excepté v-Ra-ras, $p29^{Ra-ras}$). Ces protéines sont étroitement homologues. Elles peuvent être divisées en trois régions : une région aminoterminale de 160 acides aminés qui contient le site catalytique de ces protéines, une région hétérogène de 20 acides aminés (c'est à ce niveau que différent les protéines $P21^{ras}$), une région carboxyterminale sur laquelle se fixent post-traductionnellement des lipides et qui ancre les P21 au plasmalème. Il a été récemment démontré que six portions de $P21^{v-Ha-ras}$ étaient importantes pour la transformation : une région hydrophile qui pourrait interagir avec la cible cellulaire de ras et cinq régions hydrophobes dont trois participeraient activement à la fixation du GDP ou GTP et une qui correspond à la région carboxyterminale (Willumsen et al., 1986) (schéma 11). Les $P21^{ras}$ sont phosphorylées et présentent une activité d'autophosphorylation quand le résidu en position 59 est une thréonine (Thr 59)(Dhar et al., 1982 ; Shih et al., 1982). Cette Thr 59 absente dans le gène c-Ha-ras semble corrélée avec le faible taux de phosphorylation dans le rat et l'absence d'activité d'autophosphorylation de $P21^{c-Ha-ras}$.

Les $P21^{ras}$, associées à la surface interne de la membrane plasmique, ont le pouvoir de fixer le GTP ou le GDP et sont capables d'hydrolyser le GTP (Gibbs et al., 1984 ; Hurley et al., 1984 ; Mc Grath et al., 1984 ; Sweet et al., 1984). Par ces propriétés, elles présentent des homologies de fonctions avec les protéines G qui régulent l'adénylcyclase et avec la transducine qui régule une phosphodiestérase cGMP dépendante .Pour la transducine et les protéines G, la fixation du GTP favorise leur interaction avec les enzymes qu'elles régulent. Il est raisonnable de penser que P21 peut agir au niveau de la transmission d'un signal extracellulaire à une molécule effectrice intracellulaire et que la fixation du GTP et son hydrolyse sont impliquées dans la régulation de cette transmission. Dans le cas de la protéine G, l'hydrolyse du GTP fixé, par une activité intrinsèque à la protéine G, permet la relaxation de la protéine. Il a été montré que les protéines v-ras ou c-ras mutantes qui ont échangé le résidu glycine en position 12 pour un autre acide aminé fixent encore le GTP mais l'hydrolysent 10 fois moins efficacement (Finkel et Cooper, 1984 ; Manne et al., 1985 ; Mc Grath et al., 1984 ; Sweet et al., 1984). Cette incapacité à hydrolyser le GTP pourrait maintenir la protéine dans un état excité et rendre constitutif l'effet putatif de ces P21 sur une molécule cellulaire.

Le gène c-Ha-ras possède chez S. cerevisiae deux homologues RAS1 et RAS2 codant

pour des protéines similaires à celles codées par les c-Ha-ras mammifères (Dhar et al., 1984 ; Papageorge et al., 1984 ; Powers et al., 1984). Les produits de RAS1 et RAS2 stimulent l'adénylcyclase de la levure (Toda et al., 1985) (schéma 11). A la fois les gènes v-ras et c-ras humains peuvent remplacer de façon efficace les gènes RAS1 et RAS2 de la levure, suggèrant ainsi que les protéines ras mammifères pourraient être des régulateurs de l'adénylcyclase. Mais, jusqu'ici, il n'y a aucune évidence qu'elles aient cette fonction (Beckner et al., 1985).

D) Les oncogènes viraux codant pour des protéines sérine/thréonine kinase

Ce groupe est constitué des oncogènes viraux v-mil, v-raf et v-mos. Leurs produits présentent de fortes homologies avec le domaine catalytique de $pP60^{v-src}$. La première zone d'homologie contient des séquences correspondant au site de fixation d'ATP, la seconde englobe mais n'inclut pas la séquence qui présente le résidu tyrosine (homologue au résidu Tyr 416 de $pP60^{v-src}$) comme site majeur d'autophosphorylation. Ces produits phosphorylent leurs substrats sur les résidus sérine et thréonine (l'activité Ser/Thr kinase du produit v-mos est controversée)et résident principalement dans le cytosol. Ils pourraient intervenir dans la transmission mitotique en aval des protéines transductrices ras , alors que les protéines tyrosine kinases transmembranaires, src, fms, fes interviendraient en amont des protéines ras (Smith et al., 1986). En effet, le lien entre les oncogènes cellulaires dans la transmission mitotique a pu être ébauché grâce à un anticorps monoclonal qui neutralise les protéines ras (Furth et al., 1982). L'anticorps injecté inhibe l'initiation de la phase S dans les cellules NIH3T3 (Mulcahy et al., 1985). Il a été injecté dans des cellules NIH3T3 transformées par différents oncogènes . La transformation par des oncogènes codant pour les protéines src, fms ou fes dépend de la protéine ras puisque l'injection de l'anticorps anti-ras fait réverter le phénotype transformé de ces cellules. Par contre, la transformation par des oncogènes codant pour des protéines cytosoliques (mos, raf) ne dépend pas de la protéine ras . Les cellules maintiennent leur phénotype transformé.

E) Les oncogènes codant pour des produits nucléaires

Au sein de ce groupe, on trouve les oncogènes v-myc, v-myb, v-ski, v-fos. Les produits de ces gènes sont tous trouvés associés au noyau. Cette localisation est nécessaire à leur mode d'action. Ainsi des cellules hématopoïétiques transformées par v-myb révertent vers le phénotype normal quand elles sont traitées aux esters de phorbol (Symonds et al., 1984). Cette réversion s'accompagne de la relocalisation de v-myb du noyau vers le cytoplasme (Klempnauer et al., 1984). Mais la présence de ces oncogènes dans le noyau n'est pas suffisante pour induire la transformation puisque dans des fibroblastes infectés mais non transformés par v-myb , $P45^{v-myb}$ est nucléaire. v-myb et v-myc présentent des homologies de séquences (Ralston et Bishop, 1983). Leurs produits sont capables de fixer à la fois l'ADN double ou simple brin *in vitro* (Donner et al., 1982 ; Moelling et al., 1985). Cette capacité à fixer l'ADN semble jouer un rôle dans la transformation cellulaire. Des mutants du virus MC29 mutés dans v-myc et dont les produits fixent beaucoup moins bien l'ADN voient leur pouvoir transformant et leur tumorigénicité diminuer. v-myb et v-myc sont tous deux capables d'immortaliser (établissement en lignée) des cellules et

Oncogènes	Produits	Cellules d'origine	Références
Ha-RAS*	p21 (Fixe le GTP et GTPase)	EJ: carcinome de la vessie	Santos et al., 1982
Ki-RAS*		Carcinome pulmonaire	Der et al., 1982
N-RAS		Sk-N-SH: Neuroblastome	Taparowsky et al., 1983
B-lym	p8 apparentée aux transférines	RP9: lymphome B aviaire.	Goubin et al., 1983
T-lym-1		S49T: Lymphome murin de type T	Lane et al., 1984
RAF *		Carcinome pulmonaire	Shimizu et al., 1985
neu	p185 Tyrosine kinase	Neuroblastome.	Bargmann et al., 1986
TRK	p64 Tyrosine kinase	Carcinome du colon ascendant.	Martin-Zanca et al., 1986
MET	Tyrosine kinase?	MNNG-HOS; Lignée cellulaire humaine transformée par un carcinogène chimique.	Cooper et al., 1984
mel		NK14: mélanome.	Padua et al., 1984
dbl		Lymphome B diffus.	Eva et Aaronson, 1985
ret		Lymphome de type T.	Takahashi et al., 1985
mcf-2 ROS *	Tyrosine kinase?	MCF-7: Carcinome mammaire.	Fasano et al., 1984 Birchmeier et al., 1986
MAS	p33 Transmembrane?	Carcinome épidermoïde.	Young et al., 1986
hst		Carcinome Gastrique.	Sakamoto et al., 1986

* Oncogène déja trouvé au sein d'un rétrovirus.

TABLE II : Oncogènes isolés par transfection de l'ADN de cellules transformées.

BU LILLE

également capables de complémenter l'activité de certains gènes ras dans la transformation de cellules embryonnaires de rat.

III - ONCOGENES CELLULAIRES ET CANCERS

La transformation de cellules normales en cellules cancéreuses malignes implique une cascade d'événements cellulaires généralement regroupés en trois étapes : l'initiation, la promotion et la progression. L'activation d'un oncogène cellulaire quiescent peut constituer une de ces étapes. Cependant, l'action d'un oncogène défini ne peut pas être assignée spécifiquement à une étape. Un oncogène peut être initiateur, promoteur ou progresseur selon le système considéré. Le gène Ha-ras peut jouer le rôle d'initiateur et le TPA le rôle de promoteur dans l'induction de papillome chez le souriceau (Brown et al., 1986).Par contre le gène Ha-ras activé (EJ Ha-ras) peut faire progresser des cellules de papillomes induits chimiquement, vers un type de cellules hautement tumorigènes dans les souris nude (Harper et al., 1986).

L'activation d'oncogène cellulaire peut dériver de différents mécanismes moléculaires : des mutations ponctuelles, l'intégration d'éléments promoteurs viraux à proximité des gènes cellulaires, la translocation chromosomique et probablement d'autres mécanismes encore inconnus.

A) Transfection sur NIH3T3 et essai de tumorigénicité

La démonstration que certains éléments génétiques pouvaient acquérir un pouvoir transformant sans la contribution de séquences rétrovirales exogènes a été obtenue en employant des méthodes de transfection d'ADN sur les cellules NIH3T3 (Shih et al., 1979). La formation de foyers dans le tapis de cellules NIH3T3 ou la prolifération de colonies en agar mou rendent compte de la présence ou non d'un gène transformant dans l'ADN transfecté. Ces expériences ont révélé la présence de gènes transformants dans environ 15 % des cancers ainsi que dans des tumeurs animales induites chimiquement. La plupart de ces gènes transformants se sont avérés être des membres de la famille ras. Pour rechercher des oncogènes qui échappent à la détection par induction de foyers sur NIH3T3, une nouvelle formule de détection a été mise au point (Fasano et al., 1984). Les cellules NIH3T3 cotransfectées avec de l'ADN tumoral et un gène marqueur de sélection sont injectées à des souris nude. L'apparition de tumeurs permet de déceler un gène transformant dans les cellules injectées. Plusieurs cycles de cotransfection et essai de tumorigénicité conduisent à la purification du gène activé. Cette méthode a permis de mettre en évidence de nouveaux oncogènes humains (mcf2, mcf3, mas) à partir de lignées de cellules épithéliales (Fasano et al., 1984 ; Birchmeier et al., 1986 ; Young et al., 1986) (table II).

B) Points de mutation dans les proto-oncogènes

L'analyse comparative des séquences nucléotidiques des oncogènes ras et de leurs homologues cellulaires normaux met en évidence un seul point de mutation responsable du

Gène activé	Espèce	Tumeur ou lignée	Origine du promoteur viral	Références
c-myc	poulet	Lymphome B	ALV (RAV-1, RAV-2, td-SRA)	Hayward et al., 1981
	souris	Lymphome T	C.P.A (Intra Cisternal Particule A)	Greenberg et al., 1985
		Plasmocytome	MCF	Corcoran et al., 1984
	rat		MLV	Tsichlis et al., 1985
	chat	Lymphome T	FeLV	Neil et al., 1984
c-erb B	poulet	Erythroblastose	ALV (RAV-1)	Raisnes et al., 1985
c-myb	souris	Tumeurs myéloïdes	MLV	Shen-Ong, 1986
c-mos	souris	Plasmocytome	C.P.A	Canaani et al., 1983
pim 1	souris	Lymphome T	MCF	Cuypers et al., 1984
int 1	souris	Carcinome mammaire	MMTV	Peters et al., 1984
int 2				
int 41		Carcinome mammaire et rénal	MMTV	Garcia et al., 1986
Mlvi 1	rat	Lymphome T	MLV	Tsichlis et al., 1985
Mlvi 2				
Mlvi 3				
Mis 1	rat	Lymphome T	MLV	Jolicœur et al., 1985
IL-3	souris	Promyélocytique (WEHI 3B)	C.P.A	Ymer et al., 1985
IL-4	singe	Lymphome T (MLA-144)	GLV	Chen et al., 1985

TABLE III : Activation de gènes par des promoteurs viraux.

changement d'un acide aminé de la $P21^{ras}$. Par cette mutation, les protéines ras acquièrent leur pouvoir transformant. Deux "points chauds" ont été détectés jusqu'ici : les codons 12 et 13 et les codons 59, 61 et 63. L'oncogène Ha-ras activé dans les carcinomes de vessie T24 est différent de son homologue normal au niveau d'une seule base (G---T). La glycine en position 12 est substituée par une valine (Reddy et al., 1982, Tabin et al., 1982 ; Taparowski et al., 1983). D'après les données informatiques, toute substitution du résidu glycine en un autre résidu conduit à des changements de conformation de $P21^{ras}$ qui empêchent l'extrémité aminoterminale de la protéine de se replier dans la partie interne de la molécule (Pincus et al., 1983 ; Santos et al., 1983).

C) Attachement de promoteurs/activateurs forts aux proto-oncogènes

Blair et al. (1981) ont ligaturé de façon covalente la séquence LTR du provirus de sarcome murin Moloney cloné moléculairement au proto-oncogène c-mos de souris biologiquement inactif. Cette construction transforme aussi efficacement les cellules NIH3T3 que l'oncogène v-mos sous LTR activation. Ceci est expliqué par le fait que les éléments promoteurs et/ou activateurs du LTR stimulent la transcription du gène c-mos. Ainsi la surexpression de c-mos semble suffisante pour induire la transformation des NIH3T3. Un système identique a été décrit par Chang et al. (1982): le gène c-Ha-ras ligaturé derrière des séquences LTR virales transforme les cellules NIH3T3 et les cellules transformées expriment de hauts taux de $P21^{ras}$.

Il est intéressant de remarquer que le gène c-mos humain ne peut pas être activé par insertion d'éléments du MoMuSV en 5' de ses séquences codantes (Watson et al., 1982).

D) Insertion d'un promoteur et/ou d'un activateur à proximité des proto-oncogènes (tableIII)

L'activation du proto-oncogène peut apparaître après insertion d'un virus peu transformant dans l'ADN proche du proto-oncogène. Le virus leucémogène aviaire ALV a été trouvé intégré à proximité (environ 5 kbp) du gène c-myc dans des cellules provenant de certains lymphomes de type B (Hayward et al., 1981). Dans 80 % de ces lymphomes B rétroviro-induits, c-myc est surexprimé (Duesberg, 1983). De même, Fung et al. (1983) ont observé que les séquences LTR d'un virus ALV étaient intégrées environ 0,5 kbp en amont du gène c-erbB dans le génome de cellules érythroïdes leucémiques de poulet et concluaient que l'érythroblastose pouvait être due à l'activation du gène c-erbB par le promoteur du LTR intégré en amont. En fait, la grande majorité des sites d'intégration est regroupée dans une région située à l'extrémité 5' du premier exon homologue à v-erbB suggèrant que la rupture du locus c-erbB à ce niveau est importante pour son activation (Raisnes et al., 1985).

Il est également possible que l'activation d'un proto-oncogène soit due principalement à la présence de séquences activatrices. Cette situation a été décrite dans certains lymphomes aviaires ou le gène myc est activé par un fragment rétroviral situé en aval (Payne et al., 1982).

Tumeurs ou lignées	Oncogène amplifié	Produit	Amplification	Références
HL60 (Lignée promyélocytique humaine)	MYC	p64/67 Nucléaire	20	Nowell et al., 1983
COLO 320 (Carcinome colique humain)	MYC		50	Alitalo et al., 1983
Adénocarcinome gastrique humain	MYC		15 à 30	Shibuya et al., 1985
SCLC (Carcinome pulmonaire humain à petites cellules)	MYC		20 à 76	Little et al., 1983
SCLC	L-MYC		10 à 20	Nau et al., 1985
Neuroblastomes (Lignées ou tumeurs humaines)	N-MYC	p62/64 Nucléaire	140	Schwab et al., 1983a
Y79 (Lignée de rétinoblastome humain)	N-MYC		20	Schwab et al., 1984
MCF7 (Carcinome mammaire humain)	N-RAS	p21 Fixe GTP GTPase	10	Fasano et al., 1984
Y1 (Tumeur adénocorticale de souris)	c-Ki-ras	p21	50	Schwab et al., 1983b
K562 (Lignée de leucémie myéloïde chronique humaine)	ABL	p145	10	Collins et Groudine, 1983
COLO 201/205 (Carcinome colique humain)	MYB	p 83 Nucléaire	10	Alitalo et al., 1984
A431 (Carcinome épidermoïde humain)	ERB B	p70 Tyr. k.	10	Linn et al., 1984
Glioblastomes humains	ERB B		10 à 60	Libermann et al., 1985
MAC117 (Carcinome mammaire humain)	NEU	p185 Tyr. k. ?	10	King et al., 1985

TABLE IV: Amplification des c-onc.

Translocations ou remaniements	Cancer associé	c-onc "impliqué"	Références
5→5q-	Leucémie myéloïde aigüe. Anémies.	FMS	Nienhuis et al., 1985
t (9 ; 22) (q34 ; q11) (Chromosome Philadelphie)	Leucémie myéloïde chronique.	ABL BCR	Shtivelman et al., 1985
t (9 ; 11) (p22 ; q23)	Leucémie monocytique aigüe.	ETS1	Diaz et al., 1986
t (8 ; 14) (q24 ; q32) t (8 ; 22) (q24 ; q11) t (2 ; 8) (p11 à p13 ; q24)	Lymphome de Burkitt.	MYC	Berger et Bernheim, 1985
t (4 ; 11) (q21 ; q23) t (8 ; 21) (q22 ; q22)	Leucémies aigües.	ETS1 ETS2	Sacchi et al., 1986
t (14 ; 18) (q32 ; q21)	Lymphome folliculaire.	BCL2	Tsujimoto et al., 1985
t (11 ; 14) (q13 ; q32)	Lymphome B diffus. Leucémie lymphoïde chronique.	BCL1	Tsujimoto et al., 1985
t (15 ; 17) (q22 ; q21)	Leucémie promyélocytique aigüe.	p53	Le Beau et al., 1985
t (3 ; 8) (p14 ; q24)	Carcinome rénal héréditaire.	MYC	Drabkin et al., 1985

TABLE V : Translocations chromosomiques et c-onc.

BU LILLE

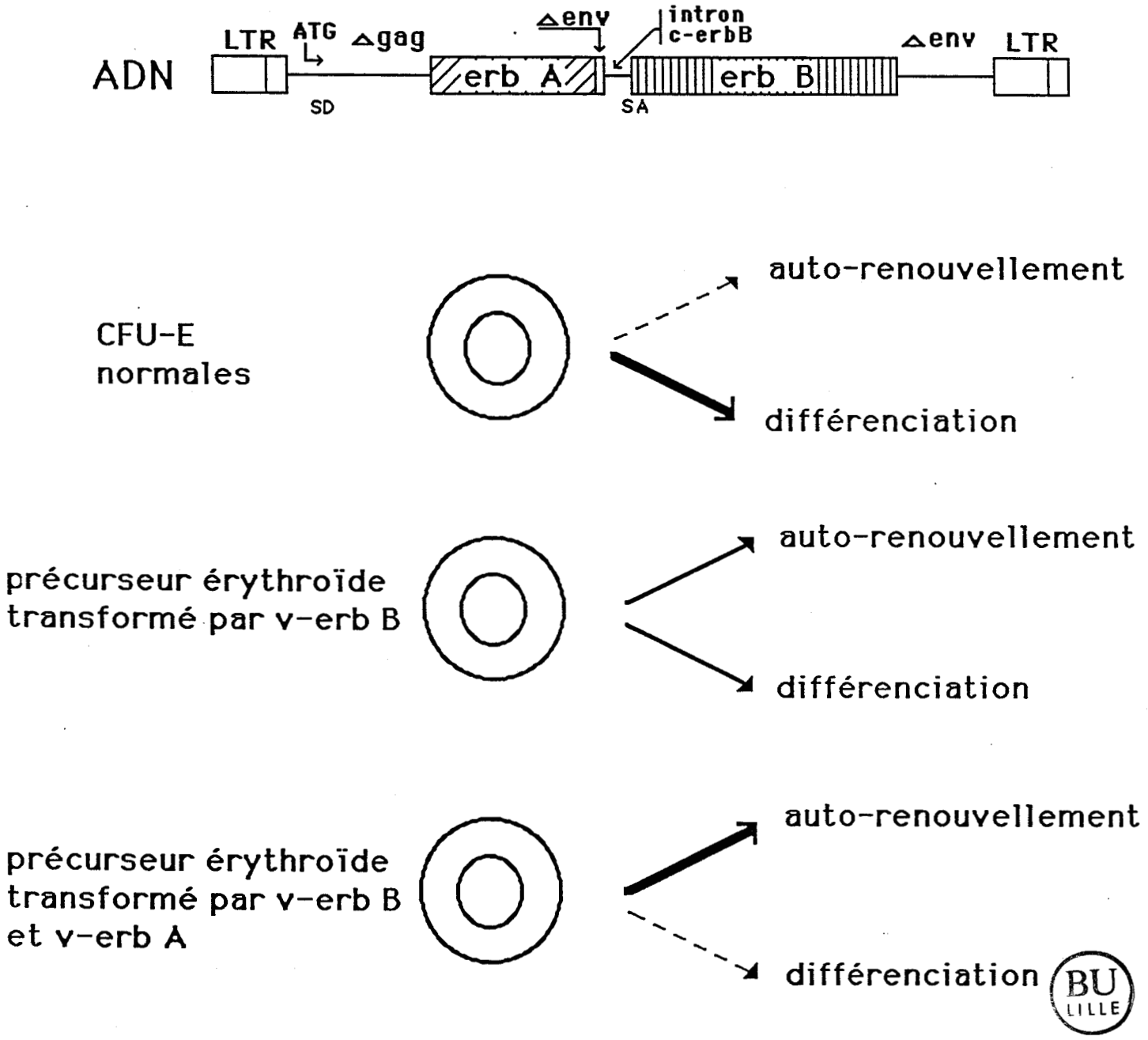
E) Amplification des oncogènes cellulaires(tableIV)

Deux anomalies cytogénétiques sont généralement associées à l'amplification d'ADN : les double minute chromosome (dmins) qui apparaissent comme de petites structures chromosomiques sans centromère et les régions HSR (Homogeneously Staining chromosomal Region) qui présentent une intensité intermédiaire uniforme plutôt que l'alternance normale de bandes sombres et claires dans les préparations de chromosomes traités à la trypsine et colorés au Giemsa. L'amplification de proto-oncogènes observée dans certaines tumeurs passe par l'existence de dmins ou HSR. Ainsi dans une lignée de cellules provenant d'un carcinome du colon (Colo 320) (Alitalo et al., 1983), environ 30 copies de c-myc sont cartographiées soit sur les régions HSR d'un marqueur chromosomique soit sur des dmins isolés. De même, les copies amplifiées de l'oncogène Ki-ras sont situées sur les dmins et les HSR des cellules de tumeur adrénocorticale de souris Y1 (Schwab et al., 1983b). Cependant l'amplification de protooncogène ne s'accompagne pas nécessairement de dmins ou HSR : elle peut être la conséquence d'un réarrangement qui affecte l'ADN tumoral.

F) Translocation et autres réarrangements (tableV)

Le génome des cellules transformées présente souvent des translocations ou des remaniements (délétions ou inversions de fragments) qui affectent les chromosomes. Ces anomalies peuvent impliquer des loci de proto-oncogènes et par ce biais activer le gène oncogène. Une des translocations les plus étudiées est la translocation t(8,14) humaine caractéristique des lymphomes de Burkitt et son équivalent chez la souris, la translocation t(12,15) observée dans les plasmocytomes. Dans ces deux types de translocations humaine ou murine, le gène c-myc est transféré (du chromosome 8 humain ou 15 murin) à proximité des gènes d'immunoglobulines (Klein, 1983, Robertson, 1983 ; Perry, 1983) et son expression augmente. Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer l'activation du gène c-myc dans ce type de tumeurs. D'après Croce et al. (1983), le contexte cellulaire pourrait être un facteur déterminant dans l'activation du gène c-myc : certains facteurs d'activation, spécifiques du stade de maturation du lymphocyte pourraient interagir avec des séquences activatrices de l'allèle transloqué, et par ce biais, activer le gène c-myc placé dans cet environnement. Il a été également question de dérégulations transcriptionelles, post-transcriptionelles et traductionelles du gène c-myc à la suite d'altérations intervenant au niveau de sa structure (perte des signaux de régulation, mutations somatiques)

Un autre cas de translocation bien documenté implique le proto-oncogène c-abl. Ce gène fait partie du segment chromosomique remanié dans la translocation Philadelphia (9,22) (q34q11) spécifique des leucémies myélocytiques chroniques (De Klein et al., 1982) et est ainsi transféré du chromosome 9 vers le chromosome 22. Sur le chromosome 22, la translocation affecte toujours la même région BCR (pour Break point Cluster Region) (Groffen et al., 1984). Le rôle de ces deux séquences BCR et c-abl dans l'apparition de leucémies myéloïdes chroniques n'est pas connu mais Heisterkamp et al. (1985) proposent que le produit de BCR pourrait activer l'oncogène abl dans la protéine de fusion et lui octroyer une activité tyrosine kinase comme celle décrite pour le produit de



BU LILLE

Schéma 12 : Propriétés des cellules transformées par AEV-ES4 ou par des mutants v-erb A-

l'oncogène v-abl.

IV - COOPERATION D'ONCOGENES

Deux oncogènes activés peuvent intervenir au niveau de deux stades de l'évolution vers la formation de tumeur. Ainsi, l'oncogène N-ras activé cohabite avec des versions activées du gène myc dans une leucémie promyélocytaire ou un lymphome de Burkitt (Murray et al., 1983).

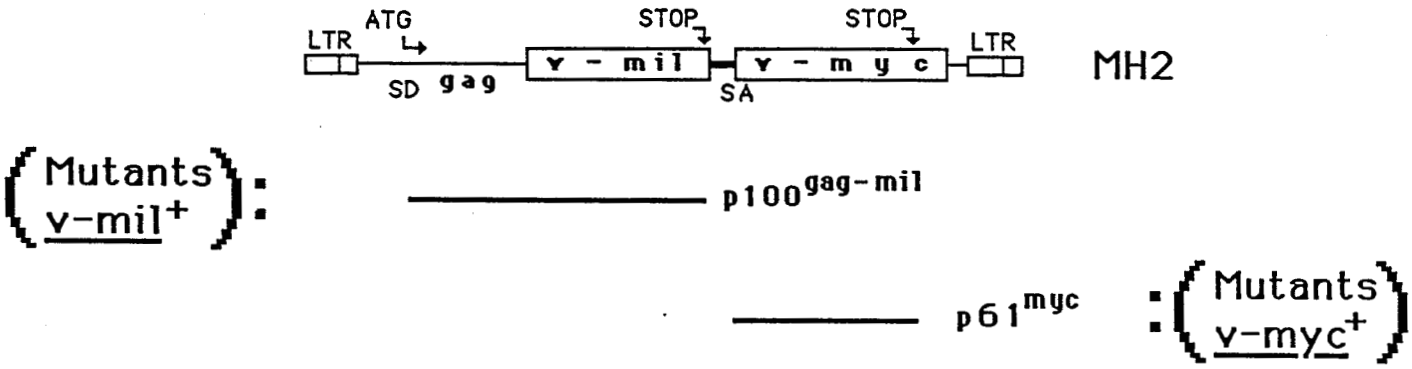
In vitro, Land et al. (1983) et Ruley, (1983) ont montré respectivement que la transformation de fibroblastes embryonnaires primaires ou de cellules épithéliales primaires pouvait apparaître en deux étapes. Des événements qui conduisent les cellules primaires à croître indéfiniment (immortalisation) pouvaient être séparés d'événements responsables de changements phénotypiques tels que la formation de colonies en agar ou la formation de tumeurs quand les cellules sont injectées à des animaux réceptifs. Le gène Ha-ras peut transformer toute une série de cellules en lignée mais est incapable individuellement de transformer certaines cellules embryonnaires de rats (REF). Par contre, si v-myc favorise l'établissement en culture des REF, l'oncogène ras est capable de les transformer. Ces résultats suggèrent que la transformation de la cellule nécessite des fonctions d'établissement et de transformation.

L'étude du mécanisme multi-étapes de la transformation des cellules hématopoïétiques est rendue difficile par des conditions de cultures inhabituelles et par le fait que ces cellules ne soient pas transfectables. Cependant, des virus leucémogènes (AEV-ES4, MH2 et E26) contenant dans leur génome deux oncogènes distincts se sont révélés être de bons modèles expérimentaux pour étudier la coopération d'oncogènes dans le processus de leucémogénisation.

A) Le virus AEV ES4 (v-erbA-v-erbB)

En injection intraveineuse, le virus AEV ES4 cause des leucémies érythroïdes chez le poulet ; en injection intramusculaire, des sarcomes au point d'injection. *In vitro*, il transforme les érythroblastes provenant de moëlle osseuse ainsi que des fibroblastes (Graf et Beug, 1983).

Son génome contient deux oncogènes v-erbA et v-erbB (Vennström et Bishop, 1982). Le produit de v-erbB est la version tronquée du récepteur de l'EGF et le produit de v-erbA est exprimé sous forme d'une protéine de fusion $P^{gag\text{-}erbA}$ qui est de manière prédominante nucléaire. v-erbB est nécessaire et suffisant pour transformer les érythroblastes et les fibroblastes. En effet des mutants v-erbA$^+$ v-erbB$^-$ perdent toute activité transformante, des mutants v-erb A$^-$ v-erb B$^+$ maintiennent leur pouvoir transformant à la fois sur les érythroblastes et sur les fibroblastes. Les cultures de cellules érythroïdes transformées par le virus AEV ES4 sont constituées exclusivement d'érythroblastes qui prolifèrent rapidement, indiquant que AEV ES4 induit les cellules à s'auto-renouveler et bloque leur capacité de différenciation (Graf et Beug 1983) (schéma 12). De plus , le virus AEV ES4 rend ces cellules indépendantes de l'érythropoïétine (Beug et al., 1982a, Samarut et Gazzolo, 1982) et des conditions de culture complexes qu'elles nécessitent normalement pour leur survie et leur différenciation. Par contre, les cellules érythroïdes infectées par un virus muté contenant uniquement v-erbB, sont toujours capables de se diviser indépendamment de



Système biologique / virus	FEP ou Macroph. Transformation	Macroph. transformés indépendance au cMGF	NR Prolifération	NR Transformation
MH2 (mil+, myc+)	+	+	+	+
mutants mil+	-	+	+	-
mutants myc+	+	-	-	-

BU LILLE

Schéma 13 : Propriétés biologiques de MH2 et des mutants mil+ ou myc+

l'érythropoïétine mais conservent leur capacité de différenciation (schéma 12) et leur dépendance aux conditions de cultures complexes (Frykberg et al., 1983). Ces résultats suggèrent que v-erbA permet le blocage strict de la différenciation des cellules érythroïdes et libère les érythroblastes transformés par v-erbB de leur dépendance vis à vis des conditions de culture.

B) v-erbA et les oncogènes sarcomatogènes leucémogènes

Les virus sarcomatogènes suivants, RSV (contenant l'oncogène v-src), FSV (v-fps), PRCII (v-fps), S13 (v-sea) et C11 (Ha-ras) peuvent également transformer les cellules érythroïdes *in vitro* et leur donner un phénotype très similaire à celui des érythroblastes transformés par l'oncogène v-erbB. Kahn et al. (1986) ont récemment démontré que l'introduction du gène v-erbA dans des érythroblastes transformés par les oncogènes v-src, v-fps, v-sea ou Ha-ras réduit leur capacité à se différencier et les rend indépendant des conditions de cultures. Les oncogènes v-erbA et v-src coopèrent également *in vivo* puisque des poulets infectés avec un virus contenant v-erbA et v-src développent principalement des érythroblastoses. L'oncogène v-erbA peut donc modifier le spectre principalement sarcomatogène de v-src vers un spectre largement leucémogène.

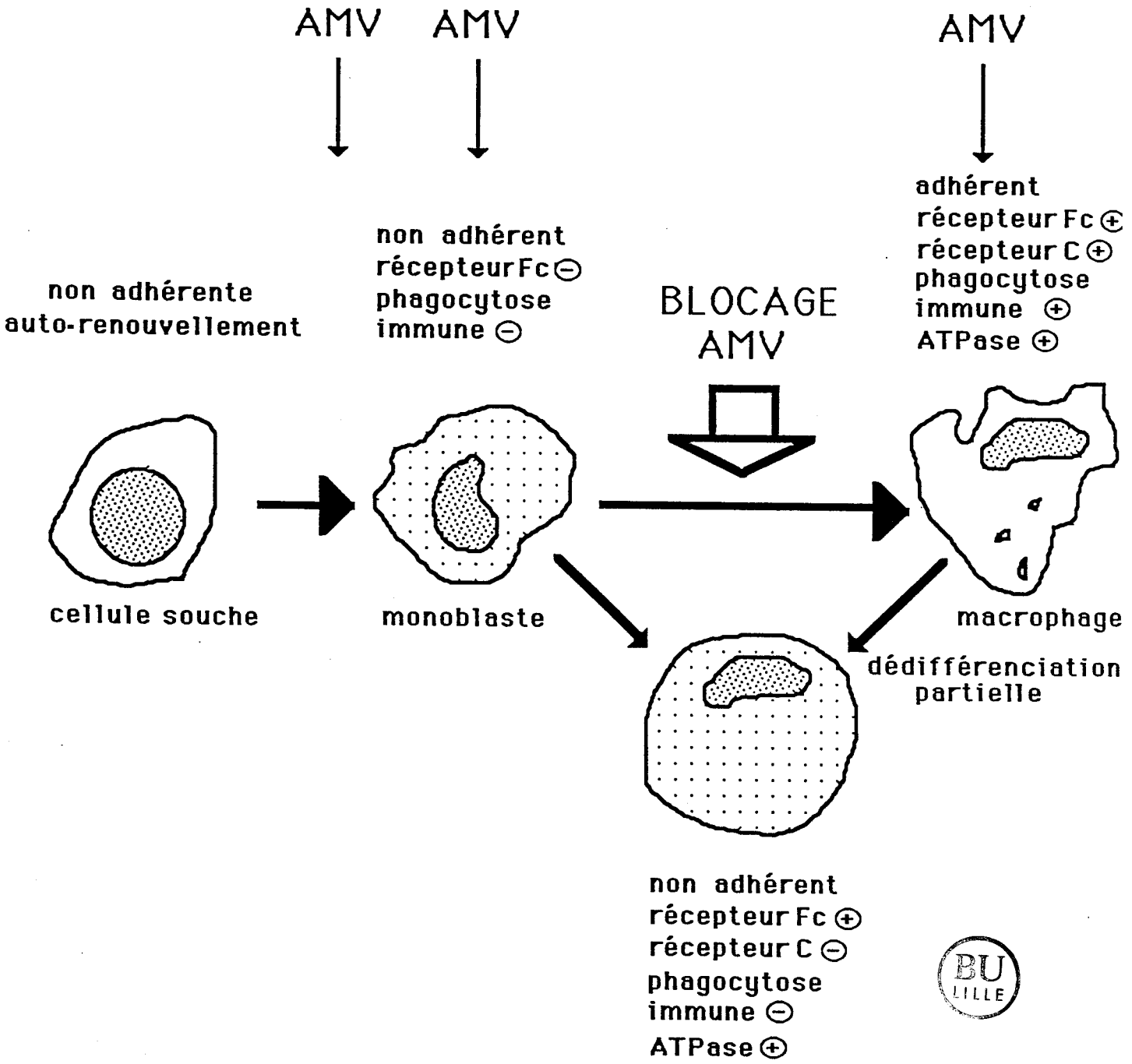
C) Le virus MH2 (v-mil, v-myc)

Le génome de MH2 contient l'oncogène v-myc trouvé également dans le génome des virus MC29, OK10, CMII (Roussel et al., 1979) et l'oncogène v-mil (Coll et al., 1983b) (schéma 13). Comme ces trois virus, le virus MH2 induit des carcinomes du foie et du rein et transforme les fibroblastes et les macrophages *in vitro*. Cependant la présence de l'oncogène v-mil au sein de son génome lui confère des propriétés biologiques particulières par rapport à celles des trois autres virus (schéma 13).

a) les macrophages transformés par les trois virus contenant uniquement v-myc ont besoin pour survivre d'un facteur de croissance le cMGF (facteur de croissance des cellules myéloïdes de poulet) alors que ceux transformés par MH2 poussent indépendamment de la présence de cMGF (Leutz et al., 1984 ; Graf et al., 1986). Les macrophages transformés par MH2 produisent du cMGF ou un facteur de croissance du même type (Graf et al., 1986). Ainsi l'oncogène v-mil qui ne peut à lui seul induire la transformation des macrophages permet aux macrophages transformés par l'oncogène v-myc de produire du cMGF qui stimule alors leur propre croissance.

b) La tumorigénicité du virus MH2 et celles de mutants de délétion dans v-mil et dans v-myc ont été comparées chez des poulets nouveaux nés. Les mutants v-myc $^-$ ne donnent ni tumeurs ni leucémies, les mutants v-mil $^-$ par rapport au MH2 sauvage, induisent beaucoup moins efficacement des tumeurs de foie ou des leucémies monocytaires (Graf et al., 1986).

c) Le virus MH2 présente des propriétés biologiques différentes de celles du virus MC29 sur des cultures de cellules de neurorétines d'embryons de poulet. Les cellules de neurorétines, normalement, ne se multiplient pas *in vitro*. L'infection par MH2 induit leur prolifération et les transforme, alors que l'infection par MC29 n'a aucun effet sur ces cellules. Des mutants de délétion de v-myc montrent que v-mil est suffisant pour induire la prolifération des



BU LILLE

Schéma 14 : Interférence de AMV dans la différenciation myéloïde in vitro

cellules de neurorétines mais il ne les conduit pas vers la transformation. Ainsi dans ce cas il semble que l'action préalable ou concommitante de l'oncogène v-mil soit nécessaire pour que l'oncogène v-myc transforme les cellules de neurorétines (Béchade et al., 1985).

V - SYSTEME EXPERIMENTAL

Les virus AMV et E26 ont été classés dans le groupe des rétrovirus myéloblastosants

A) Biologie des virus AMV et E26

1) Biologie du virus AMV

Chez le poulet, le virus AMV induit rapidement une leucémie que l'on peut classer comme leucémie monocytaire. Des expériences de densité, de vitesse de sédimentation, d'adhérence, d'activité phagocytique indiquent que les cellules cibles de AMV sont recrutées parmi des cellules aux différents stades de la lignée macrophagique, du progéniteur déjà engagé dans cette voie de différenciation au macrophage mature. Les cellules transformées par AMV peuvent être maintenues en culture pendant une longue période de temps. Elles peuvent être obtenues soit à partir de colonies provenant de moëlle osseuse ou de cellules de sac vittelin, soit à partir de cultures de macrophages, soit à partir du sang de poulets leucémiques. Quelle que soit leur origine, ces cellules sont morphologiquement identiques et présentent les mêmes propriétés fonctionnelles ainsi que les mêmes antigènes de surface. Ces cellules sont généralement non adhérentes et rondes, avec un noyau large, excentré entouré d'une couronne de cytoplasme contenant de petits granules.

Certains marqueurs spécifiques de la lignée macrophagique sont exprimés à la surface de ces cellules (Gazzolo et al., 1979 ; Beug et al., 1979 ; Durban et Boettiger, 1981) (schéma 14). On trouve à leur surface des ATPases, de hauts taux d'antigènes spécifiques des myéloblastes et quelques antigènes spécifiques des macrophages. Elles expriment les récepteurs pour la partie Fc des immunoglobulines mais pas les récepteurs du composant C3 du complément (ces deux récepteurs sont présents à la surface des macrophages normaux). Les récepteurs Fc ne sont pas fonctionnels puisque le mécanisme de phagocytose immune qu'ils modulent n'existe pas. Par contre, les cellules transformées par AMV sont capables de phagocytose aspécifique puisqu'elles ingèrent des particules de latex. Enfin, quand elles sont traitées au TPA, elles adhèrent à la surface de la boîte de culture et se différencient en macrophages (Pessano et al., 1979). Ainsi bien que les cellules cibles du virus AMV puissent être recrutées à tous les niveaux de la lignée monocytaire, AMV les bloque à un stade de différenciation intermédiaire entre le monoblaste et le macrophage : les cellules cibles de AMV recrutées aux stades précoces de la lignée macrophagique se différencieront jusqu'au stade prémacrophagique pour être transformées. Par contre les macrophages infectés par AMV subiront une dédifférenciation partielle, les renvoyant au stade prémacrophage (schéma 14).

2) Biologie du virus E26

Chez le poulet, E26 induit des leucémies en trois à cinq semaines. Ces leucémies sont caractérisées par la présence de larges cellules basophiles contenant un gros noyau rond et par l'augmentation du nombre de cellules de type réticulocyte plus ou moins différenciées (Radke et al., 1982). Une forte proportion (95 %) de cellules sanguines des animaux infectés par E26 synthétisent de l'hémoglobine, réagissent avec les anticorps anti-histone H5 et possèdent des antigènes spécifiques des érythroblastes. Par contre une petite proportion de cellules présente des ATPases de surface ou des antigènes spécifiques des myéloblastes. Ainsi E26 induit une leucémie mixte érythroïde et myéloïde à prédominance érythroïde (Moscovici et al., 1981 ; Radke et al., 1982).

a) les cellules leucémiques transformées par le virus E26 requièrent différentes conditions de culture pour leur croissance

Les cellules sanguines des animaux leucémiques infectés par E26 ou les cellules de moëlle en culture infectées par E26 sont cultivées *in vitro* soit en milieu CFU-M (Myeloid Colony Forming Unit) soit en milieu CFU-E (Erythroid Colony Forming Unit). Le milieu CFU-M est un milieu de croissance complémenté avec le surnageant de cellules de rates stimulées à la concanavaline A. Ce milieu permet la formation de colonies de cellules normales de type macrophage mais ne permet pas la croissance de précurseurs érythroïdes. Les cellules de rates traitées à la concanavaline A produisent un facteur (cMGF) qui stimule la croissance des cellules myéloïdes normales ou transformées (Beug et al., 1982b). Le milieu CFU-E est un milieu de croissance complémenté avec du sérum de poulet anémique comme source d'érythropoïétine. Ce milieu permet la survie et la différenciation des cellules progénitrices de type érythroïde (Samarut et Bouabdelli, 1980).

b) le virus E26 agit au niveau de deux voies de différenciation hématopoïétiques

Des cellules érythroïdes ou myéloïdes peuvent être propagées sélectivement à partir des cellules leucémiques mises en culture en présence de milieu respectivement CFU-E ou CFU-M (Moscovici et al., 1983 ; Radke et al., 1982). *In vitro*, les cultures de moëlle infectées par E26 et ensemencées dans un milieu CFU-M semi-solide bourgeonnent en colonies myéloïdes. En milieu CFU-E semi-solide, elles bourgeonnent en colonies érythroïdes (Radke et al., 1982) (schéma 15).

c) caractérisation des cellules cibles de E26 chez l'embryon de poulet

Les cellules de blastoderme aux stades de développement "ligne primitive" ou "12 somites" ont été infectées par E26. Les cellules infectées au stade "ligne primitive" développent quelque soit le milieu (CFU-E ou CFU-M) des colonies hétérogènes, différentes des colonies érythroïdes ou myéloïdes obtenues à partir de cellules de moëlle osseuse infectées. La morphologie de la colonie diffère d'une colonie à l'autre. Certaines des colonies obtenues sur milieu CFU-E sont hémoglobinisées. Les colonies hétérogènes réensemencées en milieu CFU-E ou CFU-M donnent 60 % de colonies érythroïdes ou myéloïdes et 40 % de colonies mixtes constituées d'un mélange de

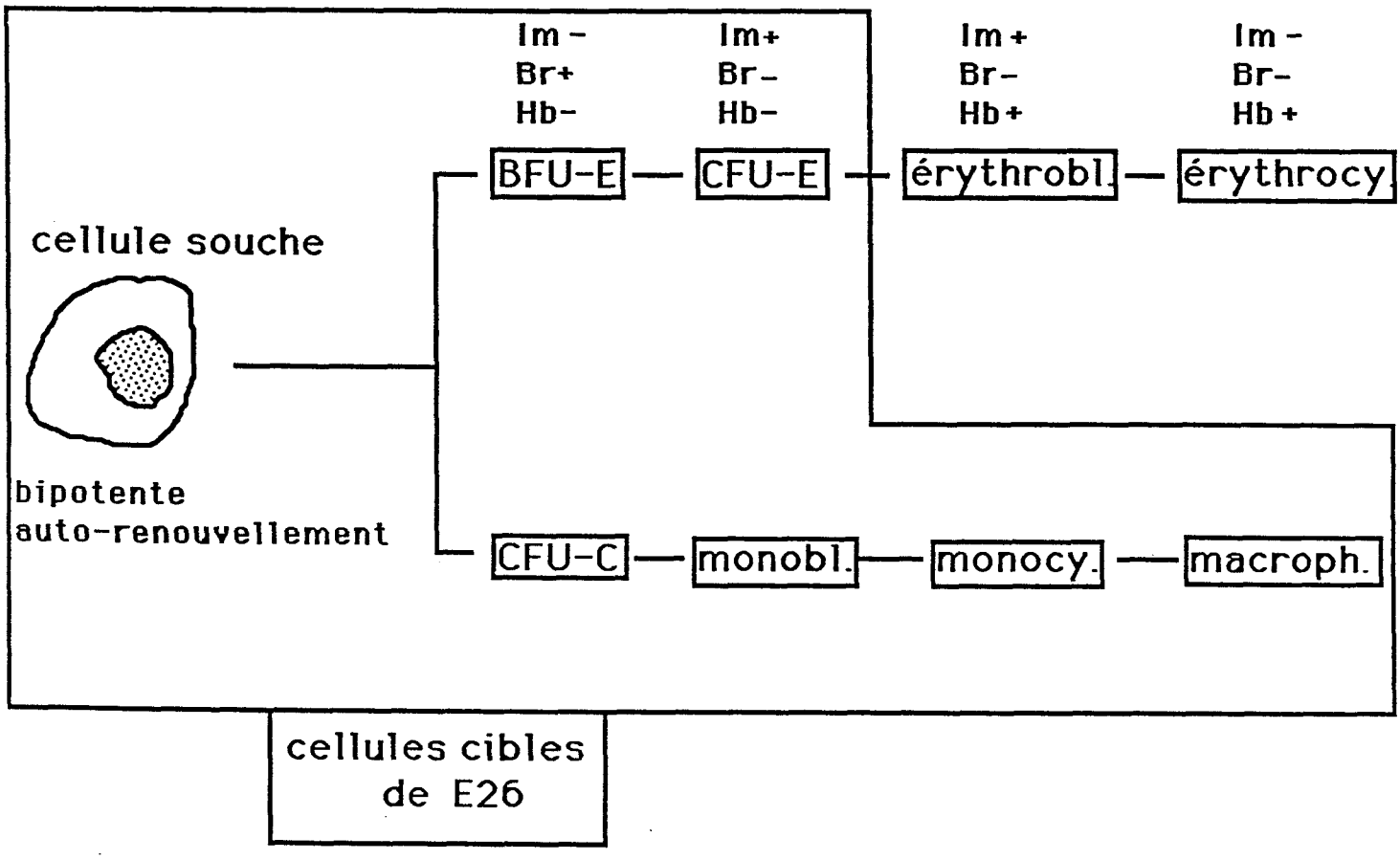


Schéma 15 : Interférence de E26 dans deux voies de différenciation hématopoïétiques

BU LILLE

cellules immatures myéloïdes et érythroïdes. Ces colonies mixtes peuvent être maintenues en culture plusieurs semaines en utilisant différents régimes de culture. Ces résultats suggèrent que E26 peut infecter et transformer une cellule souche bipotente ainsi que des cellules précurseurs érythroïdes ou myéloïdes. Les cellules au stade "12 somites" infectées par E26, cultivées en milieu sélectif CFU-E ou CFU-M développent des colonies érythroïdes ou myéloïdes et un petit nombre de colonies mixtes.

L'identification des cellules cibles de E26 a été rendue possible grâce à l'obtention de deux antiséra, l'un dirigé contre des antigènes de cerveau (anti Br) l'autre dirigé contre des antigènes de maturation (Im) (Gazzolo et al., 1980) caractérisant respectivement les cellules progénitrices érythroïdes BFU-E et CFU-E. Ainsi les colonnies érythroïdes, obtenues à partir des cellules infectées au stade "12 somites" expriment un taux d'antigène Br plus faible que celui des BFU-E et un taux d'antigènes Im identique à celui des CFU-E suggèrant que les cellules cibles de E26 sont des cellules à un stade de développement intermédiaire entre les cellules BFU-E et CFU-E. Les colonies hétérogènes obtenues à partir des mêmes cellules infectées au stade "12 somites" sont constituées de cellules ne possèdant ni les antigènes Br ni les antigènes Im et d'un mélange de cellules érythroïdes et myéloïdes. Ceci suggère que ces colonies hétérogènes sont le résultat de la transformation d'une cellule souche bipotente.

Les cellules myéloïdes transformées par E26 se situent à un stade plus immature que les cellules transformées par AMV. En effet l'infection par AMV de cellules aux stades "ligne primitive" ou "12 somites" n'a que peu d'incidence sur ces cellules embryonnaires.

d) blocage de la différenciation par le virus E26

Les colonies érythroïdes obtenues à partir de cellules de moëlle infectées par E26 sont principalement constituées d'érythroblastes mais on peut également trouver des cellules érythroïdes plus matures indiquant que le virus E26 ne bloque pas de façon stricte la différenciation de ces cellules .

Les myéloblastes transformés par le virus AMV peuvent être induits à se différencier de façon très efficace par traitement au TPA, les myéloblastes transformés par E26 ne peuvent pas l'être. Ceci suggère que le virus E26 bloque la différenciation des cellules myéloïdes de façon plus rigide que le virus AMV.

e) les myéloblastes transformés par le virus E26 ont besoin de cMGF pour leur croissance

Les myéloblastes transformés par E26 ont besoin de facteur de croissance cMGF pour proliférer *in vitro*. Les oncogènes viraux de la famille src (présentant une activité kinase) sont capables d'induire ces myéloblastes à produire de façon autocrine un facteur de croissance de type cMGF et à s'auto-stimuler (Adkin et al., 1984). En effet , des myéloblastes transformés par E26 puis surinfectés par des rétrovirus ayant transduits des oncogènes présentant des homologies avec la famille src, poussent indépendamment de la présence de cMGF. Le milieu conditionné par ces myéloblastes contient une activité de stimulation de croissance similaire au cMGF. Cette activité est réduite de plus de 80 % quand le milieu conditionné est adsorbé contre un antisérum anti cMGF. Enfin, les cellules E26 surinfectées, incubées en présence de la fraction Ig G de l'anti cMGF ne

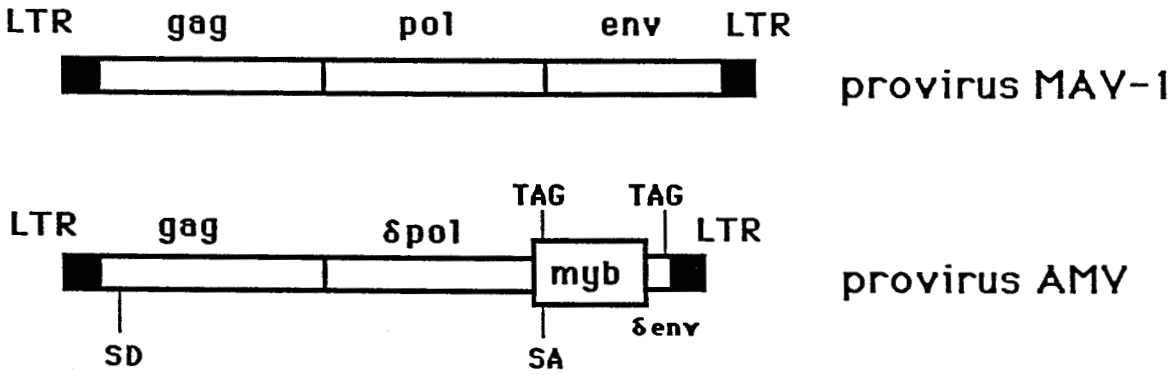


Schéma 16 : Structure du provirus AMV

SA - site donneur d'épissure
SD - site accepteur d'épissure
TAG - codon de fin de lecture

BU LILLE

proliférent plus, suggèrant que les cellules sont dépendantes de la secrétion de cMGF.

f) Les mutants E26 thermosensibles pour leur capacité à transformer les cellules myéloides.

Quatre mutants thermosensibles pour la transformation des myéloblastes (ts E26) ont été isolés récemment (Beug et al., 1984). A température permissive, les cellules myéloïdes transformées par les ts E26 ressemblent aux cellules myéloïdes transformées par le virus E26 sauvage et prolifèrent rapidement en présence de cMGF. Cultivées à 42°C, elles arrêtent de proliférer et acquièrent plusieurs caractères des macrophages (adhérence, taille plus importante, larges vacuoles et inclusions cytoplasmiques, petit noyau excentré) et également la capacité de phagocyter des bactéries. Cependant certains antigènes spécifiques des macrophages ne sont pas exprimés suggèrant que ces cellules ne sont pas terminalement différenciées. Après quatre jours de culture à 42° et trois jours de traitement au TPA, elles prennent une morphologie de macrophage et expriment tous les marqueurs antigéniques macrophagiques. Les myéloblastes transformés par les ts E26 se différencient et arrêtent leur prolifération même en présence de cMGF. Cependant, ils produisent un facteur de croissance de type cMGF.

Enfin les mutants thermosensibles de E26 restent leucémogènes et maintiennent leur capacité à transformer les érythroblastes à température non permissive. Ainsi les érythroblastes transformés par les ts E26 isolés à 37°C et cultivés ensuite à 42°C, présentent les mêmes caractéristiques que les érythroblastes transformés par le virus E26 sauvage à 42°C.

B) Le virus AMV : caractérisation de son génome et de la séquence v-myb qu'il contient.

1) Structure du génome du virus AMV

AMV est le fruit d'une recombinaison entre son virus helper naturel MAV-1 et une séquence d'origine cellulaire v-myb (Roussel et al., 1979). En 5', cette recombinaison s'est faite 111 nt en amont du codon de fin de lecture du gène pol de MAV. La disparition de la région 3' du gène pol pourrait expliquer pourquoi la protéine $P^{gag-pol}$ n'est pas maturée et ne produit pas de rétrotranscriptase fonctionnelle (Duesberg et al, 1980). En 3', la recombinaison s'est effectueé 33 nt en amont du codon de terminaison du gène env (schéma 16). La majeure partie du gène env est donc absente dans le génome du virus AMV.

2) L'oncogène v-myb

L'oncogène v-myb peut être divisé en sept régions, notées de E1 à E7 de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3', homologues à sept régions du gène cellulaire c-myb (schéma 17). Le cadre de lecture utilisé dans le virus AMV pour l'expression de v-myb est le même que celui utilisé pour l'expression du gène c-myb. Les régions E2, E3, E4, E5, E6 représentent six vrais exons de c-myb raboutés par épissure correcte des séquences introniques cellulaires (immédiatement en 5' et 3' de ces séquences codantes colinéaires à l'oncogène viral se trouvent les sites d'épissures classiques observés dans la cellule eucaryote (Mount, 1982)). La région E1 correspond à un exon cellulaire

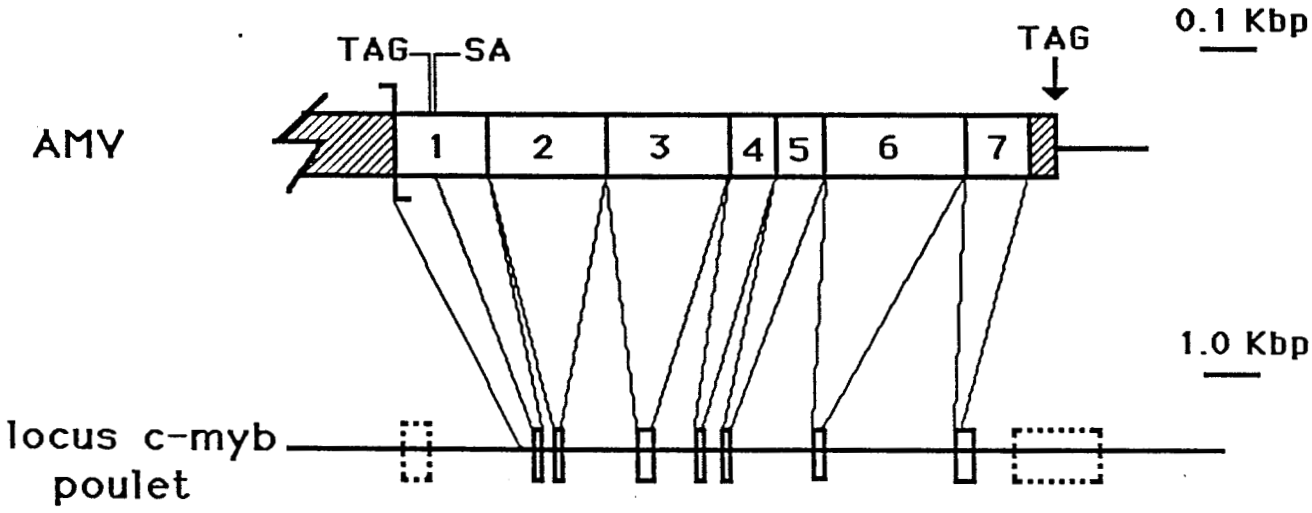


Schéma 17 : Portion de c-myb transduite dans AMV

Séquences pol et env
SA - site accepteur d'épissure
TAG - codon de fin de lecture
1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 - séquences E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7 du gène c-myb

BU LILLE

complet, flanqué en 5' d'une région intronique. Cette région présente deux intêrets. Elle fournit d'une part le site accepteur d'épissure qui, avec le site donneur situé dix-huit nucléotides en aval du début du gène gag permet la formation de l'ARN sous génomique v-myb de 2.1 kb. Ainsi le codon d'initiation, les six premiers acides aminés de gag et les séquences v-myb sont joints en phase et permettent l'expression de la protéine $P45^{v\text{-}myb}$ (Klempnauer et al., 1983) observée dans les cellules infectées par AMV. E1 fournit d'autre part le codon de fin de lecture de la protéine virale $P180^{gag\text{-}pol}$. En effet v-myb présente un cadre de lecture continu avec les gènes gag et pol et interrompu par un site terminateur situé 84 nt en aval du point de recombinaison. Ainsi, l'oncogène v-myb fournit les 27 derniers acides aminés de la protéine $P180^{gag\text{-}pol}$. La région E7 correspond à un exon cellulaire tronqué dans sa partie 3'. En effet le cadre de lecture ouvert du gène c-myb se prolonge au delà de l'extrémité 3' de la région virale E7. Dans le virus, E7 est lu en phase avec les onze derniers codons du gène env qui apporte le codon de fin de traduction (UAG) de la protéine $P45^{v\text{-}myb}$.

En conclusion $P45^{v\text{-}myb}$ contient à son extrémité 5', six acides aminés du produit gag, à son extrémité 3', onze acides aminés du produit env. La région v-myb de P45 (E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7) est une version tronquée de la $P75^{c\text{-}myb}$. De plus la comparaison des séquences v-myb et c-myb homologues met en évidence onze acides aminés différents dans ces régions.

3) Structure des homologues c-myb chez le poulet, la souris, l'homme et la drosophile.

Les fragments d'ADN complémentaires ou cDNA des ARN myb de poulet, de souris ainsi qu'une portion du cDNA humain ont été isolés et séquencés. Le cDNA myb chez le poulet possède un cadre de lecture ouvert qui s'étend sur 699 acides aminés et qui peut coder pour un polypeptide de poids moléculaire 77 kd en accord avec la taille présumée de la protéine c-myb P75 (Rosson et Reddy, 1986). Le cDNA myb de souris contient un cadre de lecture ouvert de 648 acides aminés et pourrait coder pour une protéine de 71 kd (Gonda et al., 1985). Enfin, la portion du cDNA myb humain sequencée ne recouvre pas toute la séquence codante du gène c-myb humain mais laisse présumer l'existence d'un cadre de lecture codant pour une protéine de plus de 65 kd (Slamon et al., 1986a).

Ces trois types de cDNA sont très homologues les uns aux autres : 85 % des résidus sont conservés du poulet à l'homme et 90 % de la souris à l'homme. Les régions d'homologie importante se situent d'une part au niveau d'une région correspondant aux exons E1 et E2 du génome c-myb de poulet (il y a 100 % d'homologie entre les cDNA humain et aviaire, et 1 seul acide aminé différent dans le cDNA murin), d'autre part au niveau de l'exon E5 (97 % d'homologie entre les cDNA humain et aviaire).

L'analyse de la séquence codante contenue dans ces trois types de cDNA révèle la présence dans le domaine aminoterminal de ces molécules aviaires, murines et humaines de trois séquences de 52 résidus relativement répétés (la première présente en amont de E1, les deux suivantes dans les régions E1 et E2).

Un gène homologue au proto-oncogène c-myb a également été identifié chez la drosophile (Katzen et al., 1985). La portion de gène séquencée présente de fortes homologies de séquence avec le gène c-myb de poulet. Cette homologie se situe également au niveau des régions

E1 et E2 déjà conservée chez les vertébrés. Ainsi, comme le gène v-myb, le gène c-myb de drosophile a conservé deux des trois séquences répétées décrites précédemment.

4) Expression du gène c-myb

Les gènes c-myb sont généralement exprimés sous forme d'un ARN de 4.0 kb. Deux communications récentes suggèrent que c-myb pourrait avoir deux fonctions : une fonction générale dans la prolifération cellulaire et une fonction spécifique dans la différenciation thymique. Différentes expériences suggéraient que c-myb était exprimé spécifiquement dans les tissus hématopoïétiques et tout particulièrement dans les cellules immatures (Gonda et al., 1982 ; Coll et al., 1983a ; Sheiness et Gardinier, 1984 ; Gonda et Metcalf, 1984). Or Thompson et al. (1986) montrent que c-myb est exprimé pendant la prolifération de fibroblastes embryonnaires de poulet (CEF), de cellules lymphoïdes de type T, MSB1 et de cellules B provenant de la bourse de Fabricius. Ainsi, le fait que c-myb ait été jusqu'ici décrit comme étant exprimé spécifiquement dans les cellules hématopoïétiques immatures et pas dans les cellules matures pourrait être dû au fait que les cellules qui se différencient ne prolifèrent pas. La baisse de l'expression de c-myb dans les cellules se différenciant refléterait donc une diminution de la prolifération de ces cellules.

La relation précise entre les étapes du cycle cellulaire et les variations de l'expression de c-myb est difficile à déterminer et semble dépendre du type de cellules que l'on considère et du traitement qu'on leur fait subir : les cellules MSB1 en phase exponentielle de croissance expriment un taux maximum de c-myb lorsqu'elles sont en phase S, les CEF quiescentes, cultivées en présence de sérum commencent à exprimer c-myb en fin de phase G1 et le maintiennent à un maximum d'expression tout au long de la phase S, par contre les cellules T, synchronisées, rendues compétentes par des esters de phorbol puis stimulées par traitement à l'interleukine 2 (IL2) expriment c-myb uniquement durant la phase de progression en G1 (taux maximal environ 5 h après exposition des cellules à l'IL2) (Stern et al., 1986). Au regard de ces différentes observations, il semble que l'augmentation du taux d'ARN myb intervienne juste avant des changements dans la morphologie et le contenu en ARN de la cellule.

Les variations des taux d'ARN c-myb durant la prolifération cellulaire semblent être principalement le résultat d'un contrôle post-transcriptionnel. En effet, le taux de transcription du gène c-myb, mesuré au niveau du noyau ne varie pas ou très peu entre les cellules CEF ou MSB1 quiescentes ou en phase exponentielle de croissance. Par contre, l'augmentation du taux d'ARN myb peut être induite par traitement de ces cellules à la cycloheximide (inhibiteur de la synthèse protéique). Il se pourrait donc que dans les cellules quiescentes stimulées par la présence de sérum, la stabilité des ARN myb augmente (Thompson et al., 1986).

L'expression du c-myb est importante dans les thymocytes immatures et diminue lorsque les cellules T se différencient *in vivo* (Sheiness et Gardinier, 1984). Cette diminution est toujours à corréler avec le fait que les cellules qui se différencient ne prolifèrent pas. Néanmoins, le taux d'ARN myb dans le thymus est au moins dix fois plus important que celui observé dans les autres organes lymphoïdes. Il est de plus peu sensible à la cycloheximide et pourrait être régulé au niveau transcriptionnel. Il est possible que le gène c-myb contienne un élément activateur qui réponde à des facteurs de régulation spécifiques du thymus.

5) Les produits myb.

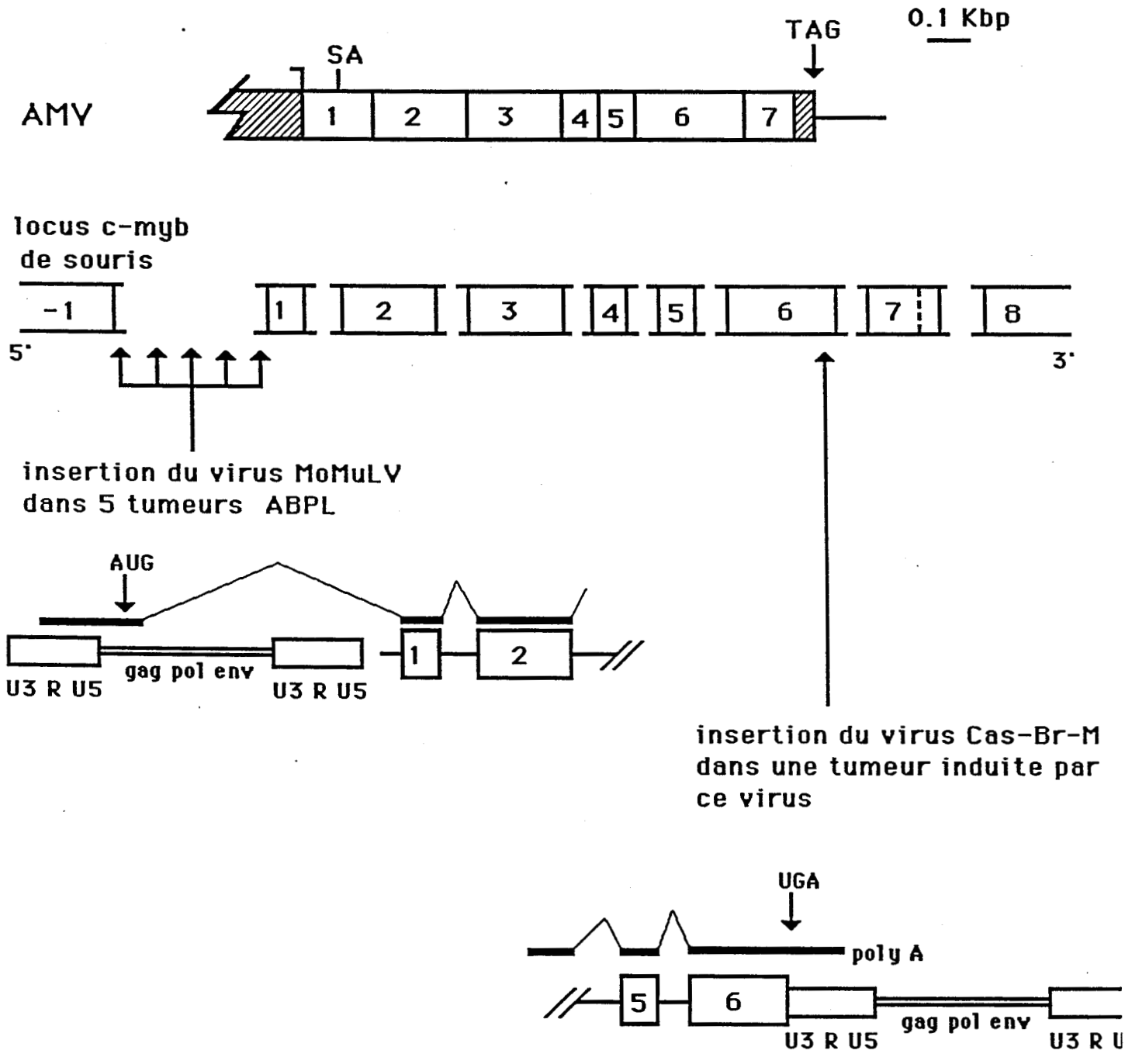
L'oncogène v-myb code pour une protéine de 45 kd $P45^{v\text{-}myb}$ (Souza et al., 1980 ; Gonda et al., 1981 ; Klempnauer et al., 1982, 1983 ; Rushlow et al., 1982 ; Boyle et al., 1983). Cette protéine est une version tronquée de la protéine $P75^{c\text{-}myb}$ trouvée dans les cellules aviaires exprimant le gène c-myb (Klempnauer et al., 1983). Le produit du gène c-myb humain a été récemment identifié comme une protéine de 80 kd $P80^{c\text{-}myb}$.

L'examen de la séquence en acide aminés de la protéine c-myb murine permet de prédire différentes caractéristiques structurales et propriétés de cette protéine (Gonda et al., 1985). La protéine myb présente une région basique d'environ 200 résidus proches de son extrémité aminoterminale. Le reste de la molécule montre une distribution équilibrée entre résidus acides et basiques. La méthode de Garnier et al (1978) qui prédit la structure secondaire des protéines suggère que 46 % de la protéine peuvent être constitués d'hélice α , que la protéine présenterait peu de feuillets β et qu'elle pourrait donc être globulaire. Ces propriétés, vu la forte homologie de séquence entre les différents produits myb, peuvent être extrapolées aux autres protéines myb.

$P45^{v\text{-}myb}$, $P75^{c\text{-}myb}$ et $P80^{c\text{-}myb}$ partagent plusieurs propriétés : i) elles sont toutes trois capables de fixer l'ADN ; ii) elles sont localisées dans le noyau ; iii) leurs localisations subnucléaires sont identiques : 80 à 90 % des protéines myb sont associées à la chromatine, une petite portion reste associée à la matrice nucléaire (Klempnauer et Sippel, 1986 ; Klempnauer et al., 1986a). La taille de cette fraction augmente de façon importante quand les noyaux sont digérés à 37°C par une nucléase (Klempnauer et Sippel, 1986). Cette association à la matrice nucléaire inductible par la température semble être une propriété des protéines nucléaires (Evan et Hancock, 1985) ; iv) les protéines myb ont une demie vie d'environ une heure en accord avec leur rôle putatif de régulation dans le noyau. Cela semble être encore une caractéristique des produits d'oncogènes localisés dans le noyau (Hann et Eisenman, 1984 ; Reich et al., 1983).

La partie aminoterminale, très conservée entre les protéines myb virale ou cellulaire, est probablement impliquée dans le mécanisme de fixation des protéines myb à l'ADN. Deux résultats vont dans ce sens (Klempnauer et al., 1986b) : i) les protéines $P45^{v\text{-}myb}$, $P75^{c\text{-}myb}$, $P80^{c\text{-}myb}$ possèdent en commun au moins deux sites antigéniques situés dans le domaine aminoterminal de $P45^{v\text{-}myb}$. Or des anticorps monoclonaux dirigés contre l'un de ces épitopes inhibent la fixation des protéines myb à l'ADN ii) la protéine v-myb exprimée dans un système bactérien est capable de fixer l'ADN. Par contre des protéines v-myb bactériennes amputées dans leur domaine aminoterminal ne fixent plus l'ADN.

Dans des myéloblastes transformés par AMV, des expériences d'immunofluorescence ont montré que P45 est localisée en majeure partie dans le noyau, mais une petite fraction est également détectée dans la région périnucléaire du cytoplasme (Klempnauer et al., 1984). Ces myéloblastes cultivés en présence de lipopolysaccharides se différencient partiellement pour donner des cellules qui prolifèrent mais qui sont fixées au substratum (Klempnauer et al., 1984). Dans ces cellules, la répartition de la fluorescence est la même que celle obtenue dans les myéloblastes. Enfin en présence de TPA, ces cellules se différencient, acquièrent la morphologie de cellules proches des



BU LILLE

Schéma 18 : Activation de c-myb par insertion virale

macrophages, et la majeure partie de la fluorescence se retrouve dans la région périnucléaire cytoplasmique. Ceci suggère que la redistribution de la protéine P45 dans la cellule est liée à la réversion du phénotype transformé.

C) L'oncogène c-myb et les cancers.

1) LTR activation du gène c-myb

Shen-Ong et al. ont reporté que le gène c-myb pouvait être activé par insertion virale dans toute une série de tumeurs induites par le virus Abelson et identifiées comme des lymphosarcomes plasmocytoïdes (ABPL) (Shen-Ong et al., 1984 ; Shen-Ong et al., 1986). Dans six cas de tumeurs, le virus leucémogène murin Moloney (MoMuLV) s'est inséré, dans la même orientation transcriptionnelle, en amont de l'exon c-myb E1 (premier exon homologue à v-myb). Cette insertion dans le locus c-myb s'accompagne d'une expression de formes altérées des ARN myb. Les ARN de cinq des six tumeurs contiennent un (ou des) transcrit(s) myb qui ont été initiés dans le LTR 5' du provirus intégré et épissés grâce à un site donneur d'épissure contenu dans la région gag de MoMuLV et un site accepteur dans l'exon E1. Ainsi, l'insertion du provirus dans ces tumeurs de souris résulte dans la synthèse d'une protéine myb qui est amputée de la même région aminoterminale que la protéine v-myb (schéma 18). Contrairement à la plupart des transcrits de fusion gag onc, les séquences gag et myb dans l'ARN hybride de ces tumeurs ne sont pas dans le même cadre de lecture. Les auteurs postulent que la synthèse de la protéine serait initiée, sur l'ARN hybride, au site d'initiation proposé pour l'expression de la protéine gag et la portion myb traduite grâce à un changement de cadre de lecture.

Un second mécanisme d'amputation du gène c-myb par insertion virale a été décrit dans des cellules NFS60 dépendante d'interleukine 3 (lignée établie à partir de tumeurs induites par le virus leucémogène murin Cas Br Moloney). Dans ce cas, l'insertion virale s'est faite, suivant l'orientation transcriptionnelle 5' 3', au niveau de l'exon E6, exactement 103 nucléotides en aval de la fin des séquences myb homologues au v-myb de E26 (voir Résultats). Le LTR 5' du provirus intégré fournit un codon de terminaison ; les 240 derniers acides aminés de c-myb ne sont donc pas présents dans la portion carboxyterminale des proteines myb tumorales (schéma 18).

On peut remarquer que les sites d'insertions semblent groupés dans des régions identiques à celles impliquées dans la transduction de myb dans AMV ou E26. Ceci suggère que l'amputation des protéines normales c-myb plutôt que les variations dans leur expression pourrait jouer un rôle dans la formation de tumeurs de type ABPL.

2)Amplification du gène c-myb dans certains cancers

Le locus c-myb est amplifié dans l'ADN de cellules de deux lignées (Colo 201 et Colo 205) provenant d'un adénocarcinome de colon humain (Alitalo et al, 1983). L'ADN amplifié ne semble pas révéler d'anomalies topographiques dans le gène c-myb et n'est pas porté par des chromosomes dmins ou des régions HSR. Cette amplification au niveau de l'ADN s'accompagne d'une production abondante d'ARN myb.

3) Expression accrue du gènes c-myb dans des désordres lymphoïdes

Chez la souris, un gène récessif 1pr, induit la production d'anticorps autoimmuns et la prolifération massive de lymphocytes. Les cellules T anormales s'accumulent dans la rate et dans les nodules lymphoïdes périphériques et mésentériques. Ainsi, les organes lymphoïdes de ces souris 1pr/1pr contiennent des cellules qui expriment beaucoup d'ARNmyb. Un désordre similaire dans la prolifération lymphoïde a été décrit chez l'homme, ce désordre s'accompagne également d'une forte expression de c-myb (Mountz et al., 1984).

4) Altération du gène c-myb par délétion

L'analyse de 176 types d'ADN provenant de tumeurs et tissus normaux a révélé, par digestion de l'ADN par l'endonucléase EcoRI, qu'il existe un polymorphisme du gène c-myb (Yokota et al., 1986). Dans 35 paires d'ADN (ADN normal/ADN tumoral), il y a hétérozygotie au niveau du c-myb, dans 37 paires, homozygotie. Dans quatre paires d'hétérozygotes, les intensités de bandes relatives au polymorphisme sont plus faibles dans l'ADN tumoral que dans l'ADN normal, suggèrant la perte d'un allèle dans ces tumeurs. Cette perte pourrait conduire à l'expression d'une mutation récessive sur l'autre allèle ou pourrait s'accompagner de la perte de gènes de régulation proches du gène v-myb. Cette délétion semble plus fréquente dans les sarcomes et carcinomes que dans les autres tumeurs. Elle a, de plus, été observée dans une tumeur métastasique alors qu'elle n'apparaissait pas dans le tissu normal ou la tumeur primaire, laissant ainsi supposer que l'un des allèle du gène c-myb ou d'un gène voisin pourrait servir de verrou à la progression de tumeur ou à l'apparition de métastases et que sa disparition leverait ce verrou.

D)Le virus E26

1) La protéine virale de E26

Les cellules transformées par E26 synthétisent une protéine virale de 135 kd P135. Cette protéine réside principalement dans le noyau (Klempnauer et al., 1984). Les protéines thermosensibles P135 dans les cellules infectées par les tsE26, à température permissive ou non, sont également localisées dans le noyau (Moelling et al., 1985). P135, comme les protéines myb fixe l'ADN double brin *in vitro*. Par contre trois des quatre mutants thermosensibles de E26 codent pour une protéine mutante qui, soit a perdu sa capacité à fixer l'ADN *in vitro* après purification, soit présente des interactions ADN-protéine très thermolabiles.

2) Présentation du travail

Notre intérêt pour le virus E26 est né de deux observations.

- La première concernait des travaux préliminaires effectués au laboratoire. Ces travaux mettaient en évidence la présence d'une séquence X d'origine inconnue dans le génome de E26 : en effet par des expériences d'hybridation en phase liquide la complexité du génome de E26 avait été estimée à 6200 bp avec 650 bp de gène gag, 1430 bp de gène v-myb, 1400 bp de gène env et environ 1900 bp de séquence X (Roussel et al., 1979).
- La seconde concernait les propriétés biologiques de E26 par rapport à celles d'AMV. Celui-ci qui contient l'oncogène myb transforme les cellules myéloïdes, alors que E26 qui contient v-myb et une séquence X transforme les cellules myéloïdes et érythroïdes. De plus des mutants thermosensibles pour la transformation myéloïde ont été isolés suggèrant que les deux actions sur les lignées myéloïdes et érythroïdes pouvaient être dissociées.

Ces observations laissaient suggèrer que l'on pouvait imputer à la séquence X, le pouvoir transformant de E26 sur les cellules érythroïdes. Nous avons donc entrepris l'isolement et la caractérisation de cette séquence spécifique du virus E26. Une fois isolée, cette séquence s'est révélée être un nouvel oncogène que nous avons appelé v-ets. Nous avons ensuite cherché à caractériser l'homologue cellulaire c-ets et son produit.

RESULTATS, DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS.

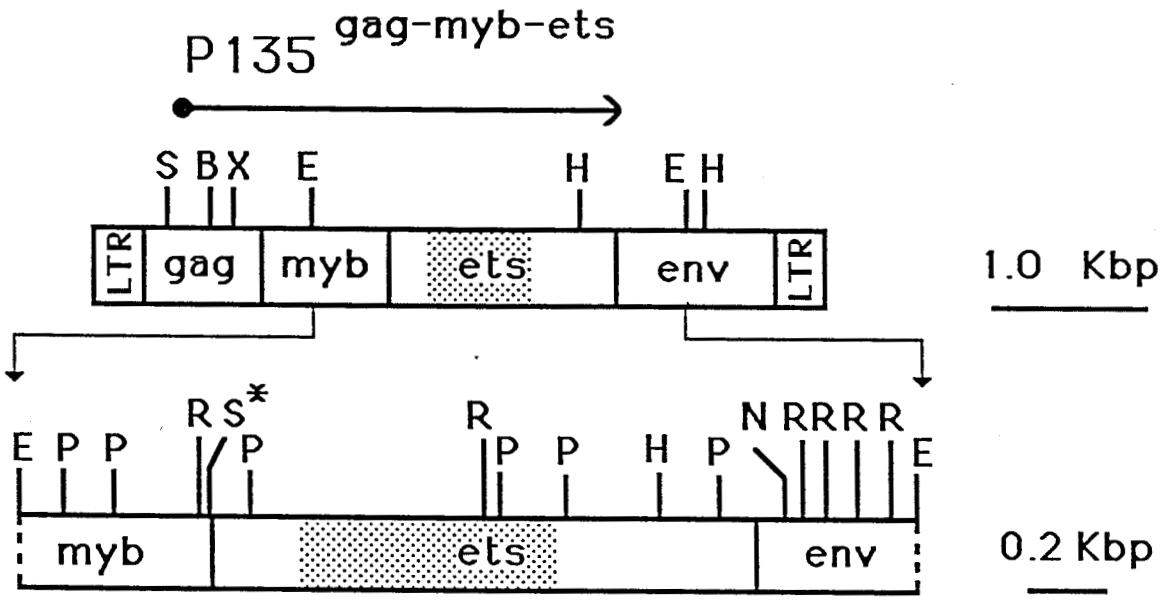


Schéma 19 : Structure du provirus E26

BU LILLE

B : Bam HI, E : Eco RI, H : Hind III, N : Nde I, P: Pst I, R : Rsa I, X : Xba I,
S* : site Sau 3A localisé à la jonction de v-myb et v-ets
▒ séquences v-ets homologues aux gènes CDC4 et CDC36 de la levure

I - CARACTERISATION D'UN NOUVEL ONCOGENE AU SEIN DU VIRUS E26

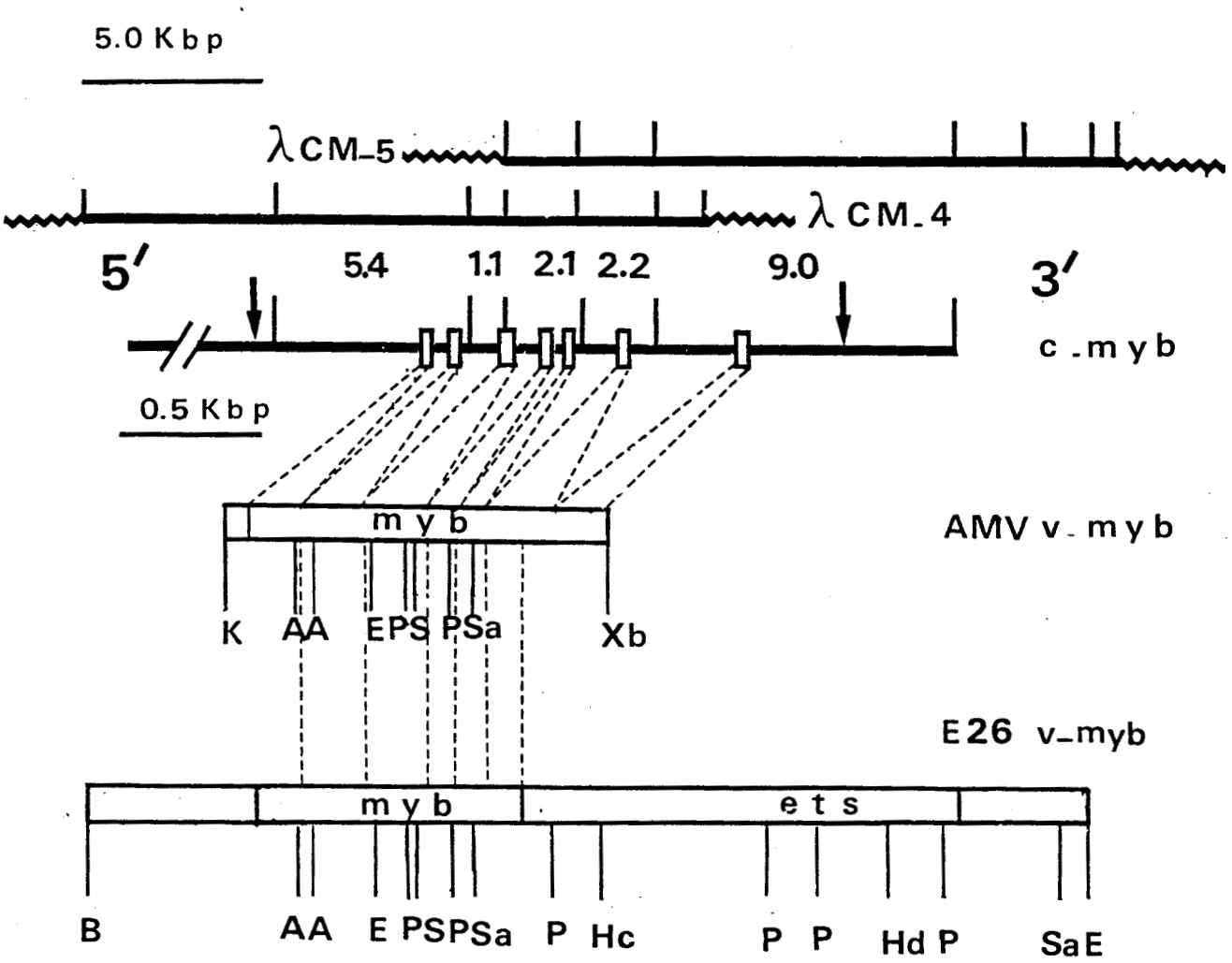
RESUME DE L'ARTICLE 1

L'ADN proviral du virus E26 a été cloné à partir d'une banque d'ADN de fibroblastes de caille, E26 QC1 transformés par ce virus. La génothèque a été criblée avec une sonde v-myb ou avec des sondes correspondant aux gènes viraux de structure. Un phage recombinant hybridant avec les deux types de sonde, E26 Q1, a été isolé. L'ADN de ce clone a été digéré par différents enzymes de restriction, les fragments séparés par électrophorèse en gel d'agarose et hybridés avec les sondes LTR, gag, pol, env, myb. Ceci nous a permis de montrer que le provirus E26 était entier dans le clone E26 Q1 et que sa structure était en accord avec celle suggérée par l'étude de l'ARN viral en hybridation liquide (Roussel et al., 1979 ; Bister et al., 1982) . La séquence inconnue spécifique est placée en aval des séquences myb de E26. Nous l'avons baptisée v-ets pour Erythroblastosis virus Twenty Six. De part sa position elle fait partie des 3,6 kbp de capacité codante nécessaire pour la synthèse de la protéine P135 trouvée dans les cellules infectées par E26 (schéma 19).

Nous avons alors cherché à déterminer si la séquence v-ets correspondait à un nouvel oncogène. D'une part, nous avons hybridé le clone E26 Q1 avec des sondes correspondant aux clones oncogènes déjà répertoriés. La séquence v-ets n'est homologue à aucun autre oncogène. D'autre part, nous avons cherché à savoir si la séquence v-ets possédait un équivalent cellulaire. De l'ADN de poulet normal a été digéré par EcoRI, et hybridé avec une sonde correspondant à la totalité des séquences v-ets. La même stratégie a été utilisée avec des ADN de caille et d'homme. La sonde v-ets détecte différentes bandes dans les ADN de ces trois espèces animales. Ainsi l'oncogène v-ets a un homologue cellulaire conservé phylogénétiquement.

Cet homologue est transcrit dans différentes cellules de poulet sous forme d'un ARN majoritaire de 7,5 kb et de deux ARN minoritaires de 2,2 et 1,5 kb. L'analyse des ARN polyadénylés de ces mêmes cellules avec une sonde v-myb met en évidence l'ARN messager c-myb de 4 kb et confirme que v-myb et v-ets représentent deux séquences indépendantes l'une de l'autre provenant de deux loci cellulaires distincts.

En conclusion, le génome du virus E26 contient, outre l'oncogène v-myb déjà décrit chez le virus AMV, une séquence v-ets spécifique présentant toutes les caractéristiques d'un nouvel oncogène : elle est traduite dans le domaine carboxyterminal de la protéine transformante P135 du virus E26, elle est homologue à des séquences d'ADN cellulaires phylogénétiquement conservées dans le phylum des vertébrés et ces séquences représentent au moins un gène cellulaire (proto-oncogène) puisqu'elles sont transcrites dans différentes lignées cellulaires.



BU LILLE

Schéma 20 : L'oncogène v-myb dans le gènome de E26

I ou E : Eco RI, A : Ava I, B : Bam HI, Hc : Hinc II, Hd : Hind III, K : Kpn I,

P : Pst I, Sa : Sal I, S : Sma I, Xb: Xba I

λ CM 5 et 4 : clones c-myb de poulet

DISCUSSION ET CONCLUSION

Au cours de notre étude du provirus E26, il est apparu que l'oncogène v-myb du virus E26 (v-myb $_{E26}$) est tronqué en 5' et en 3' par rapport à l'oncogène v-myb du virus AMV (v-myb $_{AMV}$): la partie 5' de la région E1(Klempnauer et al., 82), la partie 3' de E6 et tout E7 (Klempnauer et al, 1982) n'ont pas été transduits dans E26 (schéma 20).

Bien que l'on soit tenté d'imputer à l'oncogène v-ets les différences de pathologie entre les virus AMV et E26, on ne peut pas exclure que la séquence v-myb $_{E26}$ tronquée par rapport aux séquences v-myb $_{AMV}$ soit à l'origine de certaines de ces différences. La fabrication de mutants E26 remplaçant l'oncogène v-myb $_{E26}$ par l'oncogène v-myb $_{AMV}$ devrait nous apporter une réponse précise.

La séquence nucléotidique du provirus E_{26} a été décrite (Nunn et al., 1983; 1984). Elle montre que le cadre de lecture ouvert codant pour la protéine tripartite P135 est continu sur 1046 codons incluant 272 codons gag, 283 codons myb et 491 codons ets. Le codon d'initiation est dans la portion gag et le codon de terminaison à proximité de la fin du domaine ets. La comparaison des séquences myb $_{E26}$ et myb $_{AMV}$ confirme que E26 contient une portion interne du v-myb $_{AMV}$ (Klempnauer et al., 1982). La partie v-myb de P135 est de 30 kd alors que le virus AMV code pour une protéine v-myb de 45 kd (Boyle et al., 1983).

La comparaison des séquences du gène gag du virus RSV (Schwartz et al., 1983), du proto-oncogène c-myb (Klempnauer et al., 1982) et de la jonction gag-myb $_{E26}$ dans le génome du virus E26 montre que la recombinaison qui lie le gène gag au gène myb $_{E26}$ n'implique pas de régions homologues aux deux gènes. Il y a probablement eu recombinaison illégitime entre E1 de c-myb (Klempnauer et al., 1982) et le gène gag du rétrovirus qui est à l'origine de E26. Il semble également qu'il y ait eu recombinaison illégitime entre l'exon E6 du c-myb (Klempnauer et al., 1982) et un élément du proto-oncogène c-ets ainsi qu'entre c-ets et le gène env du même rétrovirus d'origine.

La séquence des LTR de E26 a été comparée avec celle de différents LTR connus. Les régions U5 des LTR des virus E26 et AMV sont colinéaires et différent seulement par quelques mutations ponctuelles. La région U3 des LTR de E26 est différente de celle d'AMV mais colinéaire et très homologue à la région U3 de MH2 ou de RSV. Ainsi, puisque les séquences U3 de E26, RSV et MH2 sont très homologues et que ni RSV ni MH2 n'ont un tropisme pour les érythroblastes, il semble que la région U3 n'ait pas un rôle à jouer dans la transformation érythroblastique par E26.

La structure de la séquence v-ets au sein de E26 ayant été bien définie, nous nous sommes attachés à poursuivre sa caractérisation en étudiant les séquences cellulaires qui lui sont homologues. Ces séquences ont été étudiées d'une part chez l'homme (il était intéressant de localiser les séquences c-ets sur les chromosomes humains et de déterminer si cette localisation était impliquée dans certaines tumeurs chez l'homme) et d'autre part chez le poulet afin de rechercher pour cet homologue cellulaire un rôle putatif dans la cellule normale et définir comment s'est construit E26.

II-LOCALISATION CHROMOSOMIQUE DE C-ETS CHEZ L'HOMME ET APPLICATIONS EN CANCEROLOGIE

RESUME DE L'ARTICLE 2

Les phages recombinants contenant des séquences c-ets homologues à v-ets ont été isolés à partir d'une banque de fragments d'ADN humain normal. Nous avons sélectionné un fragment c-ets de 5,4 kbp ne comportant pas de séquences repétitives humaines et devant nous servir de sonde dans nos expériences d'hybridation in situ effectuées en collaboration avec le groupe du Dr Berger du laboratoire de cytogénétique de l'hôpital Saint Louis à Paris.

La localisation de séquences c-ets s'est faite en deux étapes :

- une première localisation a été effectuée par hybridation des chromosomes séparés en neuf pics par "trieur de cellules". La sonde c-ets hybridait au niveau du pic n° 6 contenant les chromosomes 10, 11 et 12. La même technique appliquée sur les chromosomes d'une lignée de cellules lymphoblastoïdes provenant d'un individu portant la translocation t(11,12) (p11 q22) a révélé deux pics positifs avec la sonde c-ets : le n°6 correspondant aux chromosomes 10, 11, 12 normaux et le n°5 aux chromosomes 13, 14, 15 et 11 altéré. Ainsi nous avons pu localiser le c-ets humain sur le bras long du chromosome 11
- la localisation plus fine du locus c-ets a été obtenue en utilisant la technique d'hybridation in situ sur chromosomes fixés en métaphase. L'analyse de 58 métaphases a révélé que 17 % des grains étaient localisés sur le chromosome 11 au niveau des bandes q23 q24. Récemment, en collaboration avec le groupe du Dr Israel du National Institute of Health à Bethesda, nous avons pu restreindre cette localisation au domaine 11q23-3 q24.

PREMIERS TRAVAUX SUR L'IMPLICATION DU LOCUS C-ETS DANS CERTAINS CANCERS

Ces bandes 11q23 q24 sont impliquées dans des réarrangements spécifiques de certaines tumeurs (leucémies monocytaires t (4 ; 11) ; leucémies lymphocytaires t (4 ; 11) ; sarcomes d'Ewing t (11 ; 22) ; neuroépithéliomes t (11 ; 22)). Nous avons cherché à savoir si le locus c-ets était remanié, amplifié ou exprimé dans ces différentes tumeurs.

- Le réarrangement impliquant les chromosomes 11 et 22 dans les sarcomes d'Ewing et les neuroépithéliomes sont cytologiquement indistinguables des réarrangements constitutifs observés chez certains sujets. Ceci nous a conduit à étudier en parallèle et en collaboration avec le groupe du Dr Israel différentes lignées de sarcomes d'Ewing (ES), de neuroépithéliomes (NE)et des porteurs de réarrangements constitutifs. Nous pouvons à l'heure actuelle différencier le point de cassure du chromosome 11 dans les cellules de lignées NE ou ES de celui du chromosome 11 des porteurs constitutifs. Chez les porteurs constitutifs, le point de cassure se situe au niveau du gène c-ets puisque celui-ci est transloqué sur le chromosome 22. Par contre, le point de cassure dans les ES et les NE est distant du gène c-ets qui n'est pas transloqué (Griffin et al., 1986). Ainsi, même si le locus c-ets est impliqué dans les NE et les ES (ceci reste à démontrer), l'apparition de ces tumeurs

ne nécessite pas son transfert.

- Par contre, nous avons décrit, en collaboration avec le groupe du Dr Berger, que le locus c-ets était transféré sur le chromosome 1 dans une leucémie aigüe monocytaire avec translocation t (1 ; 11) (q 21 q 23) (Caubet et al., 1986) suggérant ainsi que le proto-oncogène c-ets pourrait être impliqué dans ce type de leucémie et que cette implication dépendait cette fois de la délocalisation du gène c-ets.

DISCUSSION ET CONCLUSION

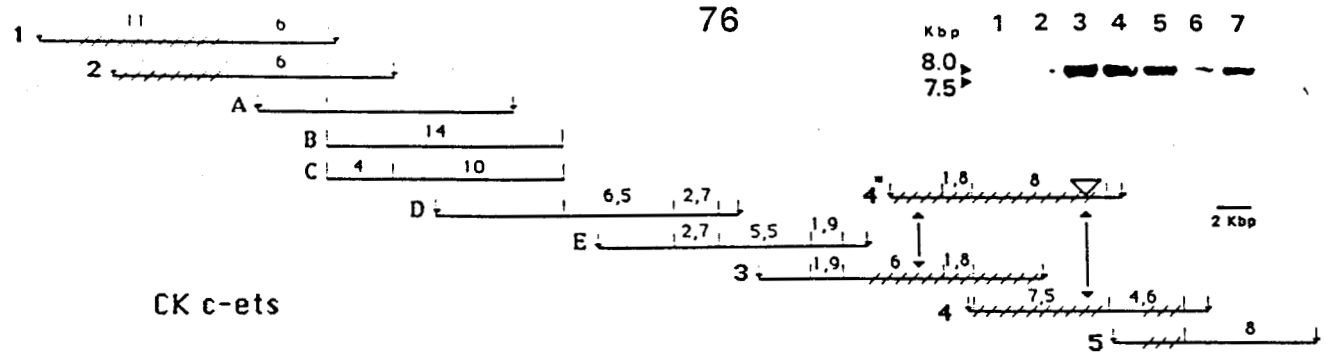
Nous avons localisé des séquences humaines c-ets sur le chromosome 11. Mais, Watson et al. ont récemment montré que l'équivalent c-ets humain se répartit sur deux loci c-ets 1 et c-ets 2 localisés respectivement en 11 q23 q24 et 21q22 (1985 ; 1986). Ces deux loci distincts présentent cependant une zone d'homologie s'étendant sur 40 nucléotides (1627-1667 d'après la séquence de v-ets (Nunn et al., 1983)) (Watson et al., 1985). Des études similaires aux nôtres ont été faites sur différentes tumeurs présentant des anomalies au niveau des bandes 11q23 24 et 21 q 22 :

-Sacchi et al. (1986) ont montré que le locus c-ets 1 est transféré du chromosome 11 sur le chromosome 4 dans la translocation t (4 ; 11) (q 21 ; 23) spécifique d'un type de leucémie qui se caractérise par la prolifération de cellules précurseurs myéloïdes et lymphoïdes. D'autre part, le locus c-ets 2 est transféré du chromosome 21 sur le chromosome 8 dans la translocation t (8 ; 21) (q22q22) trouvée chez des patients présentant une leucémie myéloïde aigüe de type M2 (AML M2). Dans ces deux types de leucémies avec translocations, les gènes c-ets sont exprimés à des taux plus faibles que dans les cellules lymphoïdes normales suggérant que ces gènes pourraient avoir un rôle dans l'apparition de ces tumeurs.

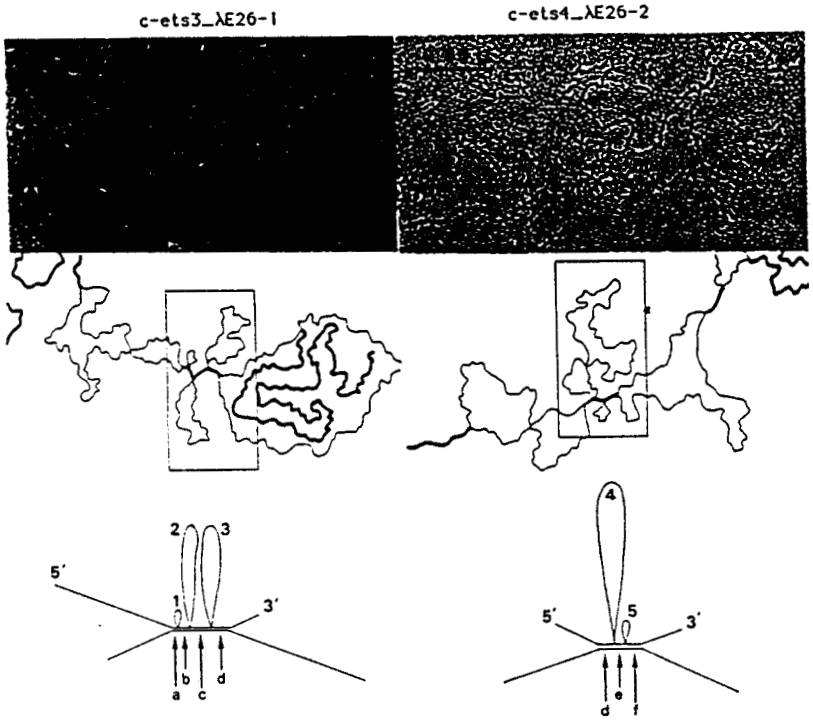
- Rovigatti et al. (1986) ont étudié le cas de deux patients, l'un présentant une leucémie myélomonocytique aigüe de lignée 4 (AMMoL, M4) et dont le caryotype met en évidence une zone HSR au niveau 11q23, l'autre présentant un SLCL (Small Lymphocytic Cell Lymphoma) caractérisé par une insertion inversée du fragment 11q14 2q23 au niveau de la bande 21q22. Dans les deux cas,le locus c-ets 1 est trouvé réarrangé et amplifié dans l'ADN des patients (amplifié 30 fois chez le patient 1, 10 fois chez le patient 2). De plus, chez le patient 2 qui présente un point de cassure en 21q22, c-ets 2 apparaît sous une forme altérée.

-Diaz et al. (1986) ont étudié par hybridation in situ la translocation t (9,11) (q22q23) spécifique de leucémies monocytaires aigües et démontrent que les gènes de l'interféron α restent sur le chromosome 9, les gènes de l'interféron $\beta 1$ sont transférés sur le chromosome 11 et que c-ets 1 est transloqué sur le chromosome 9. Aucune donnée n'a été fournie sur la distance qui sépare c-ets1 du point de cassure.

A



B



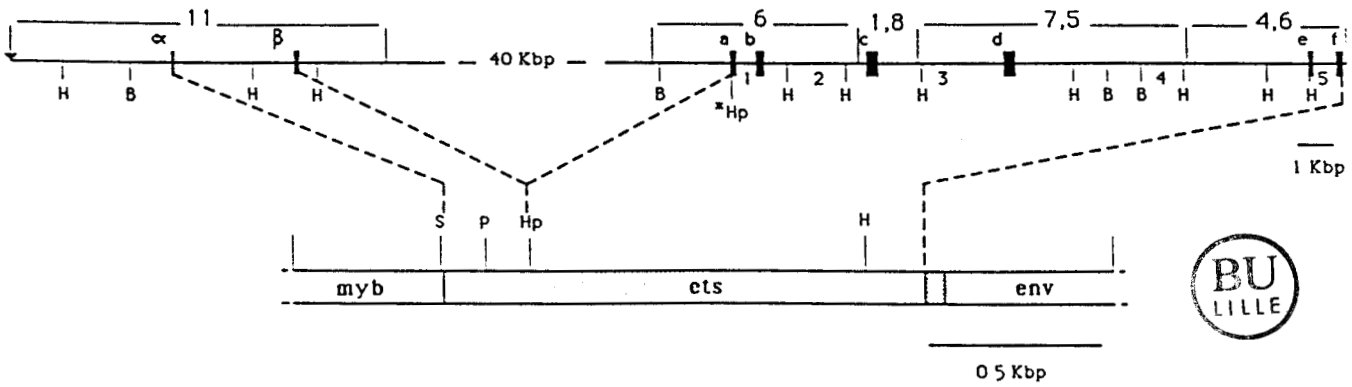
Double stranded segments

a	120 ± 30
b	220 ± 40
c	300 ± 35
d	270 ± 45
e	110 ± 20
f	210 ± 30
	1230 ± 95

Internal loops

1	650 ± 100
2	3000 ± 300
4	8300 ± 400
5	800 ± 75

C



BU LILLE

Schéma 21 : Le locus c-ets chez le poulet

I : Eco RI, B : Bam HI, H : Hind III, Hp* : seul site Hpa I localisé

séquences v-ets homologues aux gènes CDC 4 ET CDC 36 de levure

16 derniers codons de v-ets

séquences c-ets homologues à v-ets

III - CARACTERISATION DE L'HOMOLOGUE CELLULAIRE POULET DE V-ETS

RESUME DE L'ARTICLE 3

Une sonde correspondant à l'ensemble de l'oncogène v-ets détecte dans l'ADN de fibroblastes de poulet, digéré par l'enzyme de restriction EcoRI six fragments de respectivement 16.0, 8.0, 7.5, 6.0, 4.6 et 1.8 kbp. Les fragments 8.0 et 7,5 correspondent à une variation du locus c-ets chez le poulet. En effet, ces deux fragments représentent la même portion d'ADN cellulaire et l'analyse d'ADN d'embryons de poulets différents révéle soit la présence des deux fragments soit la présence du fragment de 8.0 kbp.

En criblant une banque d'ADN de poulet avec deux sondes rendant compte de toute la séquence v-ets, nous avons isolé trois phages recombinants. Chaque clone a été digéré par l'enzyme de restriction EcoRI et les fragments d'ADN séparés par electrophorèse sur gel d'agarose. Ceux ci ont été ensuite transférés sur nitrocellulose et hybridés soit avec des sondes v-ets soit avec les fragments EcoRI marqués, isolés à partir des clones c-ets obtenus. Ceci nous a permis d'une part d'orienter ces trois clones les uns par rapport aux autres (schéma 21A), d'autre part de constater qu'aucun de ceux-ci ne contenait la région 5' de v-ets. Les régions homologues à v-ets dans les clones 3 et 4 ont été localisées précisémment par la technique d'hétéroduplex en collaboration avec Bernard Vandenbunder (schéma 21B). Ainsi les séquences cellulaires correspondant à la majeure partie de v-ets (1200 nt) sont réparties sur 6 exons dans une région s'étendant sur 18 kbp (Schéma 21C).

A partir d'une nouvelle génothèque de fragments d'ADN d'embryon de poulet , nous avons isolé deux phages recombinants (clones 1 et 2) qui hybrident avec la partie 5' de v-ets et qui contiennent des séquences cellulaires que nous avons appelées α et β. La séquence nucléotidique de α et β révèle qu'elles possèdent les caractéristiques de séquences exoniques (schéma 22) : elles présentent un cadre de lecture ouvert identique à celui utilisé par E26 et sont flanquées des sites donneurs ou accepteurs d'épissage. De ce fait, l'épissure correcte des séquences α et β donne naissance aux régions 5' proximales dans v-ets. Pour définir plus précisément la relation entre la région génomique contenant α et β et la région contenant les exons a, b, c, d, e, f , nous avons séquencé en collaboration de Martine Duterque-Coquillaud l'exon a du clone 3. Il apparaît que les séquence v-ets proviennent d'un épissage correct entre β et a (schéma 22).

Comme les clones 1 et 3 ne contenaient pas de fragments communs, nous avons cherché à savoir si ces deux régions représentaient deux parties éloignées d'un même gène. Une banque d'ADN de poulet a été criblée avec des fragments marqués provenant de ces recombinants 1 et 3. Par la technique de "Walking gene", nous avons isolé cinq clones permettant de faire la jonction entre ces clones. Les cinq clones s'étendent sur environ 40 kbp et ne contiennent pas de séquences homologues à v-ets (schéma 21A). Ainsi E26 pourrait avoir transduit dans son génome deux séquences (l'une contenue dans le clone 1 et l'autre dans les clones 3 et 4) d'un même gène, éloignées l'une de l'autre de plus de 40 kbp. Pour étayer cette hypothèse, nous avons étudié l'expression de ces deux régions dans des cellules MSB1 (cellules lymphoïdes transformées par le virus de Marek). La région 5' n'est pas détectée dans les ARN messagers de ces cellules, la région

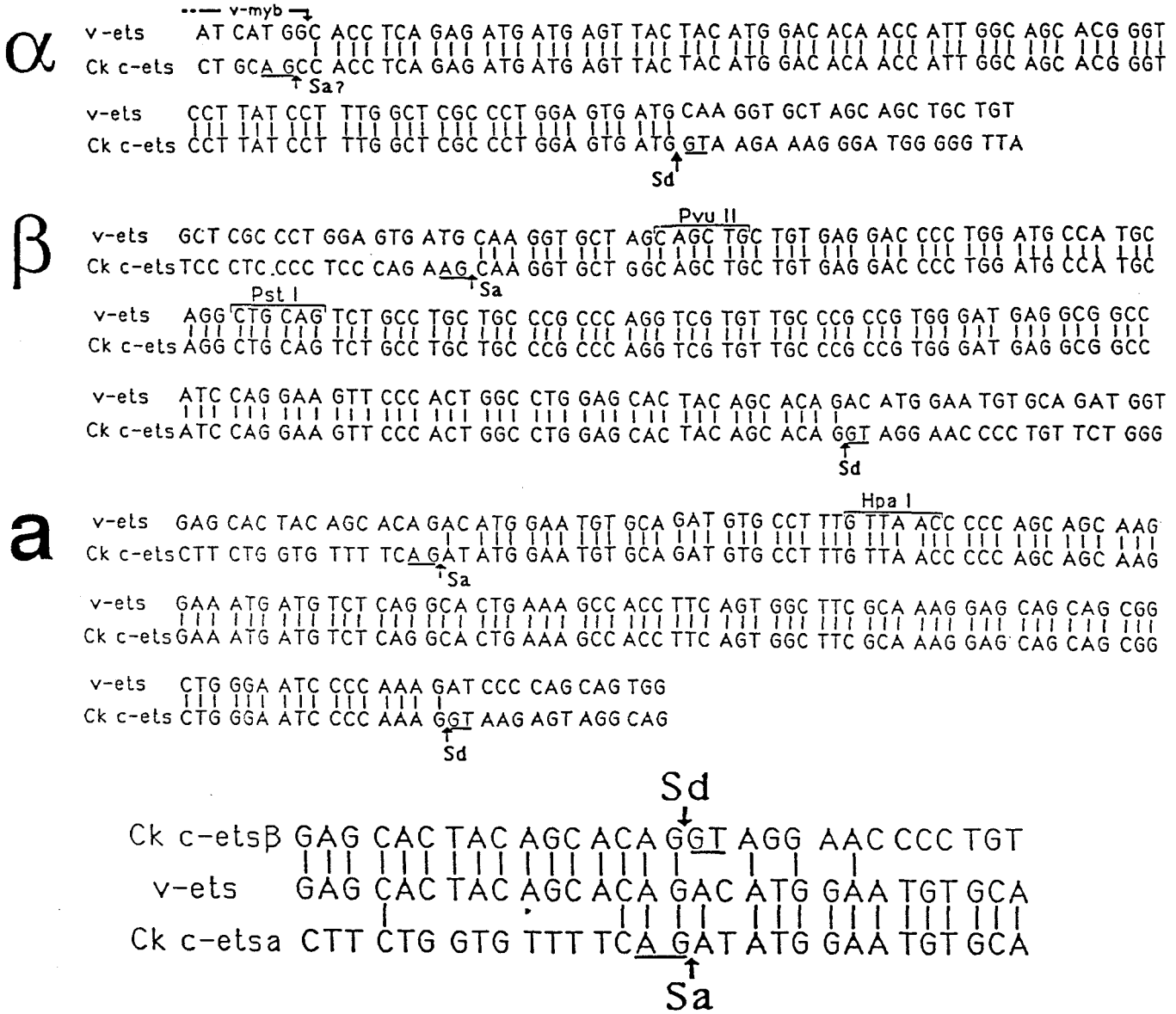
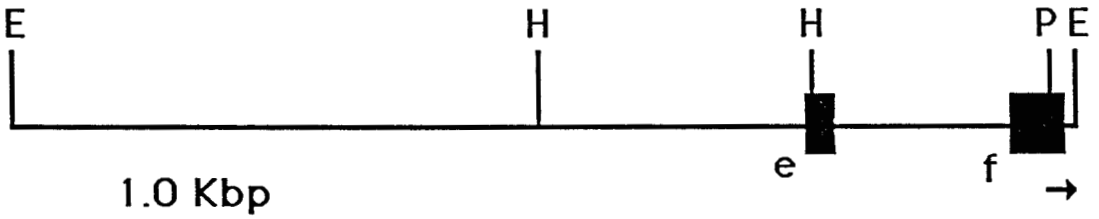


Schéma 22 : Séquences nucléotidiques des exons α , β et a du locus c-ets

Sd - site donneur d'épissure
Sa - site accepteur d'épissure




```
                Pst I
v-ets       CTG CAG AGC CTG CTG GGC TAC ACA CCA GAG
Ck c-ets    CTG CAG AGC CTG CTG GGC TAC ACA CCA GAG
Hu c-ets2   CTC CAG AAC TTG CTG GGG TTC ACG CCC GAG

v-ets       GAG CAC TCA TCA GCA TCT GGC TTG ACG TCC
Ck c-ets    GAG CTG CAC GCC ATG CTG GAC GTC AAG CCA
Hu c-ets2   GAA CTG CAC GCC ATC CTG GGC GTC CAG CCC

v-ets       AGC ATG GCG TGC AGC TCC TTT TGA CCGACCC
                                            ***
Ck c-ets    GAT GCT GAT GAG TGA ATTC
                                Eco RI
Hu c-ets2   GAC ACG GCA GAC TGA
                            ***

                                        env
v-ets       AGGGAACATCCTTTCTTTGATAGGG|CCTCCAA -
```

BU LILLE

Schéma 23 : séquence nucléotidique de l'extrémité 3' de l'exon f du locus c-ets chez le poulet

Ck c-ets - séquence de l'exon f
Hu c-ets 2 - séquence de la portion 3' du cDNA du gène c-ets 2 humain
*** - codon de fin de lecture
| - nucléotides communs d'une séquence à l'autre

3' détecte les trois ARN c-ets connus. La région 5' de v-ets s'avère donc être homologue à des séquences cellulaires non transcrites dans les espèces majeures d'ARN c-ets.

Enfin, nous avons tenté de déterminer l'origine du codon de terminaison de la protéine virale $P135^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$. Pour cela, nous avons séquencé l'extrémité 3' de l'exon f, supposée contenir le terminateur de la protéine cellulaire P54 (voir suite des résultats). Cette séquence a révélé que les seize derniers acides aminés de v-ets ne dérivent pas de l'exon f de c-ets, que l'homologie entre v-ets et l'exon f s'arrête 34 nucléotides avant le signal de fin de lecture de v-ets et que ce signal ne provient donc pas de l'exon f. Il semble que la fin de l'homologie entre v-ets et l'exon f corresponde à un exon de c-ets dans le virus. En effet le cadre de lecture de c-ets est ouvert au delà du point de recombinaison (schéma 23).

DISCUSSION ET CONCLUSION

Nous avons tenté d'organiser les séquences cellulaires homologues à l'oncogène v-ets. Ces séquences sont réparties sur deux domaines (de 6.0 et 18 kbp) séparés par environ 40 kbp de régions non homologues à v-ets. Le domaine 3' contient 6 exons (a à f) homologues à la majeure partie de v-ets (1202 nt). Ainsi les séquences ets 1 et ets 2 qui sont localisées sur différents chromosomes dans plusieurs espèces mammifères (Watson et al., 1986) sont disposées à la suite l'une de l'autre sur un même locus chez le poulet, espèce hôte de E26.

Le domaine 5' contient des séquences homologues aux 224 premiers nucléotides de v-ets. Ce domaine, bien qu'il présente une structure exon-intron typique des gènes eucaryotes, n'est pas transcrit dans l'ARN majeur c-ets de 7,5 kb. On ne peut cependant pas exclure qu'il soit transcrit dans des espèces d'ARN minoritaires. Les 40 kbp qui séparent les deux domaines d'homologie ne correspondent pas à un énorme intron. En effet, nous avons récemment isolé un cDNA ets chez le poulet qui contient en 3' des séquences relatives aux exons a,b,c,d,e,f et en 5' des séquences correpondant à un ou plusieurs exons présents dans les 40 kbp de séquences non homologues à v-ets (Duterque-Coquillaud et al, en préparation). Ainsi le virus E26 a éliminé de sa séquence v-ets un (ou plusieurs) exon(s) trouvé(s) dans un cDNA ets. Ceci pourrait refléter un mécanisme d'épissage alterné. Ce genre de mécanisme est de plus en plus décrit chez les gènes eucaryotes : par exemple, le proto-oncogène humain abl contient deux exons 5' épissés et reliés alternativement à des exons 3' omniprésents pour donner deux transcrits majeurs abl. Ces transcrits sont initiés dans des régions promotrices différentes et sont traduits en des protéines d'extrémités aminoterminales différentes (Shtivelman et al., 1986).

Enfin, la topographie du provirus E26 et sa séquence suggèraient que le codon de fin de lecture utilisé pour la synthèse de P135 était d'origine cellulaire et dérivé du gène c-ets. Cependant l'analyse de la séquence cellulaire homologue à la région 3' de v-ets démontre que les 16 derniers acides aminés de v-ets ne proviennent pas de cette portion c-ets qui pourtant est colinéaire avec l'extrémité 3' du cDNA c-ets 2 humain et qui contient un codon terminateur. Ainsi, cette région f de c-ets apporte certainement le codon terminateur d'au moins une protéine cellulaire mais n'apporte pas celui de la protéine $P135^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$. Les différences entre les séquences v-ets et c-ets au niveau de leur extrémité 3' peuvent être expliquées de différentes manières.

- Les 82 derniers nucléotides pourraient dériver d'une autre espèce d'ARN c-ets.
- Les séquences c-ets pourraient avoir été amputées après leur transduction dans E26. Cette amputation éliminerait le codon de terminaison normal et en créerait un nouveau dans un autre cadre de lecture. Ce phénomène a déjà été décrit pour les gènes c-fos de souris et v-fos du virus FBJ (Van Beveren et al., 1983) ou pour les gènes c-src et v-src du virus RSV (Takeya et Hanafusa, 1983). Dans le premier cas, l'extrémité du gène v-fos diffère de celle du gène c-fos parce que 104 nucléotides ont été éliminés au cours de la génèse du virus FBJ MuSV. Dans le second cas, les dix neuf derniers acides aminés de $pp60^{c\text{-}src}$ sont remplacés par douze acides aminés spécifiques de v-src dérivés d'une séquence d'ADN génomique située 900 bp en aval du codon de terminaison du gène c-src.
- Les séquences 3' de v-ets pourraient dériver du locus c-myb : elles correspondraient à des séquences 3' non traduites de c-myb car nous n'avons décelé aucune homologie entre cette séquence 3' et la séquence codante de c-myb déterminée récemment par Rosson et Reddy, (1986). La formation du virus E26 pourrait alors être envisagée de la manière suivante : dans une première étape, il y aurait recombinaison illégitime entre l'ARN génomique du rétrovirus auxilliaire de E26 et un ARN c-myb, dans une seconde étape, substitution d'une partie des séquences myb par des séquences ets.
- enfin ces séquences en 3' de v-ets pourraient provenir d'un troisième domaine cellulaire comme cela a été décrit précédemment pour c-fox dans le virus FBR murin de l'ostéosarcome (Van Beveren et al.,1984).

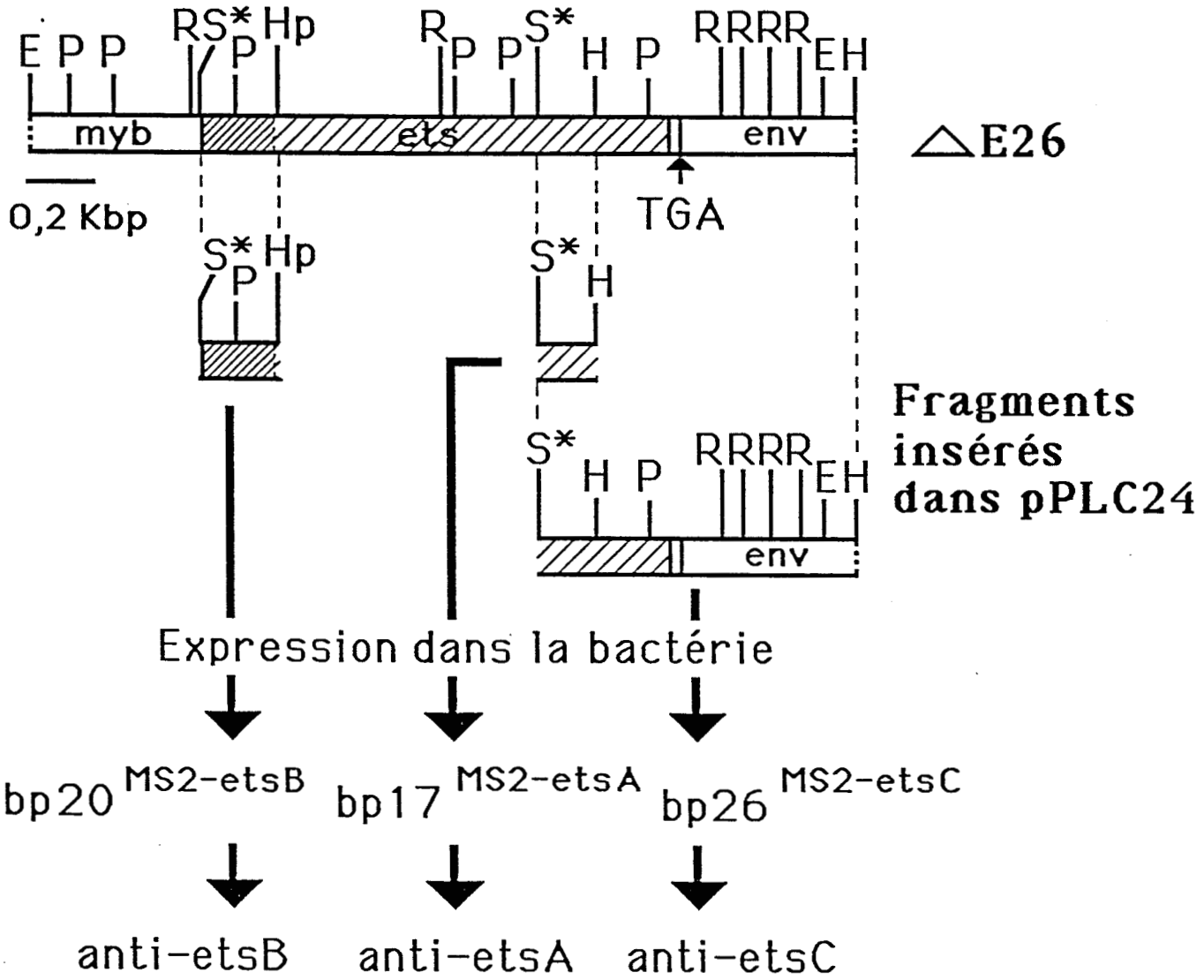


Schéma 24 : Préparation des sera anti-ets

séquences v-ets dérivées des exons c-ets a, b, c, d, e, f
séquences v-ets dérivées des exons c-ets α β

E : EcoRI
P : Pst I
R : Rsa I
H : Hind III
S* : sites Sau 3A importants pour notre clonage
Hp : Hpa I
TGA : codon de fin de lecture

IV - LES PRODUITS C-ETS CHEZ LE POULET

RESUME DES ARTICLES 4 ET 5

Il était intéressant de définir dans quel domaine tissulaire c-ets est exprimé afin de lui assigner une fonction physiologique dans la cellule normale. Nous avons donc entrepris d'identifier des protéines codées par c-ets et d'étudier leur spectre d'expression dans différents tissus et lignées cellulaires. Nous avons préparé trois antiséra dirigés contre différentes régions correspondant au gène v-ets et exprimées dans un système procaryote : un sérum dirigé contre 56 acides aminés de la région centrale de v-ets (anti-ets A), un sérum dirigé contre les 83 premiers acides aminés de v-ets (anti-ets B), un sérum dirigé contre les 135 derniers acides aminés de la P135 $^{gag\text{-}myb\ ets}$ (schéma 24).

Trois plasmides recombinants ont été construits.Un premier plasmide a été obtenu par insertion d'un fragment Sau3A-HindIII (nucléotides 1604 à 1765 ; Nunn et al., 1983) correspondant à 56 acides aminés de la région centrale de v-ets entre les sites BamH1 et HindIII du vecteur d'expression pPLC24. Le fragment est exprimé dans E.Coli sous forme d'un polypeptide de fusion d'un poids moléculaire de 17 kd (bp17$^{MS2\text{-}ets\ A}$). Plusieurs lapins ont ensuite été immunisés contre ce polypeptide pour obtenir le sérum anti-etsA. Un deuxième plasmide a été obtenu en insérant un fragment Sau3A-HpaI (nucléotides 527 à 785 ; Nunn et al., 1983 correspondant aux 85 premiers acides aminés de v-ets dans un dérivé du plasmide pPLC24 au niveau des sites BamHI et HpaI (Denhez et al., en préparation). Ce fragment est exprimé dans E.Coli sous forme d'un polypeptide de fusion de poids moléculaire 20 kd (bp20$^{MS2\text{-}etsB}$) qui a été utilisé pour obtenir le sérum anti-ets B. Enfin le troisième plasmide a été construit en insérant un fragment Sau3A-HindIII (nucléotides 1604 à 2501 ; Nunn et al., 1983) correspondant aux 137 derniers acides aminés de la P135$^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$ au niveau des sites BamHI et HindIII du vecteur pPLC24. Le fragment est exprimé dans E.Coli sous forme d'un polypeptide de fusion d'un poids moléculaire de 26 kd (bp26$^{MS2\text{-}ets\ C}$) qui nous a permis d'obtenir un antisérum anti-ets C. La spécificité de ces trois classes d'antiséra a été analysée par immunoprécipitation de la protéine P135$^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$, produit de traduction du génome du virus E26.

Pour identifier le produit codé par v-ets, nous avons criblé différentes lignées de cellules aviaires pour la présence ou non de protéines réagissant avec nos antiséra. Les séra A et C immunoprécipitent de manière spécifique une protéine de 54 kd dans le lysat de cellules MSB1 (lignée de cellules lymphoïdes T) marquées à la méthionine ^{35}S. Nous avons comparé les cartes bidimensionnelles des peptides marqués à la méthionine ^{35}S obtenus par digestion à la trypsine des protéines P54$^{c\text{-}ets}$ et P135 $^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$. La majorité des peptides dérivés du domaine de P135$^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$ codé par v-ets est retrouvée dans P54$^{c\text{-}ets}$. Nous en concluons donc que P54 est très semblable au domaine carboxyterminal de P135$^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$ et représente certainement le produit de traduction du gène c-ets. Nous avons également comparé les cartes peptidiques bidimensionnelles de P54$^{c\text{-}ets}$ et des deux polypeptides bactériens bp17 et bp26 contre lesquels sont dirigés les séra A et C (voir article 5) . Le polypeptide bp 26 contient deux peptides marqués à la méthionine ^{35}S, un peptide qui d'après la séquence de l'oncogène v-ets est spécifique du locus Hu-ets1 humain et un peptide marqueur du locus Hu-ets2 (Watson et al., 1985). Ces deux

peptides se retrouvent sur la carte peptidique bidimensionnelle de P54. Il semble donc que P54 soit le produit d'une combinaison de séquences codantes ayant divergées dans le phylum des vertébrés vers les séquences ets1 ou ets2 humaines. Enfin, pour terminer la comparaison entre le domaine de P135 codé par v-ets et P54, nous avons constaté que le sérum C dirigé contre les 83 premiers acides aminés de v-ets n'immunoprécipite ni P54 ni aucune autre protéine cellulaire. Ainsi, les 80 premiers acides aminés (exons α et β) ne se retrouvent pas dans $P54^{c\text{-}ets}$. Ceci est en accord avec ce qui a été reporté précédemment (article 3) à savoir que cette région de v-ets n'est pas transcrite dans les ARN c-ets connus.

Nous avons ensuite voulu savoir si, comme la protéine transformante $P135^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$ et la protéine codée par le gène c-myb ($P75^{c\text{-}myb}$) (Klempnauer et al., 1986a), $P54^{c\text{-}ets}$ était une protéine nucléaire. Après avoir effectué un fractionnement cellulaire des cellules MSB1, nous avons immunoprécipité des quantités équivalentes en nombre de coups par minute de chaque fraction avec l'antisérum anti-ets A. Contrairement à $P135^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$ et à $P75^{c\text{-}myb}$ qui sont des protéines nucléaires, la protéine $P54^{c\text{-}ets}$ semble être localisée de façon prédominante dans la fraction cytosolique.

Enfin nous avons comparé le taux d'expression de $P54^{c\text{-}ets}$ dans différents tissus de poulet et différentes lignées cellulaires. P54 est exprimée à de faibles taux dans la plupart des tissus et lignées analysés (embryon de poulet, cellules de moëlle osseuse, fibroblastes, macrophages, érythroblastes), à des taux plus conséquents dans la plupart des lignées de cellules lymphoïdes B, T ou non B/non T, en grande quantité dans les lymphocytes obtenus à partir de thymus ou de bourse de Fabricius de poulets embryonnaires ou nouveau nés.

En plus de P54, le sérum A détecte une protéine de 56 kd dans le lysat de thymocytes marqués à la méthionine ^{35}S. P56 et P54 ont les mêmes cartes peptidiques suggèrant que ces deux protéines sont étroitement liées.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Nous avons identifié une protéine de 54 kd codée par c-ets. P54 est homologue au domaine de P135 codé par l'oncogène v-ets : la majeure partie des peptides du domaine de P135 codé par v-ets est retrouvée dans P54. Comme le domaine de P135 codé par v-ets , P54 est une protéine de fusion de séquences divergées vers les séquences spécifiques des gènes Hu-ets 1 et Hu-ets 2 . Seule la région 5' de v-ets n'a pas son équivalent dans la protéine P54.

Contrairement à $P75^{c\text{-}myb}$ et $P135^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$ qui sont nucléaires, P54 est retrouvée en majorité dans le cytoplasme. Ce résultat suggère que ce sont les séquences en acides aminés codées par la portion v-myb qui imposent la localisation de la $P135^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$ dans le noyau. On peut également se demander si la localisation anormale (noyau) de déterminants de la $P135^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$ codés par v-ets n'a pas son importance dans le phénomène de transformation par E26. L'analyse de mutants de délétion appropriés dans v-myb et l'étude en parallèle de l'expression et de la localisation des produits synthétisés par ces mutants devraient permettre de répondre à cette question.

Nous avons trouvé que P54 était fortement exprimée dans les lymphocytes provenant du

thymus ou de la bourse de Fabricius mais peu exprimée dans les lymphocytes du sang circulant ou dans d'autres tissus ou lignées cellulaires suggèrant ainsi que P54 pourrait avoir un rôle dans la prolifération des lymphocytes. Comme il a déjà été montré que le taux d'ARN c-myb est modulé pendant la maturation des thymocytes de souris (Sheiness et Gardinier, 1984), on peut imaginer que la co-expression de c-myb et c-ets pourrait être importante pour la maturation et/ou la prolifération des thymocytes.

RESUME DE L'ARTICLE 6

Outre la protéine $P54^{c\text{-}ets}$, les antiséra A et C immunoprécipitent également trois protéines de 60, 62 et 64 kd dans le lysat de macrophages transformés par MC29. La synthèse de ces polypeptides semble être une caractéristique des macrophages de poulet. En effet, nous avons analysé des macrophages normaux provenant de moëlle osseuse de poulet ainsi que plusieurs clones indépendants de macrophages transformés soit par MC29 (dépendants des facteurs de croissance) soit par MH2 (indépendants des facteurs de croissance). Dans tous les cas, les protéines P60, P62 et P64 (les protéines P60) sont exprimées à un taux important.

De façon à déterminer le degré d'homologie entre les protéines P60-62-64, P54 et P135 nous avons comparé les cartes peptidiques bidimensionnelles de toutes ces protéines. Tous les peptides détectés dans P64 sont présents dans P62 suggérant que ces potéines sont très homologues. Seulement deux peptides sont communs entre les protéines P54 et P64 P62. Sur ces deux peptides, un seul est également retrouvé dans P135. Il semble donc que les protéines P60 soient peu homologues à P54. Pour étayer ce résultat, nous avons comparé les cartes peptidiques monodimensionnelles obtenues à partir de ces protéines digérées partiellement par la protéase de Staphylococcus Aureus V8. Les cartes de P64 et P62 sont identiques. Par contre aucun peptide commun n'est trouvé entre celle de P54 et celles des P60. Nous en concluons donc que les protéines P60 présentent un domaine limité d'homologie avec la protéine P54.

Les protéines P60 sont fortement exprimées dans les macrophages mais le sont beaucoup moins dans les cellules myéloïdes immatures. Ceci laissait suggèrer qu'elles pouvaient avoir un rôle dans la différenciation des macrophages. Pour élucider ce point, nous avons comparé la synthèse de protéines P60 dans des myéloblastes transformés par AMV avec celle obtenu dans ces mêmes myéloblastes induits à se différencier en macrophage par traitement au TPA . Dans les myéloblastes transformés par AMV, les protéines P60 sont synthétisées à un taux limite pour la détection. Par contre ces cellules traitées avec 20nM de TPA se différencient en macrophages et synthétisent des taux élevés de protéines P62 et P64. Un phénomène du même type a été également observé dans deux lignées humaines, l'une promyélocytique (HL60), l'autre hystiocytique (U937). Ainsi, les cellules HL60 en phase exponentielle de croissance synthétisent une protéine de 53 kd et de très faible taux de protéines de 58, 62 et 68 kd. Après induction au TPA, elles expriment des taux considérables de 58, 62 et 68 kd.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Nos antiséra A et C immunoprécipitent la protéine $P54^{c\text{-}ets}$ dans la plupart des tissus et cellules analysés mais également une série de protéines de 60, 62 et 64 kd exprimées principalement dans les macrophages. Ces protéines sont très semblables entre elles mais ne présentent qu'un domaine commun limité avec P54. Au vu de ces deux familles de protéines, se pose la question de savoir à partir de quel ARN messager sont traduites ces familles. Puisque les tissus lymphoïdes de poulet contiennent des taux importants de transcrits de 7,5 kb et de 2,2 kb, on peut supposer que l'une de ces espèces d'ARN code pour $P54^{c\text{-}ets}$. Le problème reste posé pour les protéines P60. Cependant, des résultats préliminaires indiquent qu'une sonde v-ets détecte un nouvel ARN de 4 kb, majoritaire dans les macrophages (Boulukos et al., en préparation). Seules des expériences de traduction *in vitro* à partir des différents ARN ets nous permettront d'associer à chaque protéine son ARN correspondant.

Alors que P54 est majoritairement exprimée dans les thymocytes et les lymphocytes de la bourse de Fabricius, la série des protéines P60, peu homologues à P54, est surtout exprimée dans les macrophages. Ceci suggère que l'expression d'un gène cellulaire homologue à v-ets pourrait être corrélée avec la différenciation macrophagique. Ce genre de situation où deux gènes présentant des homologies sont exprimés à des stades de différenciation ou dans des tissus différents a déjà été décrit pour différents gènes dont les gènes c-myc, N-myc et L-myc. Ces trois gènes sont homologues entre eux au niveau du deuxième exon de gène c-myc mais ne sont pas amplifiés dans les mêmes tumeurs ni exprimés dans les mêmes tissus sains (Kohl et al., 1986).

DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION.

Grâce au clonage moléculaire du provirus E26, nous avons pu définir que le génome de ce virus dérive d'une recombinaison entre le génome d'un virus ALV et au moins deux séquences cellulaires, c-myb et c-ets. Cette observation nous a tout d'abord conduit à caractériser plus finement les portions c-myb et c-ets transduites dans le virus. De plus, le locus c-ets étant jusqu'alors totalement inconnu, nous avons également cherché à savoir sous quelle forme et dans quel tissu il était exprimé.

L'oncogène v-myb dans le virus E26

L'oncogène v-myb du virus E26 est une version tronquée de l'oncogène v-myb du virus AMV. v-myb $_{AMV}$ est constitué de sept régions cellulaires notées de E1 à E7. Par contre v-myb $_{E26}$ contient les régions E2, E3, E4, E5 mais est amputé de la majeure partie de E1, d'une partie de E6 et de tout E7. Cette réduction du domaine v-myb dans le virus E26 ne semblent pas avoir de conséquences importantes sur l'activité de l'oncogène v-myb. Deux observations vont dans ce sens :

- D'une part, la biologie de virus mutés par délétion de v-ets semble indiquer que la présence de v-ets, plus que l'amputation du gène v-myb, intervient dans la transformation des myéloblastes par E26. En effet, les myéloblastes infectés par le virus E26 sont bloqués de façon plus énergique que ceux infectés par le virus AMV ou le virus muté par délétion de v-ets (Nunn et al., 1986).
- D'autre part, cette réduction n'affecte pas les régions importantes pour la fonction du produit myb (c'est à dire les séquences répétées supposées intervenir dans la fixation du produit myb sur l'ADN).

Nous avons comparé la structure des oncogènes v-myb $_{AMV}$ et v-myb $_{E26}$ à celle des ARN myb anormaux observés par Shen-Ong dans des lymphosarcomes induits par le virus Abelson ou dans des cellules tumorales en lignée NFS 60. De ces différents cas, on remarque deux choses :

1. c-myb semble activé par élimination de sa portion 5' et/ou de sa portion 3'. Dans les virus AMV et E26, le gène c-myb transduit est amputé de ses régions 5' et 3'. Dans les tumeurs décrites par Shen-Ong, il est exprimé sous une forme tronquée en 5' ou en 3'.
2. les régions E1 et E6 sont à chaque fois impliquées dans ce mécanisme d'activation. En effet, dans les lymphosarcomes décrits par Shen-Ong, le virus MoMuLV s'est inséré dans la région E1 déjà impliquée dans le mécanisme de recombinaison utilisé pour la formation du virus AMV. De la même manière, dans les cellules NFS 60, le virus MoMuLV s'est inséré en E6 (zone de recombinaison en 3' du gène c-myb pour la formation du virus E26).

Il serait intéressant de savoir d'une part, si l'amputation des deux régions est nécessaire ou si l'amputation de l'une ou l'autre aurait suffi à rendre v-myb transformant pour les myéloblastes, d'autre part si le fait que ces insertions ou recombinaisons touchent toujours E1 ou E6 est important pour l'activation de c-myb ou si cela coïncide avec des points chauds de recombinaison à leur niveau. La biologie de virus chimériques contenant v-myb et la portion 5' ou 3' de c-myb devrait nous permettre de répondre à la première question. Quant à la seconde question, il est probable que

les événements intervenant au niveau de E1 et E6 ne reflètent pas uniquement des points chauds de recombinaison puisque les insertions des virus MoMuLV dans les tumeurs ne se sont pas faites exactement aux points de recombinaison utilisés par les virus AMV et E26.

L'oncogène v-ets dans le virus E26

A partir de différentes banques d'ADN de poulet, nous avons isolé différents phages recombinants contenant des séquences cellulaires homologues à l'oncogène viral v-ets. Ces séquences organisées les unes par rapport aux autres présentent une structure en mosaïque (exons, introns) répartie sur environ 80 kbp. Elles représentent un locus c-ets puisque les clones recombinants digérés par EcoR1, Bam H1 ou Hind III rendent compte de tous les fragments EcoR1, Bam H1 et Hind III détectés dans l'ADN de poulet digéré par ces enzymes et hybridé avec une sonde v-ets.

La portion de locus que nous avons identifiée contient 9 exons. Le virus E26 n'en a transduit que huit : deux (α et β) situés dans la partie 5' du locus et six (a à f) situés en 3' du locus. L'exon non transduit dans le virus E26 est localisé dans les 40 kbp d'ADN cellulaire qui sépare l'exon β de l'exon a (Duterque-Coquillaud et al., en préparation).

L'étude de deux cDNA que nous avons isolés récemment à partir d'une banque de cDNA de cellules de rate indique que la portion du locus c-ets décrite dans ce mémoire coderait , grâce à un mécanisme d'épissage alterné, pour au moins deux types de protéines : l'une de 54 kd hautement exprimée dans le thymus (P54, article 4) et l'autre de 68 kd présentant un large domaine commun avec P54 (a à f) et exprimée dans la rate (Leprince et al., en préparation). L'ARN codant pour la protéine P68 contiendrait les exons α, β, a, b, c, d, e, f et différerait des séquences v-ets uniquement dans sa partie 3'. Le virus E26 pourrait donc s'être formé par recombinaison d'un virus ALV ou d'un virus contenant déja l'oncogène v-myb_{AMV} et de cet ARN. On pourrait également imaginer qu'un virus contenant les séquences gag -myb soit venu s'insérer en amont de l'exon α dans d'ADN de poulet, qu'il y ait eu expression d'un ARN composé des séquences gag-myb-ets puis sélection du virus E26 par pression biologique. Une observation est en faveur de cette dernière hypothèse : l'exon E6 dans le virus AMV possède, au niveau du point de recombinaison utilisé pour former E26, un site d'épissage donneur putatif qui pourrait tout à fait avoir rejoint le site d'épissage accepteur putatif observé en 5' de l'exon α.

Nous avons également identifié trois protéines de 60-62 et 64 kd exprimées dans les macrophages (article 6). Celles-ci présentent peu d'homologie avec P54 et pourraient correspondre aux produits de traduction d'un gène peu homologue au gène c-ets codant pour P54 et P68. Il est tentant de comparer ces gènes et leurs produits de traduction aux gènes humains c-ets 1 et c-ets 2 décrits par Watson et al.. Certaines similitudes apparaissent :

- nous avons isolés différents cDNA correspondant aux gènes humains c-ets 1 et c-ets 2. L'homologie entre ces cDNA semblent s'étendre sur plus de nucléotides que ne le décrivait Watson

et al. et pourrait être du même ordre de grandeur que celle observée entre le gène c-ets codant pour la protéine P54 et celui codant pour les protéines P60. D'ailleurs, le peptide commun à P54, P60 et P135 est également retrouvé dans les protéines humaines mais n'est pas codé par la région commune aux gènes c-ets 1 et c-ets 2 .

- des résultats préliminaires semblent indiquer que le locus c-ets 1 humain est exprimé dans les lymphocytes B stimulés à entrer en phase de compétence et le locus c-ets 2 dans les monocytes induits à se différentier en macrophages. Ainsi, le gène c-ets aviaire codant pour P54 et le gène codant pour les P60 s'exprimeraient dans le même type de cellules que respectivement aux gènes c-ets 1 et c-ets 2 humains.

En conclusion, le travail exposé dans cette thèse, ainsi que ceux effectués par d'autres équipes ont permis de mieux connaitre les séquences v-myb et v-ets dans le virus E26, la structure de leurs homologues respectifs et leur mode d'activation. Le mode d'expression différentiel du (ou des) locus(i) c-ets peut diversifier les fonctions des produits c-ets dans l'organisme. Puisque l'altération de l'un ou l'autre des homologues c-ets humains semble impliquée dans l'apparition de certains cancers, il serait intéressant de la relier à un ou plusieurs bouleversement (s) de fonctions cellulaires.

Dans ce mémoire , nous n'avons pas abordé l'étude de la biologie du virus E26 et la contribution de chacun des oncogènes v-myb et v-ets à cette biologie. Nous n'avons à l'heure actuelle que peu de données à ce sujet.

- Puisque le virus AMV qui contient uniquement l'oncogène v-myb induit des leucémies myéloïdes, il est tentant de penser que l'oncogène v-myb est à l'origine du pouvoir transformant de E26 sur les myéloblastes et l'oncogène v-ets à l'origine du pouvoir transformant de E26 sur les érythroblastes . L'étude de mutants de délétion dans v-myb ou v-ets devrait nous permettre d'aborder plus exactement le rôle de chacun des deux oncogènes. Dans ce domaine, Nunn et al. (1986) ont récemment reporté que l'un de leurs mutants, construit par délétion de l'ensemble des séquences v-ets, transforme les myéloblastes mais n'induit plus d'érythroblastoses. Cependant, les myéloblastes transformés semblent plus matures que les myéloblastes transformés par E26 ou AMV (ils présentent un faible taux de récepteurs Fc et une activité de phagocytose faible) suggèrant ainsi que l'oncogène $v\text{-}myb_{E26}$ seul est moins efficace dans la transformation des myéloblastes.

- Les myéloblastes transformés par E26 sont totalement bloqués dans leur différenciation. Les premiers résultats de Nunn et al. décrits ci-dessus, semblent mettre hors de cause l'oncogène v-myb de E26 tronqué en 5' et 3' par rapport à l'oncogène du v-myb du virus AMV. Par contre, v-ets pourrait avoir un rôle à jouer dans ce blocage des myéloblastes. Les résultats préliminaires, qui permettent d'impliquer les séquences humaines homologues à v-ets (Hu-ets 1, Hu-ets 2) dans des translocations spécifiques de leucémies myélomonocytaires (voir discussion du deuxième article), vont dans ce sens.

BIBLIOGRAPHIE.

- ADKINS,B., A.LEUTZ and T.GRAF. (1984). Autocrine growth induced by src-related oncogenes in transformed chicken myeloid cells.
Cell **39** : 439-445.

-ALITALO,K., M.SCHWAB, C.C.LIN, H.E.VARMUS and J.M.BISHOP. (1983). 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., R.WINQUIST, C.C.LIN, A. de la CHAPELLE, M.SCHWAB and J.M.BISHOP. (1984). Aberrant expression of an amplified c-myb oncogene in two cell lines from a colon carcinoma .
Proc. Natl. Acad. Sci. **81** : 4534-4538.

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

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

- BARGMANN,C.I., M.C.HUNG and R.A.WEINBERG. (1986). Multiple independent activations of the neu oncogene by a point mutation altering the transmembrane domain of P185.
Cell **45** : 649-657.

- BATTEY,J., C.MOULDING, R.TAUB, W.MURPHY, T.STEWART, H.POTTER, G.LENOIR and P.LEDER. (1983). The human c-myc oncogene : structural consequences of translocation into the IgH locus in Burkitt lymphoma.
Cell **34** : 779-787.

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

- 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** : 71-75

- BEGUINOT,L., J.A. HANOVER, S.ITO, N.D. RICHERT, M.C. WILLINGHAM, and IRA PASTAN. (1985). Phorbol esters induce transient internalization without degradation of unoccupied epidermal growth factor receptors.
Proc. Natl. Acad. Sci. **82** : 2774-2778.

- BENOIST,C. and P.CHAMBON. (1981). In vivo sequence requirements of the SV40 early promoter region.
Nature **290** : 304-310.

- BERGER,R. and A.BERNHEIM. (1985). Cytogenetics of Burkitt's lymphoma-leukemia : a review in Burkitt's lymphoma (G.LENOIR, G.O'CONOR and C.L.MOLWENY, eds).
IARC Scientific publications N° **60** pp 65-80.

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

- BESMER,P., J.E.MURPHY, P.C.GEORGE, F.QIU, P.J.BERGOLD, L.LEDERMAN, H.W.SNYDER Jr, D.BRODEUR, E.E.Z.ZUCHERMAN and W.D.HARDY. (1986). A new acute transforming feline retrovirus and relationship of its oncogene v-kit with the protein kinase gene family.
Nature **320** : 415-421.

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

- BEUG,H., S.PALMIERI, C.FREUDENSTEIN, H.ZEUTGRAF and T.GRAF. (1982a). Hormone-dependent terminal differentiation in vitro of chicken erythroleukemia cells transformed by ts mutants of avian erythroblastosis virus.
Cell **28** : 907-919.

- BEUG,H., M.J.HAYMAN and T.GRAF. (1982b). Myeloblasts transformed by the avian acute leukemia virus E26 are hormone-dependent for growth and for the expression of a putative myb-containing protein $P135^{E26}$.
EMBO J. **1** : 1069-1073.

- BEUG,H., A.LEUTZ, P.KAHN, and T.GRAF. (1984). Ts mutants of E26 leukemia virus allow transformed myeloblasts, but not erythroblasts or fibroblasts, to differentiate at the nonpermissive temperature.Cell. **39** : 579-588.

- BIRCHMEIER,C., D.BIRNBAUM, G.WAITCHES, O.FASANO and M.WIGLER. (1986). Characterization of an activated human ros gene
Mol. Cell. Biol. **6** : 3109-3116

- BISHOP,J.M. (1983). Cellular oncogenes and retrovirus.
Annu.Rev.Biochem. **52** : 301-354.

- BISTER,K., M.NUNN, C.MOSCOVICI, B.PERBAL, M.A.BALUDA and P.DUESBERG. (1982). Acute leukemia viruses E26 and avian myeloblastosis virus have related transformation-specific RNA sequences but different genetic structures, gene products, and oncogenic properties.
Proc. Natl. Acad. Sci., USA : 3677-3681.

- BLAIR, D.G., W.L.McCLEMENTS, M.L.OSKARSON, P.J.FISCHINGER and G.F.VANDE WOUDE. (1980). Biological activity of cloned Moloney sarcoma virus DNA : terminally redundant sequences may enhance transformation efficiency.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **77**, 3504-3508.

- BLAIR,D.G., M.OSKARSSON, T.G.WOOD, W.L.McCLEMENTS, P.J.FISCHINGER, G.F.VANDEWOUDE, (1981). Activation of transforming potential of a normal cell sequence : a molecular model for oncogenesis.
Science **212** : 941-942

- BOLOGNESI,D.P., R.LUFTG and J.H.SHAPER. (1973). Localization of RNA tumor virus polypeptides. I. Isolation of further virus substructures.
Virology **56** : 549-564

- BOYLE,W.J., J.S.LIPSICK, E.P.REDDY and M.A.BALUDA. (1983). Identification of the leukemogenic protein of avian myeloblastosis virus and of its normal cellular homologue.
Proc. Natl. Acad. Sci. **80** : 2834-2838.

- BROWN,K., M.QUINTANILLA, M.RAMSDEN, I.B.KERR, S.YOUNG and A.BALMAIN. (1986). v-ras genes from Harvey and Balb murine sarcoma viruses can act as initiators of two-stage mouse skin carcinogenesis.
Cell **46** : 447-456.

- BROWNING,P.J., H.F.BUNN, A.CLINE, M.SHUMAN and A.W.NEINHUIS. (1986). "Replacement" of COOH-terminal truncation of v-fms with c-fms sequences markedly reduces transformation potential.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83** : 7800-7804.

- BRUGGE,J.S. and R.L.ERIKSON. (1977). Identification of a transformation-specific antigen induced by an avian sarcoma virus.
Nature **269** : 346-348.

- BUSS,J.E., M.P.KAMPS and B.M.SEFTON. (1984). Myristic acid is attached to the transforming protein of Rous sarcoma virus during or immediately after synthesis and is present in both soluble and membrane-bound forms of the protein.
Mol.Cell.Biol. **4** : 2697-2704.

- CANAANI,E., O.DREAZEN, A.KLAR, G.RECHAVI, D.RAM, J.B.COHEN and D.GIVOL. (1983). Activation of the c-mos oncogene in a mouse plasmocytoma by insertion of an endogenous intracisternal A-particle genome.
Proc. Natl. Acad. Sci.: **80** 7118-7122.

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

- CAUBET,J.F., A.GEGONNE, D.STEHELIN et R.BERGER. (1986). Localisation anormale du proto-oncogène c-ets1 dans une leucémie aigüe avec translocation.
C.R.ACAD. SCI. PARIS **302** : 16

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

- CHARDIN,P and A. TAVITIAN (1986). The ral gene: a new ras related gene isolated by the use of a synthetic probe.
EMBO J. **5** : 2203-2208.

- CHEN,H.R. and W.C. BARKER. (1984). Nucleotide sequences of the retroviral long terminal repeats and their adjacent regions.
Nucleic acid research **12** : 1767-1778.

- CHEN,S.J., N.J.HOLBROOK, K.F.MITCHELL, C.A.VALLONE, J.S.GREENGARD, G.R.GRABTREE and Y.LIN. (1985). A viral long terminal repeat in the interleukin 2 gene of a cell line that constitutively produces interleukin 2.
Proc. Natl. Acad. Sci. **82** : 7284-7288.

- 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 3T3 cells by a human c-sis cDNA clone.
Nature **308** : 464-467.

- COCHET,C., G.N. GILL, J. MEISENHELDER, J.A. COUPER, and T. HUNTER.(1984). C-kinase phosphorylates the epidermal growth factor receptor and reduces its epidermal growth factor-stimulated tyrosine protein kinase activity.
Mol. Biol. Virol. **259** : 2553-2558.

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

- COLBY,W.W., E.Y.CHEN, D.H.SMITH and A.D.LEVISON. (1983). Identification and nucleotide sequence of a human locus homologous to the v-myc oncogene of avian myelocytomatosis virus MC29.
Nature **301** : 722-724.

- COLL,J., S.SAULE, P.MARTIN, M.B.RAES, C.LAGROU, T.GRAF, B.BEUG, I.E. SIMON and D.STEHELIN. (1983a). 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

- COLL,J., M.RIGHI, C.deTAISNE, C.DISSOUS, A.GEGONNE,. and D.STEHELIN. (1983b). 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

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

- COLLINS,S. and M. GROUDINE. (1983). Rearrangement and amplification of c-abl sequences in the human chronic myelogenous leukemia cell line K562.
Proc. Natl. Acad. Sci. **80** : 4813-4817

- COOPER,C.S., M.PARK, D.G.BLAIR, M.A.TAINSKY, K.HUCHNER, C.M.CROCE and G.F.van de WOODE. (1984). Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed human cell line.
Nature **311** : 29-33.

- CORCORAN,L.M., J.M.ADAMS, A.R.DUNN and S.CORY. (1984). Murine T lymphomas in which the cellular myc oncogene has been activated by retroviral insertion.
Cell **37** : 113-122.

- COURTNEIDGE,S.A. and J.M.BISHOP. (1982). Transit of $pp60^{v-src}$ to the plasma membrane.
Proc. Natl. Acad. Sci. **79** : 7117-7121.

- COUSSENS,L., C.Van BEVEREN, D.SMITH, E.CHEN, R.L.MITCHELL, C.M.ISACKE, I.M.VERMA and A.ULLRICH. (1986). Structural alteration of viral homologue of receptor proto-oncogene fms at carboxyl terminus.
Nature **326** : 277-280.

- CROCE,C.M., W.THIERFELDER, J.ERIKSON, K.NISHIKURA, J.FINAN, G.M.LENOIR, and P.C.NOWELL. (1983). Transcription activation of an unrearranged and untranslated c-myc oncogene by translocation of a C lambda locus in Burkitt lymphoma cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80** : 6922-6926.

- CROSS,MFD.R. and H.HANAFUSA. (1983). Local mutagenesis of Rous sarcoma virus : The major sites of tyrosine and serine phosphorylation for $pp60^{src}$ are dispensable for transformation.
Cell **34** : 597-607.

- CROSS,F.R., E.A.GARBER, D.PELLMAN and H.HANAFUSA.M (1984). A.short sequence in the $p60^{src}$ N-terminus is required for $p60^{src}$ myristylation and membrane association and for cell transformation.
Mol. Cell. Biol. **4** : 1834-1842.

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

- CUYPERS, H.T., G.SELTEN, W.QUINT, M.ZIFLSTRA, E.R.MAANDAG, W.BOELENS, P.van WEZENBEEK, C.MELIEF and A.BERNS. (1984). Murine leukemia virus-induced T-cell lymphomagenesis integration of proviruses in a distinct chromosomal region.
Cell **37** : 141-150.

- DAHLBERG,J.E., R.C.SAWYER, 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 species of 4S RNA which serves as primer.
Virol.09Y **13**, 1126-1133.

- DARLIX,J.L. (1986). Control of Rous sarcoma virus RNA translation and packaging by the 5' and 3' untranslated sequences.
J.Mol. Biol. **189** : 421-434.

- DAVIES, R.L., V.A.GROSSE, R.KUCHERLAPATI, and M.BOTHWELL. (1980). Genetic analysis of epidermal growth factor action : Assignment of human epidermal growth factor receptor gene to chromosome 7.
Proc. Natl. Acad. Sci. **77** : 4188-4192.

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

- DeKLEIN,A., A.GUERTSVANKESSEL., G.GROSSVEL, C.R.BARTRAM, A.HAGEMEYER, B.BOOTSMA, N.K.SPURR, N.HEISTERKAMP, J.GROFFEN, J.R.STEPHENSON. (1982). A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukemia.
Nature **300** : 765-767

- DER,J.C., T.C.KRONTIRIS and G.M.COOPER. (1982). Transforming gene of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses.
Proc. Natl. Acad. Sci. **79** : 3637-3640.

- 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.

- DHAR,R., W.L.Mc CLEMENTS, L.W.ENQUIST and G.F.VANDEWOODE. (1980). Nucleotide sequences of integrated moloney sarcoma provirus long terminal repeats and their host and viral junctions.
Proc. Natl. Acad. Sci. **77**: 3937-394.

- DHAR, R., R.ELLIS, T.Y.SHIH, S.OROSZLAN, B.SHAPIRO, J.MAIZEL, D.LOWY, and E.SCOLNICK. (1982). Nucleotide sequence of the p21 transforming protein of Harvey murine sarcoma virus.
Science **217** : 934-937.

- DHAR,R., A.NIETO, R.KOLLER, R.D.DEFEO-JONES, P.ROBINSON, G.TEMELES, and E.M. SCOLNICK. (1984). Nucleotide sequence of two H-ras-related genes isolated from the yeast Saccharomyces cerevisiae.
Nucleic Acid Research **12** : 3611.

- DIAZ,M.O., M.LE BEAU, P.PITHA and J.D.ROWLEY. (1986). Interferon and c-ets-1 genes in the translocation (9;11) (p22;q23) in human acute monocytic leukemia.
Science **231** : 265-267.

- DIGGELMANN,H. (1979). Biosynthesis of an unglycosylated envelope glycoprotein of Rous sarcoma virus in the presence of tunicamycin.
J. Virol. **30** : 799-804.

- DITTMAR,K.J. and M.MOELLING. (1978). Biochemical properties of p15-associated protease in an avian RNA tumor virus.
J.Virol. **28** : 106-118.

- 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.

- 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** : 521-527.

- DRABKIN,H.A., C.BRADLEY, I.HART, J.BLESKAN, F.P. LI and d.patterson. (1985). Translocation of c-myc in the hereditary renal cell carcinoma associated with a t(3;8) (p14.2;q24.13) chromosomal translocation.
Proc. Natl. Acad. Sci. **82** : 6980-6984.

- DUESBERG,P.H., K.BISTER, and C.MOSCOVICI. (1980). Genetic structure of avian myeloblastosis virus, released from transformed myeloblasts as a defective virus particle.
Proc. Natl. Acad. Sci. **77** : 5120-5124.

- DUESBERG, P.H. (1983). Retroviral transforming genes in normal cells
Nature **304** : 219-226.

- DURBAN,E.M. and D.BOETTIGER. (1981). Differential effects of transforming avian RNA tumor viruses on avian macrophages.
Proc. Natl. Acad. Sci. **78** : 3600-3604.

- EISENMAN,R., W.NM.BURNETTE, F.ZUCCO, H.DIGGELMANN, P.HEATER, P.TSICHLIS, and J.COFFIN. (1980). Synthesis and processing of the internal structural proteins of retroviruses : Sites of synthesis, evidence for multiply charged species, and analysis of a mutant defective in processing.
In Biosynthesis, modification and processing of cellular and viral polyproteins (ed. G.KOCH and D.RICHTER). Academic Press. New York. (In press).

- EISENMAN,R.N., C.Y.TACHIBANA, H.D.ABRAMS and S.R.HANN. (1985). v-myc and c-myc-encoded proteins are associated with the nuclear matrix.
Mol.Cell.Biol. **5** : 114-126

- ENGLAND, J.M., D.P.BOLOGNESI, B.DIETZSCHOLD, and M.S.HALPERN. (1977). Evidence that a precursor glycoprotein is cleaved to yield the major glycoprotein of avian tumor virus.
J. Virol. **21** : 810-814.

- EVA,A., K.C.ROBBINS, P.R.ANDERSEN, A.SRINIVASAN, S.R.STRONICK, 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.

- EVA,A. and S.A.AARONSON. (1985). Isolation of a new human oncogene from a diffuse B-cell lymphoma.
Nature **316** : 273-275.

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

- FASANO,O., D.BIRNBAUM, L.EDLUND, J.FOGH and M.WIGLER. (1984). New human transforming genes detected by a tumorigenicity assay.
Mol. Cell. Biol. **40** : 1695-1705.

- FINKEL,T. and G.M.COOPER. (1984). Detection of a molecular complex between ras proteins and transferrin receptor.
Cell **36** : 1115-1121.

- FLEISSNER,E. and E.TRESS. (1973). Isolation of a ribonucleoprotein structure from oncornaviruses.
J.Virol **12** : 1612-1615

- FRYKBERG,L., S.PLAMIERI, H.BEUG, T.GRAF, M.J.HAYMAN and B.VENNSTROM. (1983). Transforming capacities of avian erythroblastosis virus mutants deleted in the erbA or erbB oncogenes.
Cell **32** : 227-238.

- FUNG,Y.K.T., W.G.LEWIS, L.B.CRITTENDEN and H.J.KUNG. (1983). Activation of the cellular oncogene c-erbB by LTR insertion : molecular basis for erythroblastosis by avian leukosis virus.
Cell **33** : 357 -368

- FURTH,M., L.J.DAVIS, B. FLEURDELYS, and E.M.scolnick. (1982). Monoclonal antibodies to the P21 products of the transforming gene of Harvey murine sarcoma virus and of the cellular ras gene family.
J.Virol. **43** : 294-304.

- FURUICHI,Y., A.J.SHATKIN, E.STAVNEZER, and J.M.BISHOP. (1975). Blocked methylated 5 terminal sequence in avian sarcoma virus RNA.
Nature **257,** 618-620.

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

- GAMETT,D.C., S.E.TRACY and H.L.ROBINSON. (1986). Differences in sequences encoding the carboxy-terminal domain of the epidermal growth factor receptor correlate with differences in the disease potential of viral erbB genes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83** : 6053-6057

- GARCIA,M., R.WELLINGER, A.VERZAK and H.DIGGELMANN. (1986). A new site of integration for mouse mammary tumor virus proviral DNA common to Balb/cf (c3h) mammary and kidney adenocarcinomas.
EMBO J. **5** : 127-134.

- GARNIER,J., D.J.OSGUTHORPE and B.ROBSON. (1978). Analysis of the accuracy and implication of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins.
J.Mol.Biol. **120** : 97-120.

- 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.

- GAZZOLO,L., J.SAMARUT, M.BOUABDELLI and J.P.BLANCHET. (1980). Early precursors in the erythroid lineage are the specific target cells of avian erythroblastosis virus in vitro.
Cell **22** : 683-691.

- GHYSDAEL,J., A.GEGONNE, P.POGNONEC, D.DERNIS, D.LEPRINCE and D.STEHELIN. (1986). Identification of preferential expression in thymic and bursal lymphocytes of a c-ets oncogene encoded Mr-54000 cytoplasmic protein.
Proc. Natl. Acad. Sci. **83** : 1714-1718.

- GIBBS,J.B., I.S.SIGAL, M.POE and E.M.SCOLNICK. (1984). Intrinsic GDPase 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 test of crucial aspects.
Cell **18** : 93-100.

- 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.

BU LILLE

- GILMORE,T.D. and H.TEMIN. (1986). Different localization of the product of the v-rel oncogene in chicken fibroblasts and spleen cells correlates with transformation by REV-T.
Cell **44** : 791-800.

- GOFF,S.P., P.D'EUSTACHIO, F.H.RUDDLE and D.BALTIMORE. (1982). Chromosomal assignment of the endogenous proto-oncogene c-abl.
Science **218** : 1317-1319.

- GONDA,T.J., D.K.SHEINESS, L.FANSHIER and J.M.BISHOP. (1981). The genome and the intracellular RNAs of avian myeloblastosis virus.
Cell **23** : 279-290.

- 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.

- GONDA,T.J, N.M.GOUGH, A.R.DUNN and J.DE BLAQUIERE. (1985). Nucleotide sequence of cDNA clones of the murine myb proto-oncogene.
EMBO J. **4** : 2003-2008.

- GOUBIN,G., D.S.GOLDMAN, J.LUCE, P.E.NEIMAN and G.M.COOPER. (1983). Molecular cloning and nucleotide sequence of a transforming gene detected by transfection of chicken B-cell lymphoma DNA.
Nature **302** : 114-119.

- GOUSTIN, A.J., E.B.LEOF, G.D.SIPLEY and H.L.MOSES. (1986). Growth factors and proc. Natl. Acad. Sci. **77** : 5351-5354.

- GRAF,T. and H.BEUG. (1983). Role of the v-erbA and v-erbB oncogenes of avian erythroblastosis virus in erythroid cell transformation.
Cell **34** : 7-9.

- GRAF,T., F.VONWEIZSAECKER, 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 **45**:357-364

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

- GREENBERG,R., R.HAWLEY and K.B.MARCU. (1985). Acquisition of an intracisternal A-particle element by a translocated c-myc gene in a Murine plasma cell tumor.
Mol. Cel. Biol. **5** : 3625-3628.

- GRIFFIN,C.A., C.McKEON, M.A.ISRAEL, A.GEGONNE, J.GHYSDAEL, D.STEHELIN, E.C.DOUGLASS, A.A.GREEN, and B.S.EMANUEL. (1986). Comparison of constitutional and tumor-associated 11;22 translocations : nonidentical breakpoints on chromosomes 11 and 22.
Proc. Natl. Acad. Sci. **83** : 6122-6126.

- GROFFEN,J., J.R.STEPHENSON, N.HEISTERKAMP, A.de KLEIN, C.R.BARTRAM and G.GROSVELD. (1984). Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr on chromosome 22.
Cell **36** : 93-99.

- 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.

- HARPER,J.R., D.R.ROOP and S.H.YUSPA. (1986). Transfection of the Ej ras^{Ha} gene into keratinocytes derived from carcinogen-induced mouse papillomas causes malignant progression.
Mol. Cell. Biol. **6** : 3144-3149.

- 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.

- HAYMAN,M.J., G.KITCHENER, P.K.VOGT and H.BEUG. (1985). The putative transforming protein of S13 avian erythroblastosis virus is a transmembrane glycoprotein with an associated protein kinase activity.
Proc. Natl. Acad. Sci. **82** : 8237-8241.

- 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 **209** : 475-479.

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

- HEISTERKAMP,N., K.STAMP, J.GROFFEN, A.de KLEIN and G.GROSVELD. (1985). Structural organization of the bcr gene an its role in the ph' translocation.
Nature **315** : 758-761.

- HISHINUMA, F., P.J.DEBONA, S.ASTRIN and A.M.SKALKA. (1981). Nucleotide sequence of acceptor site and termini of integrated avian endogenous provirus ev1: integration creates a 6 bp repeat of host DNA.
Cell **23** : 155 164.

- HOFFMAN,F.M., L.D.FRESCO, H.HOFFMAN-FALK and B.Z.SHILO. (1983). Nucleotide sequence of the Drosophila src and abl homologs : Conservation and variability in the src family oncogenes.
Cell **32** : 589-598.

- HOFFMAN-FALK,H., P.EINAT, B-Z.SHILO and F.M.HOFFMAN. (1983). Drosophila melanogaster DNA clones homologous to vertebrate oncogenes : evidence for a common ancestor to src and abl cellular genes.
Cell **32** : 589-598.

- 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.

- HUANG,K.S., B.P.WALLNER, R.J.MATTALIANO, R.TIZARD, C.BURNE, A.FREY, C.HESSION, P.McGRAY, L.K.SINCLAIR, E.PINGCHANG CHOW, J.L.BROWNING, K.L.RAMACHANDRAN, J.TANG, J.E.SMART, and R.B.PEPINSKY. (1986). Two human 35 KD inhibitors of phospholipase A2 are related to substrates of $pp60^{v\text{-}src}$ and of the epidermal growth factor receptor/kinase.
Cell, **46** : 191-199.

- 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. and J.A.COOPER. (1981). Epidermal growth factor induces rapid tyrosine phosphorylation of proteins in A431 human tumor Cells.
Cell, **24** : 741-752.

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

- HURLEY,J.B., M.I.SIMON, D.B.TEPLOW, J.D.ROBISHAW, and A.G.GILMAN. (1984). Homologies between signal transducing G proteins and ras gene products.
Science **226** : 860-862.

- IBA,H., T.TAKEYA, F.R.CROSS, T.HANAFUSA and H.HANAFUSA. (1984). Rous sarcoma virus variants that carry the cellular src gene instead of the viral src gene cannot transform chicken embryo fibroblasts.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **81** : 4424-4429.

- IKAWA,S., K.HAGINO-YAMAGISCHI, S.KAWAI, T.YAMAMOTO and K.TOYOCHIMA. (1986). Activation of the cellular src gene by transducing retrovirus.
Mol. Cell. Biol. **6** : 2420-2428

- JOHNSSON,A., C.H.M.HELDIN, A.WASTESON, B.WESTERMARK, D.F.DEUEL, J.S.HUANG, P.H.SEEBURDG, A.GRAY, A.ULLRICH, G.SCRACE, P.STROOBANT,et 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, C.H.HELDIN and B.WESTERMARK. (1986). The phenotypic characteristics of simian sarcoma virus-transformed human fibroblasts suggest that the v-sis gene product acts solely as a PDGF receptor agonist in cell transformation.
EMBO J. **5** : 1535-1541.

- JOLICOEUR,P., L.VILLENEUVE, E.RASSART and C.KOZAK. (1985). Mouse chromosomal mapping of a murine leukemia virus integration region (Mis-1). First identified in rat thymic leukemia.
J.Virol. **56** : 1045-1048.

- KAHN,P., B.ADKINS, H.BEUG, and T.GRAF, (1984). Src- and fps-containing avian sarcoma viruses transform chicken erythroid cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, in press

- KAHN,P., L.FRYKBERG, C.BRADY, I.STANLEY, H.BEUG, B.VENNSTROM and T.GRAF. (1986). v-erbA cooperates with sarcoma oncogenes in leukemic cell transformation.
Cell **45** : 349-356.

- KAMPS,M.P., S.S.TAYLOR and B.M.SEFTON. (1984). Direct evidence that oncogenic tyrosine kinases and cyclic AMP-dependent protein kinases have homologous ATP-binding sites.
Nature **310** : 589-592.

- KAMPS,M.P., J.E.BUSS, and B.M.EFTON. (1985). Mutation of NH2 -terminal glycine of p60 ^{src} prevents both myristoyldation and morphological transformation.
Proc. Natl. Acad. Sci. **82** : 4625-4628

- KAMPS,M.P, J.E.BUSS, and B.M.SEFTON. (1986). Rous sarcoma virus transforming protein lacking myristic acid phosphorylates known polypeptide substrates without inducing transformation.
Cell **45** : 105-112.

- .KATZEN.A.L., T.B.KORNBERG and J.M.BISHOP. (1985). Isolation of the proto-oncogene c-myb from D.Melanogaster.
Cell **41** : 449-456

- 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.

- KING,R.C., M.H.KRAUS and S.A.AARONSON. (1985). Amplification of a novel v-erbB related gene in a human mammary carcinoma.
Science **229** : 974-976.

- KLEIN,G. (1983). Specific chromosomal translocations and the genesis of B-cell derived tumors in mice and men.
Cell **32** : 311-315.

- KLEMPNAUER,K.H., T.J.GONDA and J.M.BISHOP. (1982). Nucleotide sequence of the retrovirus leukemia gene v-myb and its cellular progenitor c-myb : the architecture of a transduced oncogene.
Cell **31** : 453-463.

- KLEMPNAUER,K.H., G.RAMSAY, J.M.BISHOP, M.G.MOSCOVICI, C.MOSCOVICI, J.P.McGRATH and A.D.LEVINSON. (1983). The product of the retroviral transforming gene v-myb is a truncated version of the protein encoded by the cellular oncogene
Cell **33** : 345-355

- 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.

- KLEMPNAUER, K.H. and A.E. SIPPEL.(1986). Subnuclear localization of proteins encoded by the oncogene v-myb and its cellular homolog c-myb.
Mol. Cell. Biol. **6** : 62-69.

- KLEMPNAUER,K.H., C.BONIFER, and A.E.SIPPEL. (1986a). Identification and characterization of the protein encoded by the human c-myb proto-oncogene.
EMBO J. **8** : 1911-1986.

- KLEMPNAUER,K.H., H.BIEDENKAPP, C.BONIFER, C.PETERS and A.E.SIPPEL. (1986b). Aminoacid sequences close to the aminoterminus of viral myb protein are involved in DNA-binding.
Second Annual Meeting on Oncogenes p 244

- KMIECIK,T.E. and D.SHALLOWAY. (1986). $pp60^{src}$ transforming activity is activated by mutation at its major site of in vivo tyrosine phosphorylation and suppressed by mutation at its site of autophosphorylation.
Second Annual Meeting on Oncogenes p2

- KOHL,N.E., E.LEGOUY, R.A.DePINHO, P.D.NISEN, R.K.SMITH, C.E.GEE and F.W.ALT. (1986). Human N-myc is closely related in organization and nucleotide sequence to c-myc.
Nature **319** : 73 -77.

- 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.

- LANE,M.A., A.SAINTEN, K.M.DOHERTY and M. COOPER. (1984). Isolation and characterization of a stage specific transforming gene, Tlym-1 form t cell lymphomas.
Proc. Natl. Acad. Sci. **81** : 2227-2231

- LEBEAU,M.M., C.A.WESTBROOK, M.O.DIAZ and J.D.ROWLEY, and M.OREN. (1985). Translocation of the p53 gene in t (15:17) in acute promyelocytic leukaemia.
Nature **316** : 826-828.

- LEUTZ,A.,H. BEUG, and T.GRAF. (1984). Purification and characterization of cMGF, a novel chicken myelomonocytic growth factor.
EMBO J.

- LEVINSON,A.D., S.A.COURTNEIDGE and J.M.BISHOP. (1981). Structural and functional domains of the Rous sarcoma virus transforming protein ($pp60^{src}$).
Proc.Natl. Acad. Sci. **78** : 1624-1628.

- LEVY,J.B., H.IBA and H.HANAFUSA. (1986). Activation of the transforming potential of $p60^{c\text{-}src}$ by a single amino acid change.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83** : 4228-4232.

- LIBERMANN,T.A., H.R.NUSBAUM, N.RAZOU, R.KRIS, I.LAX, H.SOREQ, N.WHITTLE, M.D.WATERFIELD, A.ULLRICH and J.SCHLESSINGER. (1985). Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumours of glial origin.
Nature **313** : 144-147.

- LINN,C.R., V.CHEN, W.KRUIGER, L.S.STOLARSKY, W.WEBER, R.M.EVANS, I.M.VERMA, G.N.GILL and M.G.ROSENFIELD. (1984). Expression cloning of human EGF receptor complementary DNA : gene amplification and three related messanger RNA products in A431 cells.
Science **224** : 843-848.

- LIN,R.C., W.S.CHEN, C.S.LAZAR, C.D.CARPENTER, G.N.GIO, R.M.EVANS and M.G.ROSENFELD. (1986). Protein kinase C phosphorylation at Thr 654 of the unoccupied EGF receptor and EGF binding regulate functional receptor loss by independent mechanisms.
Cell **44** : 839-848.

- 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.

- MANESS,P.F. and B.T.LEVY. (1983). Highly purified $PP60^{src}$ induces the action transformation in microinjected cells and phosphorylates selected cytoskeletal proteins in vitro
Mol. Cell. Biol. **3** : 102-111.

- MANNE,V., E.BEKESI, and H.F.KUNG.(1985). Ha-ras proteins exhibit GTPase activity : point mutations that activate Ha-ras products result in decreased GTPase activity.
Proc. Natl. Acad. Sci. **82** : 376-380.

- MARTIN-ZANCA,D., S.H.HUGHES and M.BARBACID. (1986). A human oncogene formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences.
Nature **319** : 743-748.

- 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.

- MATHIS,D.J. and P.CHAMBON. (1981). The SV40 early region TATA box is required for accurate in vitro initiation of transcription.
Nature **290** : 310-315.

- 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** : 644-650.

- MITCHELL, B. (1984). Oncogenes and inositol lipids.
Nature **308** : 770.

MOELLING, K. and M.HAYAMI. (1977). Analysis of precursors to the envelope glycoproteins of avian RNA tumor viruses in chicken and quail cells.
J.Virol. **22** : 598-607.

- 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.

- MONTELARO,R.C., S.J.SULLIVAN and D.P.BOLOGNESI. (1978). An analysis of type-C retrovirus polypeptides and their associations in the virion.
Virology **84** : 19-31

- MONTELL,C., E.F. FISHER, M.H.CARUTHERS and A.J.BERK. (1983). Inhibition of RNA cleavage but not polyadenylation by a point mutation in mRNA 3' consensus sequence AAUAAA.
Nature **305** : 600-605.

- MOSCOVICI,C., J.SAMARUT, L.GAZZOLO and M.G.MOSCOVICI. (1981). Myeloid and erythroid neoplastic responses to avian defective leukemia viruses in chickens and in quail.
Virology **113** : 765-768.

- MOSCOVICI,M.G., P.JURDIC, J.SAMARUT, L.GAZZOLO, C.V.MURA and C.MOSCOVICI. (1983). Characterization of the hemopoietic target cells for the avian leukemia virus E26.
Virology **129** : 65-78.

- MOUNT,S.M. A catalogue of splice junction sequences.
Nucl. Acids. Res. (1982) **10** : 459-472.

-MOUNTZ,MJ.D., A.D.STEINBERG, D.M.KLINMAN, H.R.SMITH. (1984) .Autoimmunity and increased c-myb transcription.
Science **226** : 1087-1089

- MULCAHY,L.S. M.R.SMITH and W.STACEY. (1985). Requirement for ras proto-oncogene function during serum-stimulated growth of NIH 3T3 cells.
Nature **313** : 241-243.

- 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.

- NAKAMURA,K.D., and M.J.WEBER. (1982). Phosphorylation of a 36,000 Mr cellular protein in Cells infected with partial transformation mutants of Rous sarcoma virus.
Mol. Cell. Biol. **2** : 147-153.

- NAU,M.M., B.J.BROOKS, J.BATTEY, E.SAUSVILLE, A.F.GAZDAR, I.R.KIRSCH, O.W.Mc BRIDE, V.BERTNESS, G.F.HOLLIS and J.D.MINNA. (1985). L-myc a new myc-related gene amplified and expressed in human small cell lung cancer.
Nature **318** : 69-73.

- NAWROCKI,J.F., A.F.LAU, and A.J.FARAS. (1984). Correlation between phosphorylation of a 34,000-molecular-weight protein, $pp60^{src}$-associated kinase activity and tumorigenicity in transformed and revertant vole cells.
Mol. Cell. Biol. **4** : 212-215.

- 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.

- NEUMAN-SILBERBERG, F.S., E.SCHEJTER, F.M.HOFFMANN and B-Z.SHILO. (1984). The drosophila ras oncogenes : structure and nucleotide sequence.
Cell **37** : 1027-1033.

- NIENHUIS,A., W.H.F.BUNN, P.H.TURNER, T.V.GOPAL, W.G.NASH, S.J.O'BRIEN and C.J.SHERR. (1985). Expression of the human c-fms proto-oncogene in hematopoietic cells and its deletion int he $5q^-$ syndrome.
Cell **42** : 421-428.

- 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.

- 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.

- NUNN,M.F., P.H.SEEBERG, C.MOSCOVICI and P.H.DUESBERG. (1983). Tripartite structure of the avian erythroblastosis virus E26 transforming gene.
Nature **306** : 391-395.

- NUNN,M., H.WEIHER, P.BULLOCK and P.DUESBERG. (1984). Avian erythroblastosis virus E26 : nucleotide sequence of the tripartie onc gene and of the LTR, and analysis of the cellular prototype of the viral ets sequence.
Virology **139** : 330-339.

- NUNN,M.F., T.GRAF and T.HUNTER. (1986). The ets oncogene is required for E26 induced erythroblastosis.
Second Annual Meeting on Oncogenes p262

- 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.

- PADUA,R.A., N.BARRAS and G.A.CURRIE. (1984). A novel transforming gene in a human malignant melanoma cell line.
Nature **311** : 671-673.

- PANET.A., W.A.HASELTINE, D.BALTIMORE, G.PETERS, F.HARADA, and J.E.DAHLBERG. (1975). Specific binding of tryptophan transfer RNA to avian myeloblastosis virus RNA- dependant DNA polymerase (reverse transcriptase).
Proc. Natl. Acad. Sci. **72** : 2535-2539.

- 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.

- PATSCHINSKY,T., B.SCHROEER and K.BISTER. (1986). Protein product of proto-oncogene c-mil.
Mol. Cell. Biol. **6** : 739-744.

- 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.

- PERRY,R.P. (1983). Consequences of myc invasion of immunoglobulin loci : facts and speculation.
Cell **33** : 647-649.

- PESSANO,S., L.GAZZOLO, and C.MOSCOVICI. (1979). The effect of a tumor promoter on avian leukemic cells.
Microbiologica **2** : 379-392.

- PETERS,G.C., C.KOZAK and C.DICKSON. (1984). Mouse mammary tumor virus integration regions int-1 and int-2 map on different mouse chromosomes.
Mol. Cell. Biol. **4** : 375-378.

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

- PINCUS,M.R., J.VAN RENSWOUDE, J.B.HARFORD, E.H.CHANG, R.P.CARTY, and R.D.LAUSNER. (1983). Prediction of the three-dimensional structure of the transforming region of the EJ/T24 human bladder oncogene and its normal cellular homologue.
Proc. Natl. Acad. Sci. **80** : 5253-5257.

- POWERS,S., T.KATAOKA, O.FASANO, M.GOLDFARB, J.STRATHERN, J.BROACH and M.WIGLER. (1984). Genes in S.cerevisiae encoding proteins with domains homologous to the mammalian ras proteins.
Cell **36**: 607-612.

- PRIBYL,L.J., D.K.WATSON, M.J.McWILLIAMS, R.ASCIONE, J.G.CHIRIKJIAN and T.S.PAPAS. (1986). Characterization of the ets-2 gene in drosophila melanogaster.
Second Annual Meeting on Oncogenes p259.

-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 foms.
J.Biol. Chem. **257** : 5154-5160.

- RAISNES,M.A., W.C.LEWIS, L.B.CRITTENDEN and H.J.KUNG. (1985). c-erbB activation in avian leukosis virus-induced erythroblastosis: clustered integration sites and the arrangement of provirus in c-erbB alleles.
Proc. Natl. Acad. Sci. **82** : 2287-2291.

- RALSTON,R. et J.M.BISHOP. (1983). The protein products of the myc and myb oncogenes and adenovirus E1a are structurally related.
Nature **306** : 803-806.

- 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.

-.REICH,N., M.OREN and A.LEVINE. (1983). Two distinct mechanisms regulate the levels of a cellular tumor antigen, p53.
Mol. and Cell. Biol. **12** : 2143-2150.

- 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, et 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.

- ROBERTSON,M. (1983). What happens when cellular oncogenes collide whith immunoglobulin genes
Nature **300** : 149-152.

- 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.

- ROSSON,D. and P.REDDY. (1986). Nucleotide sequence of chicken c-myb complementary DNA and implications for myb oncogene activation.
Nature **319** : 604-606.

- 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 haematopoietic cell transformation.
Nature **281** : 452-455

- ROVIGATTI,U, D.K.WATSON, J.YUNIS. (1986). Amplification and rearrangement of hu-ets-1 in leukemia and lymphoma with involvement of 11q23.
Science **232** : 398-400.

- ROZENGURT,E. (1986) Early signals in the mitogenic response.
Science **234** : 161-166

- RULEY,E.M.H. (1983). Adenovirus early region 1A enables viral and cellular transforming genes to transform primary cells in culture.
Nature **304** : 602-606.

- RUSHLOW,K.E., I.A.LAUTENBERGER, T.S.PAPAS, M.A.BALUDA, B.PERBAL, I.G.CHIRIKJIAN and E.P.REDDY. (1982). Nucleotide sequence of the transforming gene of avian myeloblastosis virus.
Science **216** : 1421-1423

- SACCHI,N., D.K.WATSON, H.M.G.van KERSEL, A.HAGEMEIGER, J.KERSEY, H.D.DRABKIN, D.PATTERSON and T.S.PAPAS. (1986). Hu-ets-1 and Hu-ets-2 genes are transposed in acute leukemias with (4;11) and (8;21) translocations.
Science **231** : 379-382.

- SAKAMOTO,H., M.MORI, M.TAIRA, T.YOSHIDA, S.MATSUKAWA, K.SHIMIZU, M.SEKIGUCHI, M.TERADA and T.SUGIMURA. (1986). Transforming gene from human stomach cancers and a non cancerous portion of stomach mucrosa.
Proc. Natl. Acad. Sci. **83** : 3997-4001.

- SAMARUT,J. and M.BOUABDELLI. (1980). In vitro development of CFU-E and BFU-E in cultures of embryonic and post-embryonic chicken hematopoietic cells.
J.Cell.Physiol. **105** : 553-565

- SAMARUT,J. and L.GAZZOLO. (1982). Target cells infected by avian erythroblastosis virus differentiate and become transformed.
Cell **28** : 921-929.

- 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., E.P.REDDY, S.PULCIANI, R.J.FELDMAN and M.BARBACID. (1983). Spontaneous activation of a human proto-oncogene.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80** : 4679.

- SAP,J., A.MUNOZ, K.DAMM, Y.GOLBERG, J.GHYSDAEL, A. LEUTZ, H. BEUG, and B.VEENSTROM. (1986). The c-erb A protein is a high-affinity recepteur for thyroid hormone.
Nature **324** : 635-640

- SCHLESINGER,M.J. (1976). Formation of an infectious virus-antibody complex with Rous sarcoma virus and antibodies directed against the major virus glycoprotein.
J.Virol. **17** : 1063-1067

- SCHWAB,M., K.ALITALO, K-H.KLEMPNAUER, H.E.VARMUS, J.M.BISHOP, F.GILBERT, G.BRODEUR., M.GOLSTEIN and J.TRENT. (1983a). Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by tumor.
Nature **305** : 245-248.

- SCHWAB,M., K.ALITALO, H.E.VARMUS, J.M.BISHOP and D.GEORGE. (1983b). A cellular oncogene (c-Ki-ras) is amplified, overexpressed in mouse adrenocortical tumour cells. Nature **303** : 497-501.

- SCHWAB,M., H.E.VARMUS, J.M.BISHOP, K.H.GRZESCHIK, S.L.NAYLOR, A.Y.SAKAGUCHI, G.BRODEUR and J.TRENB. (1984). Chromosome localization in normal human cells and neuroblastomas of a gene related to c-myc.
Nature **308** : 288-291.

- SCHWARTZ, D.E., P.C.ZAMECNIK and H.L.WEITH. (1977). Rous sarcoma virus genome is terminally redundant: the 3' sequence.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **74,** 994- 998.

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

- SEFTON,B.M., I.S.TROWBRIDGE, J.COOPER and E.M.SCOLNICK. (1982). The transforming proteins of Rous sarcoma virus, Harvey sarcoma virus and Abelson virus contain tightly bound lipid.
Cell **31** : 465-474.

- 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.

- SHEINESS,D. and M.GARDINIER. (1984). Expression of a proto-oncogene (proto-myb) in hemapoietic tissues of mice.
Mol. Cell. Biol. **4** : 1206-1212.

- SHEN-ONG, G.L.C.POTTEV, J.F.MUSHINSKI, S.LAVU, E.P.REDDY, (1984). Activation of the c-myb locus by viral insertional mutagenesis in plasmacytoid lymphosarcoma.
Science **226** : 1077-1080.

-SHEN-ONG,G.L.C., H.C.MORSE III, M.POTTER and J.F.MUSHINSKI. (1986). Two modes of c-myb activation in virus-induced mouse myeloid tumors.
Mol.Cell. Biol. **6** : 380-392.

- 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., J.YOKOTA and Y.VEYAMA. (1985). Amplification and expression of a cellular oncogene (c-myc) in human gastric adenocarcinoma cells.
Mol. Cell. Biol. **5** : 414-418.

- 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.

- SHIH,T., P.STOKES, G.SMYTHES, R.DHAR and S.OROSZLAN. (1982). Characterization of the phosphorylation sites and the surrounding amino acid sequences of the P21 transforming proteins coded for by the Harvey and Kirsten strains of murine sarcoma viruses.
J.Biol. Chem. **257** : 11767-11773.

- SHIMIZU,K., Y.NAKATSU, M.SEKIGUCHI, K.HOKAMURA, K.TANAKA, M.TERADA and T.SUGIMURA. (1985). Molecular cloning of an activated human oncogene, homologous to v-raf, from primary stomach cancer.
Proc. Natl. Acad. Sci. **82** : 5641-5645.

- SHOEMAKER, C., S.E.GOFF, M.PASKIND, S.W.MITRA and D.BALTIMORE. (1980). Structure of a cloned circular Moloney murine Leukemia virus DNA molecule containing an inverted segment: Implications for retrovirus integration.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**, 3932-3936.

- SHTIVELMAN,E., B.LIFSHITZ, R.P.GALE and E.CANAANI. (1985). Fused transcript of abl and bcr gene sin chronic myelogenous leukaemia.
Nature **315** : 550-554.

- SHTIVELMAN,E., B.LIFSHITZ, R.P.GALE, B.A.ROE and E.CANAANI. (1986). Alternative splicing of RNAs transcribed from the human abl gene and from the bcr-abl fused gene.
Cell **47** : 277-284.

- SIMON,M.A., T.B.KORNBERG and J.M.BISHOP. (1983). Three loci related to the src oncogene and tyrosine-specific protein kinase activity in Drosophila.
Nature **302** : 837-839.

- SLAMON,D.J., T.C.BOONE, D.C.MURDOCK, D.E.KEITH, M.F.PRESS, R.A.LARSON, L.M.SOUZA. (1986a). Studies of the human c-myb gene and its product in human acute leukemias.
Science **233** : 347-351.

- SLAMON,D.J., T.C.BOONE, R.C.SEEGER, D.E.KEITH, V.CHAZIN, H.C.LEE and L.M.SOUZA. (1986b). Identification and characterization of the protein encoded by the human N-myc oncogene.
Science **232** : 768-772

- SMITH,M.R., S.J.DEGUDICIBUS, D.W.STACEY. (1986). Requirement for c-ras proteins during viral oncogene transformation.
Nature **320** : 540-543.

- SOUZA,L.M., J.N.STROMMER, R.L.HILYARD, M.C.KOMAROMY and M.A.BALUDA. (1980). Cellular sequences are present in the presumptive avian myeloblastosis virus genome.
Proc.Natl.Acad.Sci, USA **77** : 5177-5181.

- SPANDIDOS,D.A.. (1985). Mechanism of Carcinogenesis : The Role of Oncogenes, Transcriptional Enhancers and Growth Factors.
Anticancer Research **5** : 485-498.

- SPURR,N.K., E.SOLOMON, M.JANSSON, D.SHEER, P.N.GOODFELLOW, W.F.BODME and B.VENNSTROM. (1984). Chromosomal localization of the human homologue to the oncogenes erbA and B.
EMBO J. **3** : 159-163.

- STANTON,L.W., R.WATT and K.B.MARCU. (1983). Translocation, breakage and truncated transcripts of c-myc oncogene in murine plasmacytomas.
Nature **303** : 401-405.

- STEHELIN,D., H.E.VARMUS, J.M.BISHOP, and P.K.VOGT, (1976). DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA.
Nature **260**, 170-173.

- STERN,J.B. and K.A.SMITH. (1986). Interleukin-2 induction of T-cell G1 progression and c-myb expression.
Science **233** : 203-206.

- STROMBERG,K., N.E.HURLEY, N.L.DAVIS, R.R.RUECHKERT, and E. FLEISSNER. (1974). Structural studies of avian myeloblastosis virus : Comparison of polypeptides in virion and core component by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.
J. Virol. **13** : 513-528.

-SUDOL,M.and H.HANAFUSA. (1986).Cellular proteins homologous to the viral yes gene product.
Mol. Cell. Biol. **6** : 2839-2846.

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

- SWEET,R.W., S.YOKOYAMA, T.KAMATA, J.R.FERAMISCO, M.ROSENBERG and M.GROSS. (1984). The product of ras is a GTPase and the T24 oncogenic mutant is deficient in this activity.
Nature **311** : 273-276.

- SYMONDS,G., K.H.KLEMPNAUER, G.I.EVAN, and J.M.BISHOP. (1984). 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.

- TAKAHASHI,M., J.RITZ and G.M.COOPER. (1985). Activation of a novel human transforming gene, ret, by DNA rearrangement.
Cell **42** : 581-588.

- 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., K.SHIMIZU, M.GOLDFARB and M.WIGLER. (1983). Structure and activation of the human N-ras gene.
Cell **34** : 581-586.

- TAYLOR,J.M., R.ILLMENSEE, and J.SUMMERS. (1976). Efficient transcription of RNA into DNA by avian sarcoma virus polymerase.
Biochim. Biophys. Acta **442**, 324-330.

- TEMIN,H.M. et S.MIZUTANI. (1970) RNA directed DNA polymerase in virions of Rous Sarcoma Virus.
Nature **226** : 1211-1213.

-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.

- TSICHLIS,P.N., M.A.LOHSE, C.SZPIRER, J.SZPIRER and G.LEVAN. (1985). Cellular DNA regions involved in the induction of Rat thymic lymphomas (MlVi-I, MlVi-2, MlVi-3, and c-myc) represent independent loci as determined by their chromosomal map location in the rat.
J.Virol. **56** : 938-942.

- TSUJIMOTO,Y., J.CORSMAN, E.JAPPE and C.M.CROCE. (1985). Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma .
Science **228** : 1440-1443.

- ULLRICH,A., L.COUSSENS, J.S.HAYFLICK, T.J.qDULL, A.GRAY, A.W.TAM, J.LEE, Y.YARDEN, T.A.LIVERMANN, J.SCHLESSINGER, J.DOWNVARD, 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.

- Van BEVEREN,C., F.VAN STRAATEN, T.CURRAN, R.MULLER and I.M.VERMA. (1983). Analysis of FBJ-MuSV provirus and c-fos (mouse) gene reveals that viral and cellular fos gene products have different carboxy termini.
Cell **32**: 1241-1255.

- Van BEVEREN,C., S.ENAMI, T.CURRAN, and I.M.VERMA. (1984). FBR Murine osteosarcoma virus. II. Nucleotide sequence of the provirus reveals that the genome contains sequences acquired from two cellular genes.
Mol. Biol. Virol. **135** : 229-243.

- Van STRAATEN,F., R.MULLER, T.CURRAN, C.Van BEVEREN and I.M.VERMA. (1983). Complete nucleotide sequence of a human c-onc gene-deduced amino acid sequence of the human c-fos protein.
Proc. Natl. Acad. Sci. **80** : 3183-3187.

- 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.

- VOGT,V.M., W.WIGHT and R.EISENMAN. (1979). In vitro cleavage of avian retrovirus gag proteins by viral protease p15.
Virology **98** : 154-167.

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

- WATSON,R., M.OSKARSSON and G.F.Van de WOODE. (1982). Human DNA sequence homologous to the transforming gene (mos) of Moloney murine sarcoma virus.
Proc. Natl. Acad. Sci. **79** : 4078-4082.

- WATSON,D.K., E.P.REDDY, P.H.DUESBERG and T.S.PAPAS. (1983). Nucleotide sequence analysis of the chicken c-myc gene reveals homologous and unique coding regions by comparison with the transforming gene of avian myelocytomatosis virus MC29, delta-gag-myc.
Proc. Natl. Acad. Sci. **80** : 2146-2150.

- WATSON,D.K., M.J.McWILLIAMS-SMITH, M.F.NUNN, P.H.DUESBERG, S.J.O'BRIEN, and T.S. PAPAS. (1985). The ets sequence from the transforming gene of avian erythroblastosis virus, E26, has unique domains on human chromosomes 11 and 21 : both loci are transcriptionally active.
Proc.Natl. Acad. Sci. **82** : 7294-7298.

- WATSON,D.K., M.S.Mc WILLIAMS-SMITH, C.KOZAK, R.REEVES, J.GEARHART, M.F.NUNN, W.W.NASH, J.R.FOWLEIII, P.DUESBERG, T.S.PAPAS and S.J.O'BRIEN. (1986). Conserved chromosomal postions of dual domains of the ets proto-oncogene in cats, mice and humans.
Proc. Natl. Acad. Sci. **83** : 1792-1794.

- WATT,R., L.W.STANTON, K.B.MARCU, R.C.GALLO, C.M.GROE and G.ROVERA. (1983). Nucleotide sequence of cloned cDNA of human c-myc oncogene.
Nature **303** : 725-728.

- WEINBERGER,C., C.C.THOMPSON, E.S.ONG, R.LEBO, D.J.GRUOL, and M. EVANS.(1986). The c-erb a gene encodes a thyroid hormon receptor.
Nature **324** : 641-646.

- 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-leukosis viruses.
Cell **12**, 983-992.

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

- WILLIAMS,L.T., P.M.TREMBLE, T.O.DANIEL, S.R.COUGHLIN, G.GIELS, and J.Y.J.WANG. (1985). Platelet-derived growth factor receptors in normal and transformed cells.
Cancer Cells **3** : 175-182.

- WILLUMSEN,B.M., A.G.PAPAGEORGE, H.F.KUNG, E.BEKESI, T.ROBINS, M.JOHNSEN, W.C.VASS and D.R.LOWY. (1986). Mutational Analysis of a ras catalytic domain.
Mol. Cell. Biol. **7** : 2646-2654

- XU,Y-H., S.ISHII, A.J.L.CLARK, M.SULLIVA,, R.K.WILSON, D.P.MA, B.A.ROE, G.T.MERLINO and I.PASTAN. (1984). Human epidermal growth factor receptor cDNAs overproduced in A431 carcinoma cells.
Nature **309** : 806-810

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

-.YARDEN,Y., J.A.ESCOBEDO, W.J.KUANG, T.L.YANG-FENG, T.O.DANIEL, P.M.TREMBLE, E.Y.CHEN, M.E.ANDO, R.N.HARKINS, U.FRANCKE, V.A.FRIED, A.ULLRICH and L.T.WILLIAMS. (1986). Structure of the receptor for platelet-derived growth factor helps define a family of closely related growth factor receptors.
Nature : **323** : 226-232

- YASUDA,S., M.FURUICHI, and E.SOEDA. (1984). An altered DNA sequence encompassing the ras gene of Harvey murine sarcoma virus.
Nucleic Acids Res. **12** : 5583-5588

- YMER.S., W.Q.J.TUCKER, C.J.SANDERSON, A.J.HAPEL, H.D.CAMPBELL and I.G.YOUNG. (1985). Constitutive synthesis of interleukine 3 by leukaemia cell line WEHI-3B is due to retroviral insertion near the gene.
Nature **317** : 255-258.

- YOKOTA,J., Y.T.YOKOTA, H.BATTIFORA, C.LE FERRE and M.J.CLINE. (1986). Alteration of myc, ras^{Ha} and myb protooncogenes in Cancers are frequent and show clinical correlation.
Science **231** : 261-264

- YOUNG,D., G.WAITCHES, C.BIRCHMEIER, O.FASANO and M.WIGLER. (1986). Isolation and characterization of a new oncogene encoding a protein with multiple potential cellular transmembrane domains.
Cell **45** : 711-719.

ANNEXE.

Article 1

Reprinted from Nature, Vol. 306, No. 5941, pp. 395-397, 24 November 1983
© Macmillan Journals Ltd., 1983

A putative second cell-derived oncogene of the avian leukaemia retrovirus E26

D. Leprince, A. Gegonne, J. Coll, C. de Taisne, A. Schneeberger, C. Lagrou & D. Stehelin*

Laboratoire d'Oncologie Moleculaire, INSERM Unité 186, Institut Pasteur, 15 Rue C. Guerin, 59019 Lille Cedex, France

The acute avian leukaemia retroviruses AMV and E26 both induce myeloblastosis *in vivo* and transform myeloblasts *in vitro*[1-5]. Both viruses contain the oncogene v-*myb* first described for AMV[6,7]. Unlike AMV, E26 has the additional capacity to induce erythroblastosis *in vivo* and to transform erythroblasts[4,5]. Previous analyses indicated that the genome of E26 also contained nucleotide sequences distinct from v-*myb* and unrelated to viral replicative genes[6,8,9]. Using a molecularly cloned E26 provirus, we have now identified a novel nucleotide sequence designated v-*ets* (for *E-t*wenty-six *s*pecific)[10] of ~1.5 kilobase pairs (kbp) located next to v-*myb*. v-*ets* possesses all the structural characteristics of a putative new oncogene: it has a conserved cellular counterpart c-*ets* which is transcribed in some normal chicken cells as a major 7.5-kb polyadenylated RNA. Although our results now await elucidation of their biological significance, we propose that v-*ets* could be a new oncogene accounting for the additional transforming properties of E26, or potentiating the transforming properties of the v-*myb* oncogene.

A quail recombinant gene library was prepared in λ phage Charon 4A by partial *Eco*RI cleavage of DNA from an E26-transformed quail fibroblast cell clone (E26 QC1). The library was screened with a viral *myb* probe[6,11] or probes of structural viral genes (*gag, pol, env*)[1,12] or the long terminal repeat (LTR) of ASV[13]. A recombinant phage (λ E26 Q1) was shown to contain the E26 provirus (Fig. 1). A *Hin*cII–*Sal*I fragment of 1.6 kbp (Fig. 1, fragment *a*) hybridized with none of the above probes, except faintly in its 3′ end (*Pst*I–*Sal*I region) with the *env* probe (data not shown). This fragment thus contained E26-specific nucleotide sequences, denoted v-*ets* according to published nomenclature[10], that were located downstream of the E26 v-*myb* sequences.

We then examined if v-*ets* had a normal cellular counterpart. The 1.6-kbp *Hin*cII–*Sal*I fragment was used as a v-*ets* probe (probe *a*, Fig. 1). Normal chicken DNA digested with *Eco*RI hybridized with probe *a* as shown in Fig. 2, lane 2. Similar studies with quail and human DNA also exhibited several positive bands (Fig. 2, lanes 3 and 4, respectively). Therefore, v-*ets* had a cellular counterpart c-*ets* in all the vertebrate DNAs tested. This pattern was different from those described for the cellular oncogenes (c-*myb*, c-*erbA*, c-*erbB* and c-*myc*) corresponding to the other avian defective leukaemia viruses[1,14-17]. v-*vets* also failed to hybridize in non-stringent conditions to murine v-*onc* genes *abl*[18] and *ras*[19] reported possibly to induce erythroid transformation (data not shown). We thus concluded that c-*ets* represented a distinct set of conserved nucleotide sequences.

It then became important to document whether the *ets* and *myb* sequences found contiguous in E26, represented two distinct cellular domains, or belonged to a single large locus in chicken DNA. Indeed, it was reported recently that the c-*myb* locus (contained within the arrows in Fig. 3*A*, third line) in the chicken genome was considerably larger than the truncated fragment of *myb* found in AMV[14,20,21]. Thus, v-*ets* could be part of the c-*myb* locus, a larger portion of which would have been transduced by E26 than by AMV. This was not the case as the *Eco*RI restriction fragments of c-*ets* (Fig. 2, lane 2) differed in size from those contained within the c-*myb* locus (Fig. 3*A*, third line). Incidentally, the E26 v-*myb* domain appeared even smaller than in AMV (more truncated at least at the 3′ end: see lines 4 and 5 in Fig. 3*A*, and Fig. 3*B*). We conclude that E26 contains two sets of cell-derived nucleotide sequences, one (E26 v-*myb*) derived from the c-*myb* locus, colinear with the AMV v-*myb* gene transduced by AMV but more truncated at least at its 3′ end, and the other (v-*ets*) from a distinct cellular domain c-*ets* unrelated so far to any c-*onc* gene tested.

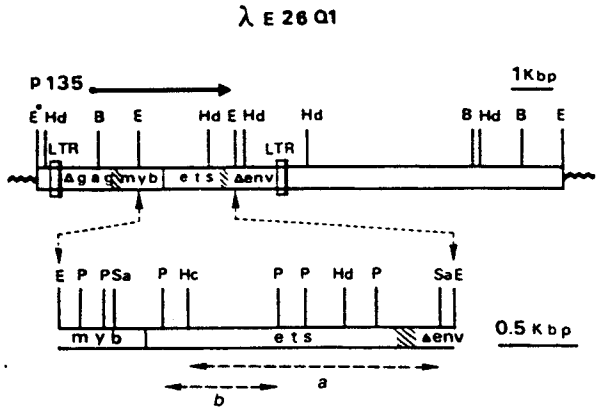


Fig. 1 Map of E26 molecularly cloned provirus. The clone λ E26 Q1, isolated as described in the text, was analysed by restriction endonuclease fragmentation followed by Southern blotting and hybridization with cDNA *myb*[6,11], and cloned probes representing viral genes (*gag, pol, env*)[6,12] or the LTR of a cloned ASV DNA (SRA-2) as described in ref. 13. Restriction endonucleases were: B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; Hc, *Hin*cII; Hd, *Hin*dIII; P, *Pst*I; Sa, *Sal*I. The *Eco*RI 2.5-kbp fragment contains an additional 0.07-kbp *Pst*I fragment not yet mapped. E; *Eco*RI site expected from the construction of the gene library but not found in this clone. Wavy lines, Charon 4A DNA. ⩘, the putative boundaries not precisely determined between *gag* and *myb* or between *env* and *ets* domains. ‹- - -›, Fragments used as v-*ets* probes in Figs 2 and 4. ∘→, Indicates the fusion protein p135 known for this virus to initiate into the *gag* gene[8,24], which calculations indicate must extend through the *myb* sequences and terminate around the 3′ end of the *ets* sequences.

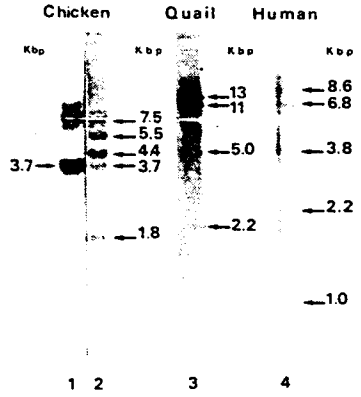


Fig. 2 v-*ets* has a cellular counterpart c-*ets*. The v-*ets* probe (probe *a*, see Fig. 1) was hybridized in non-stringent conditions to Southern blots of normal cellular DNAs restricted by *Eco*RI (lanes 2–4). DNAs used were from chick embryo fibroblasts (lanes 1, 2); Japanese quail fibroblasts (lane 3) and human placenta (lane 4). For normal chicken DNA, known to contain endogenous *env*-related sequences (as shown in lane 1 with a ^{32}P-labelled *env* probe), we checked that the v-*ets* probe, containing also some *env* sequences, yielded additional *ets*-specific bands (lane 2) not seen in lane 1.

* To whom reprint requests should be addressed.

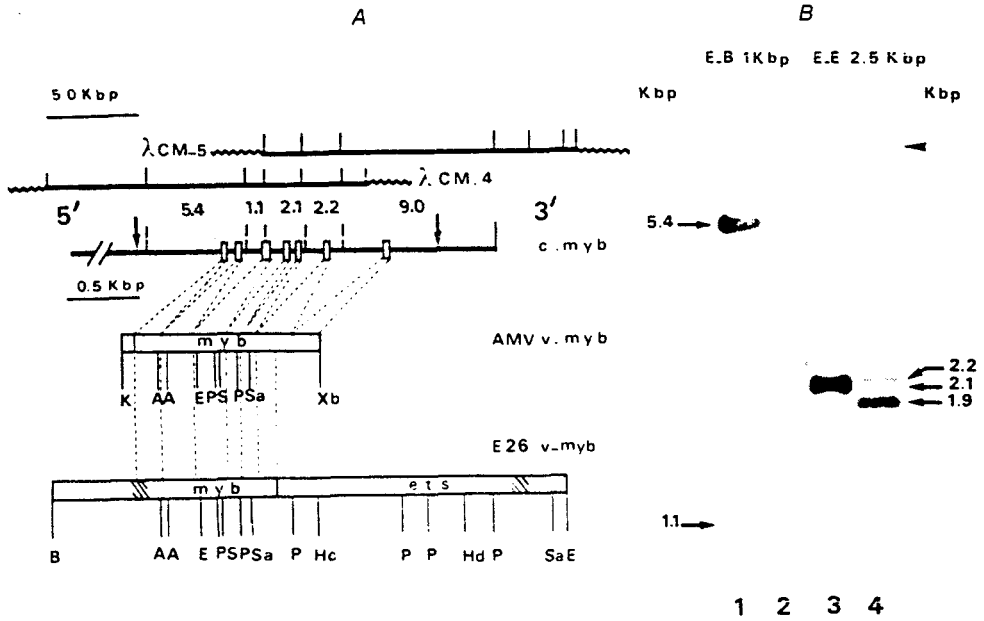


Fig. 3 E26 v-*myb* is a truncated (at least in its 3' part) form of AMV v-*myb*. *A*, Organization of the complete chicken c-*myb* locus and comparison of AMV v-*myb* and E26 v-*myb* restriction maps. From top to bottom: λ CM-4 and λ CM-5 are two phages[15] isolated from a library of chicken DNA fragments inserted into the lambda phage Charon 4A. Vertical bars represent the *Eco*RI sites in the chicken DNA insert (solid line). Wavy lines, Charon 4A DNA. These two clones cover the complete c-*myb* locus, with the arrows defining the boundaries of the c-*myb* transcriptional unit[14] and the open boxes the seven regions of homology (named E1 to E7 from 5' to 3')[21] found between AMV v-*myb* and its cellular homologue. The restriction map of the two v-*myb* positive fragments in clone λ E26 Q1 (*Bam*HI–*Eco*RI 1 kb and *Eco*RI–*Eco*RI 2.5 kb; see Fig. 1) was determined with the following restriction endonucleases: *Ava*II (A) (first fragment) and *Hin*cII (Hc), *Hin*dIII (Hd), *Pst*I (P), *Sal*I (Sa) and *Sma*I (S) (second fragment). The 3' boundary between E26 v-*myb* and v-*ets* was precisely defined (|) by sequencing analyses of the *Sal*I–*Hin*cII 460 bp fragment (B. Debuire, unpublished results) and comparison with the unpublished AMV v-*myb* sequence[7,20,21]. The 3' end (128 nucleotides) of E6 as well as all of E7 (120 nucleotides)[21] were absent in E26 v-*myb*, and replaced by *ets* sequences in the same open reading frame (B. Debuire, manuscript in preparation). In contrast, the 5' boundary of E26 v-myb (with the *gag* gene) and the boundary between v-*ets* and *env* have been only roughly determined (⋙). *B*, Hybridization of E26 v-*myb* with c-*myb* recombinant phages. The two chicken c-*myb* recombinant phages (see panel *A*) λ CM-4 (lanes 1, 3) and λ CM-5 (lanes 2, 4) were digested with *Eco*RI, separated by agarose gel electrophoresis, transferred on to nitrocellulose and hybridized with the two ^{32}P-labelled E26 v-*myb* fragments. In case of the *Bam*HI–*Eco*RI 1-kbp probe, the blot was overexposed to visualize the 1.1-kbp fragment (this fragment is difficult to detect even with AMV v-*myb* probe since it contains only a 26-bp region of homology with v-*myb*[21]). The faint 2.2–2.1-kb band visualized in λ CM-4 (lane 1) is probably nonspecific because the equivalent fragments in λ CM-5 (2.2 and 1.9 kbp) did not hybridize (lane 2). The 2.5-kbp *Eco*RI probe detected the 2.2- and 2.1-kbp c-*myb* *Eco*RI fragment in λ CM-4 (lane 3). These fragments are better separated as 2.2- and 1.9-kb fragments in λ CM-5 (lane 4). The weak hybridization of the 2.2-kbp fragment is expected, as only half of E6 (140 nucleotides) is present in this probe. The arrowhead for lane 4 indicates the position of the 9-kbp c-*myb* *Eco*RI fragment containing the 3' distal 'exon' E7 not detected by the E26 v-*myb* probe.

Finally, we showed that c-*ets* sequences were transcribed in chicken fibroblasts, in chicken bone marrow cells or MSB1 cells (a chicken line of T lymphoblasts transformed by Marek disease virus[22]). In all cases we found a RNA species of 7.5 kb (as well as in some instances two faint 2.2- and 2.0-kb RNAs which are under investigation, Fig. 4, lanes 1–3). Indeed, analysis of the same RNA blots with a v-*myb* probe did not detect such bands but only the expected 4.0-kb c-*myb* mRNA species[14,23], as shown, for example, with MSB1 cells (Fig. 4, lane 4).

In conclusion, c-*ets* and c-*myb* represent two distinct loci in chicken cellular DNA, both transduced by a yet unknown mechanism into the E26 virus where they are translated from a genomic size viral RNA (no subgenomic RNA was demonstrated for E26, our unpublished results) as a triple hybrid (*gag–myb–ets*) protein of 135,000 molecular weight[8,24,25], a situation never seen before in acute transforming avian retroviruses. Although we cannot exclude the possibility that the complex oncogenic spectrum of E26 versus AMV could involve the *myb* gene alone (found truncated and perhaps mutated in E26), our experiments favour another alternative. We propose that the ability of E26 to cause erythroleukaemia in addition to myeloblastosis could result from the presence of a second oncogene, v-*ets*, within the viral genome. v-*ets* shares the properties found so far for other oncogenes[10] (viral sequences translated into a protein, that are of cellular origin, conserved with evolution and are expressed as discrete mRNA species at some stages in normal cells). So far, all specific sequences with these properties found in retroviruses turned out to be oncogenes. That two distinct oncogenes are found co-existing in a same virus may not be coincidental as we recently described another retrovirus with two cell-derived specific sequences[26]. A first such example, avian erythroblastosis virus (AEV) was shown to contain two *onc* genes (*erbA*, *erbB*) transcribed as two distinct mRNAs[16] and translated into different proteins[27] (75,000 and 68,000 molecular weight, respectively), where *erbA* potentiates the transforming activity of *erbB* within the same erythroid lineage[28]. In this respect in E26, v-*ets* could potentiate the transforming activity of E26 v-*myb*, as E26-transformed myeloblasts seem to be more tightly blocked in their differentiation than AMV-transformed myeloblasts[4]. In addition, the two specific genes described here for E26 may confer on this virus the property to transform cells already committed into both

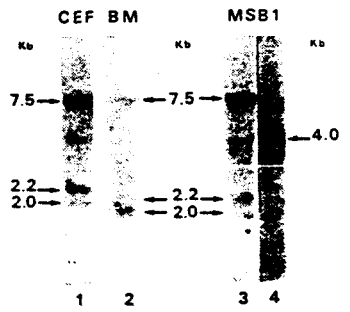


Fig. 4 Size of c-*ets* mRNA in chicken cells. Northern blots were prepared with polyadenylated mRNA and hybridized in stringent conditions (0.45 M NaCl, 41 °C, 50% formamide) with a v-*ets*-specific probe (the 720-bp *Pst*I fragment, probe *b* in Fig. 1) (lanes 1–3). RNAs tested were: CEF, chicken embryo fibroblasts (lane 1); BM, bone-marrow (lane 2); MSB1, a cell line of T lymphoblasts transformed by Marek disease virus (MDV) (lane 3) that also expresses c-*myb* RNA at an elevated level[22,23] as shown in lane 4 with a *myb* probe.

myeloid or erythroid lineages[4] or uncommitted precursor cells still able to differentiate into these two lineages[5]. For further analyses along these lines, we are currently attempting site-specific mutagenesis in the E26 *myb* or *ets* sequences. Clearly, several experimental systems involving complementation of or synergy between more than one oncogene[29–31] are emerging, which may lead to a better understanding of multi-step carcinogenesis.

We thank Drs H. Beug and T. Graf for providing the E26 QC1 cells; Dr B. Debuire for providing data before publication; Drs C. Dissous, M. Righi and S. Saule for helpful advice and discussion; Dr D. Sheiness for comments on this manuscript and N. Devassine for patient typing. This work was supported by the Institut National de la Santé et Recherche Médicale (U186), Centre National de la Recherche Scientifique (AI 033695), Association pour la Recherche sur le Cancer (6124) and the Pasteur Institute of Lille.

Received 8 July; accepted 21 September 1983.

1. Graf, T. & Stehelin, D. *Biochim. biophys. Acta* **651**, 245–271 (1982).
2. Beard, J. W. *Adv. Cancer Res.* **7**, 1–127 (1963).
3. Ivanov, X., Mladenov, Z., Nedyalkov, S. & Todorov, T. G. *Bull. Inst. Path. comp. Anim. Domest.* **9**, 5–36 (1962).
4. Radke, K., Beug, H., Kornfeld, S. & Graf, T. *Cell* **31**, 643–653 (1982).
5. Moscovici, M. G. *et al. Virology* **129**, 65–78 (1983).
6. Roussel, M. *et al. Nature* **281**, 452–455 (1979).
7. Souza, L. M., Strommer, J. N., Hilyard, R. L., Komaromy, M. C. & Baluda, M. A. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **77**, 5177–5181 (1980).
8. Bister, K. *et al. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **79**, 3677–3681 (1982).
9. Stehelin, D. *et al. Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol.* **44**, 1215–1223 (1980).
10. Coffin, J. M. *et al. J. Virol.* **40**, 953–957 (1981).
11. Gonda, T. J. *et al. Cell* **23**, 279–290 (1981).
12. Saule, S. *et al. J. Virol.* **42**, 71–82 (1982).
13. Delorbe, W. J., Luciw, P. A., Goodman, H. M., Varmus, H. E. & Bishop, J. M. *J. Virol.* **36**, 50–61 (1980).
14. Gonda, T. J. & Bishop, J. M. *J. Virol.* **46**, 212–220 (1983).
15. Leprince, D. *et al. EMBO J.* **2**, 1073–1078 (1983).
16. Vennstrom, B. & Bishop, J. M. *Cell* **28**, 135–143 (1982).
17. Sheiness, D., Hughes, S. H., Varmus, H. E., Stubblefield, E. & Bishop, J. M. *Virology* **105**, 415–424 (1980).
18. Wang, J. Y. J. & Baltimore, D. *Molec. cell. Biol.* **3**, 773–779 (1983).
19. Ellis, R. W. *et al. Nature* **292**, 506–511 (1981).
20. Rushlow, K. E. *et al. Science* **216**, 1421–1423 (1982).
21. Klempnauer, K. H., Gonda, T. J. & Bishop, J. M. *Cell* **31**, 453–463 (1982).
22. Nazerian, K. & Sharma, J. M. *J. natn. Cancer Inst.* **54**, 277–279 (1979).
23. Gonda, T. J., Sheiness, D. K. & Bishop, J. M. *Molec. cell. Biol.* **2**, 617–624 (1982).
24. Beug, H., Hayman, M. J. & Graf, T. *EMBO J.* **1**, 1069–1073 (1982).
25. Boyle, W. J., Lipsick, J. S., Reddy, P. E. & Baluda, M. A. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **80**, 2834–2838 (1983).
26. Coll, J. *et al. EMBO J.* **2** (in the press).
27. Hayman, M. J. *et al. Cell* **32**, 579–588 (1983).
28. Frykberg, L. *et al. Cell* **32**, 227–238 (1983).
29. Land, H., Parada, L. F. & Weinberg, R. A. *Nature* **304**, 596–602 (1983).
30. Ruley, H. E. *Nature* **304**, 602–606 (1983).
31. Newbold, R. F. & Overell, R. W. *Nature* **304**, 648–651 (1983).

Article 2

Reprinted from Nature, Vol. 310, No. 5978, pp. 581-583, 16 August 1984
© Macmillan Journals Ltd., 1984

Chromosomal localization of the human proto-oncogene c-*ets*

C. de Taisne, A. Gegonne & D. Stehelin

Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Institut Pasteur, INSERM U186, 15 rue C. Guérin, BP 245, 59019 Lille Cédex, France

A. Bernheim & R. Berger

Laboratoire de Cytogénétique (CNRS LP 101), Institut de Recherche sur les Leucémies et les Maladies du Sang, Hôpital St Louis, 2 place du Docteur Fournier, 75475 Paris Cédex 10, France

E26 is an acute leukaemia avian retrovirus which induces myeloblastosis and erythroblastosis *in vivo* and transforms erythroblasts and myeloblasts *in vitro*[1-3]. It contains the oncogene v-*myb* (ref. 4), first described for avian myeloblastosis virus (AMV), as well as a second specific nucleotide sequence, v-*ets* located 3′ to v-*myb* (refs 5, 6). We have reported that v-*ets* has a cellular counterpart (c-*ets*) in chicken and human DNA[5]. Now, using two independent methods—hybridization with human c-*ets* probe of sorted chromosomes and *in situ* hybridization—we report the localization of the *ets* locus on human chromosome 11 at bands q23–q24. This finding may be important, as specific breakpoints around this position have been reported for human malignancies such as acute monocytic leukaemia and Ewing's sarcoma.

Recombinant phages containing nucleotide sequences (c-*ets*) related to the v-*ets* sequences of E26 retrovirus were isolated from a genomic library of normal human DNA[7]. As shown in Fig. 1, a human c-*ets* probe was derived from one such phage, λ *ets* H-3, as a 5.4-kilobase (kb) *Eco*RI fragment which hybridized specifically to a 8.6-kb *Eco*RI genomic fragment of human DNA also detected with a v-*ets* probe. This 5.4-kb fragment, containing no repetitive DNA, was inserted into the *Eco*RI site of plasmid pKH47 to yield the probe used for hybridization experiments on human chromosomes.

Hybridization experiments using sorted chromosomes indicated that the human c-*ets* locus was located on the long arm of chromosome 11. Metaphase chromosomes were separated into nine peaks, immobilized on nitrocellulose filters[8] and hybridized with the c-*ets* probe. With the Raji Burkitt cell line, shown by cytogenetic data to contain normal chromosomes 11,

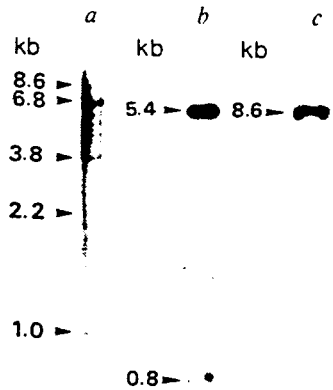


Fig. 1 Characterization of the probe c-*ets* used in hybridization experiments. Recombinant phage λ *ets* H-3 DNA was digested with *Eco*RI, separated by agarose gel electrophoresis and hybridized with ^{32}P-labelled v-*ets* probe. Two *Eco*RI fragments (5.4 and 0.8 kb, respectively) were detected by autoradiography (*b*). Southern blots of placental DNA restricted by *Eco*RI were hybridized in low-stringency conditions with v-*ets* nick-translated probe (*a*) or in high-stringency conditions with 5.4-kb *Eco*RI fragment of phage *ets* H-3 (*c*).

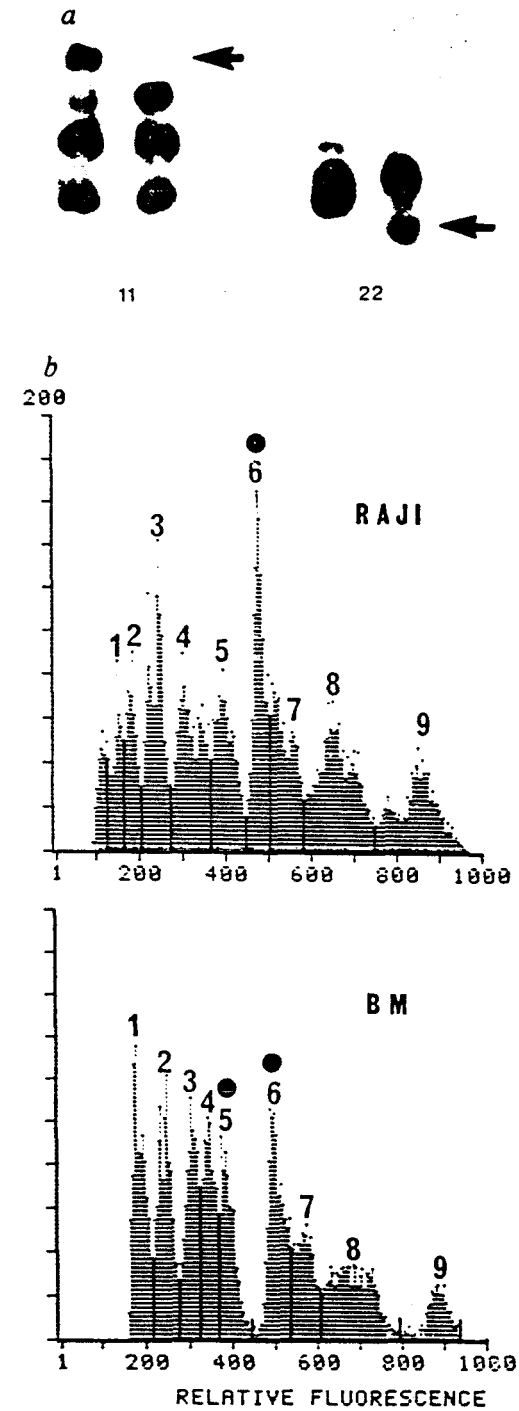


Fig. 2 Localization of the c-*ets* gene on a flow karyotype of Raji and BM cells. *a*, Partial karyotype of the BM cell line, showing the balanced translocation t(11; 22)(p11; q22) (R-bands). *b*, Relative fluorescence of the flow karyotype of Raji and BM cells. The number of chromosomes is plotted as a function of the relative fluorescence. Numbers indicate the position of the nine different fractions. Black dots show the peaks with radioactive signals obtained by hybridization with the c-*ets* probe.

Methods: The flow karyotypes were carried out using isolated chromosomes in polyamine buffer with an Ortho H50 cytofluorograph monitored by an Ortho 2150 computer. Nine different regions were selected on the flow karyotype (the bars show the limits of the gates) and the chromosomes were directly collected on nitrocellulose filters[8]. Denaturation was achieved by soaking in 0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl for 5 min followed by neutralization in 0.5 M Tris-HCl (*p*H 7.4), 1.5 M NaCl. After baking, all filters of the same experiment were hybridized (3×SSC, 1×Denhardt's buffer, 100 μg ml^{-1} denatured salmon sperm DNA, 50% formamide) with the 5.4-kb c-*ets* *Eco*RI fragment labelled with ^{32}P-dCTP (NEN). Filters were not re-used.

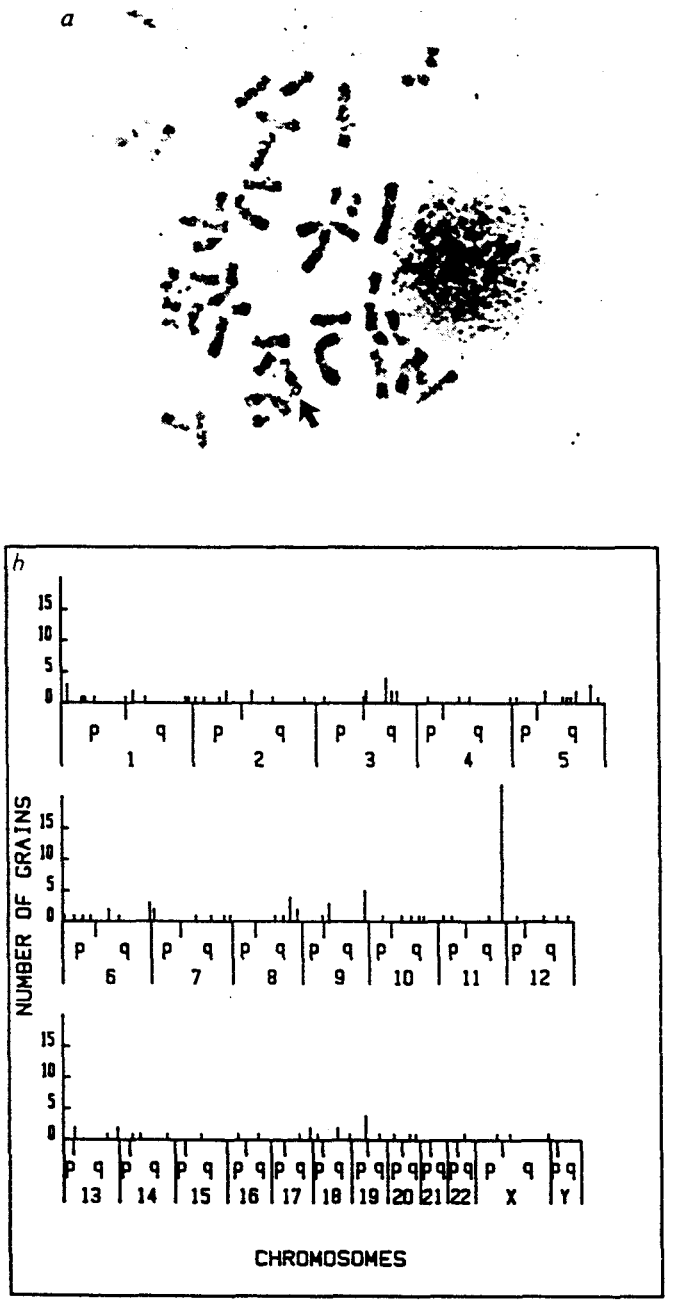


Fig. 3 Localization of the c-*ets* gene by *in situ* hybridization. *a*, Photograph of an R-banded lymphocyte metaphase spread hybridized with the c-*ets* probe. *b*, Diagram showing the grain distribution in 58 metaphases. The abscissa represents the chromosomes in their relative size proportion; the ordinate shows the number of silver grains.

Methods: Metaphase spreads were prepared using normal human male phytohaemagglutinin-stimulated lymphocyte *in vitro* cultures for 72 h, and R-banded, but staining was omitted[24]. Total plasmid DNA containing the human c-*ets* 5.4-kb *Eco*RI fragment was nick-translated with ^{3}H-dCTP (110 C mmol^{-1}; NEN). The techniques used for *in situ* hybridization were essentially as described by Gerhard *et al.*[25] The probe had a specific activity of 1.5×10^7 c.p.m. μg^{-1}. 30 μl of probe solution at 200 ng ml^{-1} in hybridization solution (50% formamide, 2×SSC, 10% dextran sulphate, 100 μg ml^{-1} of sonicated salmon sperm DNA) were placed on each slide at 37 °C for 18 h. The slides were rinsed for 15 min twice in 2×SSC at 55 °C and then twice in 0.1×SSC at 50 °C. Autoradiography was performed using a standard technique (NTB3 Kodak emulsion) for 23 days before development. The slides were stained for 10 min in a 4% Giemsa solution in phosphate buffer at *p*H 6.8. The picture was taken by phase contrast microscopy, yielding white spots for grains on chromosome 11q (arrowed).

a positive signal was observed for peak 6, corresponding mainly to chromosomes 10, 11 and 12. From *in situ* experiments done simultaneously (see below), chromosome 11 was suspected to yield the positive signal. Analysis of the lymphoblastoid cell line BM, established from a woman carrying a balanced translocation t(11; 22) (p11; q22) (Fig. 2*a*), revealed two positive signals, one in peak 6, corresponding to the normal chromosome 11, and one in peak 5 (Fig. 2*b*), corresponding to the abnormal chromosome 11p$^-$, thought by its size to be sorted with chromosomes 13 to 15.

To obtain a more precise localization of c-*ets*, we performed *in situ* hybridization experiments on chromosome spreads. Analyses of 58 metaphase spreads revealed (Fig. 3) that 17% (25/148) of all silver grains were located on human chromosome 11 ($P<0.001$ compared with a chromosomal random distribution). Of these 25 silver grains, 22 (88%) were localized on band q24 (Fig. 3). However, because there is often a discrepancy between the R and G bands[9], a localization at band 11q23 cannot be excluded. Secondary peaks of grains accumulated at positions 9q34 (3.4%) and 8q23 (2.7%); 8 grains (5.8%) were found between 3q11 and 3q22. The significance of these faint signals is unclear. It is unlikely that they represent c-*ets*-related loci because in our hands, extensive screening of human DNA libraries never produced more than one c-*ets* locus.

In conclusion, the human c-*ets* gene is located on chromosome 11 q23–q24. This finding indicates that although v-*ets* and v-*myb* oncogenes are adjacent in the E26 genome, their cellular counterparts are located on different human chromosomes, as c-*myb* has been assigned to chromosome 6q22–24 (ref. 10). Previous analysis of the chromosomal localization of the oncogenes of other acute leukaemia retroviruses containing two oncogenes, *erb*-A and *erb*-B for avian erythroblastosis virus (AEV), and *mil* and *myc* for MH2, have demonstrated that their human counterparts are located on different chromosomes[11–13]. However, whereas the *erb-A/erb-B* genes of AEV and the *mil/myc* genes of MH2 are expressed as two independent transcription units, the *myb* and *ets* genes of E26 are translated from a unique mRNA[6] as a triple fusion protein, p135$^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$.

Cellular oncogene sequences have been localized at or next to chromosomal breakpoints involved in specific translocations described in human malignancies[14]. With respect to our localization of the c-*ets* oncogene on human chromosome 11, several rearrangements involve this chromosome at q23 and q24. The bands 11q22–24 have been found to be involved mainly in acute monocytic leukaemia, especially the undifferentiated form[15]. Rearrangements of band 11q23 are now thought to be the most specific chromosomal abnormality in acute monocytic leukaemia and in some cases translocations t(9.11) (p21; q23) (ref. 16) and t(11; 19) (q23; p12 or q12) (refs 17, 18) have been reported[20]. Another specific translocation, t(4; 11) (q21; q23), has also been described in a particular form of acute leukaemia which was classified either as lymphoblastic or as immature monocytic precursor proliferation[20,21]. Finally, a t(11; 22) (q24; q12) translocation has been reported as specific for Ewing sarcoma[22,23].

Thus, band 11q23 and 11q24, within which we mapped the human c-*ets* locus, are involved in specific chromosomal rearrangements of well defined malignant proliferations. Experiments are in progress to investigate possible DNA rearrangements and expression of c-*ets* in these malignant diseases in correlation with cytogenetic data. Southern blot analyses of the DNAs form five different Ewing's sarcomas have so far failed to show translocation of *ets*.

We thank Professor A. Boué for providing the BM cell line; Mr R. Miglierina for his contribution to chromosome sorting with the cell sorter of the "Service Commun de Cytofluorométrie", Institut de Recherche sur les Leucémies, Paris; Dr F. Sigaux for his help in computerizing the data; and D. Leprince for the c-*ets* clone. This work was funded by INSERM, CNRS and the Association pour la Recherche sur le Cancer. C.T. is a fellow of the Ligue Nationale Française contre le Cancer.

Received 24 April; accepted 7 June 1984.

1. Graf, T. & Stehelin, D. *Biochim. biophys. Acta* **651**, 245–271 (1982).
2. Radke, K., Beug, H., Kornfeld, S. & Graf, T. *Cell* **31**, 643–653 (1982).
3. Moscovici, M. G. *et al. Virology* **129**, 65–78 (1983).
4. Roussel, M. *et al. Nature* **281**, 452–455 (1979).
5. Leprince, D. *et al. Nature* **306**, 395–397 (1983).
6. Nunn, M. F., Seeburg, P. H., Moscovici, C. & Duesberg, P. H. *Nature* **306**, 391–395 (1983).
7. Maniatis, T. *et al. Cell* **15**, 687–701 (1978).
8. Bernheim, A. *et al. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **80**, 7571–7575 (1983).
9. Berger, R., Bernheim, A. & Schaison, G., *Hum. Genet.* **58**, 84–86 (1981).
10. Harper, M. E. *et al. Nature* **304**, 169–171 (1983).
11. Spurr, N. K. *et al. EMBO J.* **4**, 159–163 (1984).
12. Bonner, T. *et al. Science* **223**, 71–74 (1984).
13. Neel, B. G., Jhanwar, S. C., Chaganti, R. S. K. & Hayward, W. S. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **79**, 7842–7845 (1982).
14. De La Chapelle, A. & Berger, R. *Cytogenet. Cell Genet.* **37**, 274–311 (1984).
15. Berger, R. *et al. Leuk. Res.* **6**, 17–26 (1982).
16. Hagemeijer, A., Halhen, K., Sizoo, W. & Abels, J. *Cancer Genet. Cytogenet.* **5**, 95–105 (1982).
17. Morse, H., Hays, T., Peakman, D., Rose, B. & Robinson, A. *Cancer* **44**, 164–170 (1979).
18. Prigogina, E. L., Fleishman, E. W., Puchkova, G. P., Kulagina, D. E. & Majakova, S. A. *Hum. Genet.* **53**, 5–16 (1979).
19. 4th Int. Workshop on Chromosomes in Leukaemia *J. Cancer Genet. Cytogenet.* **11**, 294–295 (1984).
20. Oshimura, M., Freeman, A. T. & Sandberg, A. A. *Cancer* **38**, 748–761 (1976).
21. Parkin, J. L. *et al. Blood* **60**, 1321–1331 (1982).
22. Aurias, A., Rimbaut, C., Buffe, D., Dubousset, J. & Mazabraud, A. *New Engl. J. Med.* **309**, 496–497 (1983).
23. Turc-Carel, C., Philip, I., Berger, M. P., Philip, T. & Lenoir, G. M. *New Engl. J. Med.* **309**, 497–498 (1983).
24. Bernheim, A. & Berger, R. *Hum. Genet.* **57**, 432–433 (1981); **63**, 303 (1983).
25. Gerhard, D., Kawasaki, E. S., Bancroft, F. C. & Szabo, P. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **78**, 3755–3759 (1981).

Article 3

MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, Feb. 1987, p. 806–812
0270-7306/87/020806-07$02.00/0
Copyright © 1987, American Society for Microbiology
Vol. 7, No. 2

Multiple Domains for the Chicken Cellular Sequences Homologous to the v-*ets* Oncogene of the E26 Retrovirus

ANNE GEGONNE,[1] DOMINIQUE LEPRINCE,[1] MARTINE DUTERQUE-COQUILLAUD,[2] BERNARD VANDENBUNDER,[1] ANNE FLOURENS,[1] JACQUES GHYSDAEL,[1] BRIGITTE DEBUIRE,[2] AND DOMINIQUE STEHELIN[1]*

Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Unité 186 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale-Centre National de la Recherche Scientifique 1160, Institut Pasteur, 59019 Lille Cédex,[1] and Unité 124 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Institut de Recherches sur le Cancer, 59045 Lille,[2] France

Received 11 August 1986/Accepted 28 October 1986

We have investigated the structure of chicken genomic DNA homologous to v-*ets*, the second cell-derived oncogene of avian retrovirus E26. We isolated a c-*ets* locus spanning ca. 30.0 kilobase pairs (kbp) in the chicken genome with homologies to 1,202 nucleotides (nt) of v-*ets* (total length, 1,508 nt) distributed in six clusters along 18.0 kbp of the cloned DNA. The 5′-distal part of v-*ets* (224 nt) was homologous to chicken cellular sequences contained upstream within a single 16.0-kbp *Eco*RI fragment as two typical exons but not found transcribed into the major 7.5-kb c-*ets* (or 4.0-kb c-*myb*) RNA species. Between these two v-*ets*-related cellular sequences we found ca 40.0 kbp of v-*ets*-unrelated DNA. Finally, the most 3′ region of homology to v-*ets* in the cloned DNA was shown to consist of a truncated exon lacking the nucleotides coding for the 16 carboxy-terminal amino acids of the viral protein but colinear to one of the two human c-*ets* loci, c-*ets*-2.

Avian retrovirus E26 induces a mixed erythroid-myeloid leukemia predominantly of the erythroid type (13). In addition to v-*myb*, the genome of E26 contains a second stretch of cell-derived specific sequences, v-*ets* (1,508 nucleotides [nt]) 3, 16, 19). The cellular counterpart of v-*ets*, c-*ets*, is clearly distinct from c-*myb* since it is transcribed in some normal cell types as a major 7.5-kilobase (kb) polyadenylated RNA (as well as two minor 2.2- and 1.5 (2.0)-kp species) in contrast to the 4.0-kb c-*myb* mRNA (16, 27). Furthermore, the human cellular genes c-*myb* and c-*ets* have been assigned to different chromosomes: 6q22-24 for c-*myb* (14), 11q23-24 for c-*ets-1* (8, 26), and 21q22.1-22.3 for c-*ets-2* (26). The E26 viral transforming protein is a 135,000-M_r fusion protein, $P135^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$ translated from the 5.7-kb genomic viral RNA and located in the nucleus of E26-transformed cells (2, 4, 5, 15). v-*ets* is not related to any other known viral oncogenes but its deduced amino acid sequence displays homology with the products of yeast cell cycle genes *CDC4* and *CDC36* (20).

In this report we demonstrate that the v-*ets* sequences originated mainly from two stretches of DNA 40.0 kbp distant. We isolated lambda recombinant phages corresponding to a c-*ets* locus transcribed as a major 7.5-kb mRNA and containing six exons homologous to 1,202 nt of a central portion of v-*ets*. In addition, the 5′ part of v-*ets* was acquired from two exons located in a 16.0-kbp *Eco*RI fragment of chicken DNA which lies within the c-*ets* locus described here. These two exons do not appear to be transcribed into the major 7.5-kb c-*ets* RNA species seen in several cell types. Finally, by sequencing analysis of the most 3′ cellular sequence homologous to v-*ets*, we identified a putative translation stop codon to this c-*ets* locus, colinear with that of the human c-*ets-2* locus but distinct from the one used for the termination of the E26 viral protein. Thus, v-*ets* appears to represent a mosaic of probably at least three stretches of DNA.

* Corresponding author.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of DNAs. High-molecular-weight chicken DNA was prepared from total embryos as previously described (23). Plasmid DNA and recombinant phage DNAs were prepared as described previously (22).

Hybridization probes. Lambda E26Q1 is a molecularly cloned E26 provirus. A 2.5-kbp *Eco*RI fragment containing the v-*ets* domain flanked 5′ and 3′ by E26 v-*myb* and *env* sequences, respectively, was subcloned in plasmid pKH47 to yield the plasmid clone pVE2.5 (Fig. 1) (16). The different v-*ets* and v-*myb* probes used in this study were prepared from the pVE2.5 clone.

Fragments representative of the viral *env* gene were derived from the Prague A strain of Rous sarcoma virus (Pr-RSVA) genome as illustrated by Saule et al. (22). These fragments were labeled by nick-translation with New England Nuclear Corp. nick translation kits.

Isolation of recombinant phages containing c-*ets* chicken sequences. A library of chicken erythrocyte DNA fragments in Charon 4A vectors was kindly provided by J. Dodgson and J. Engel (9). A total of 2.5×10^5 plaques were screened with a v-*ets* probe by the in situ plaque purification procedure of Benton and Davis (1).

A recombinant DNA library in vector EMBL4 constructed with a partial *Sau*3A digest of total chicken embryo DNA by A. Begue in our lab was used to isolate lambda clones containing sequences homologous to the 5′ part of v-*ets*.

Restriction mapping and gel electrophoresis of poly(A)-containing cellular RNAs. Restriction endonucleases were obtained from Boehringer Mannheim and Bethesda Research Laboratories. Digested DNA fragments were size separated by electrophoresis in horizontal agarose gels and transferred to nitrocellulose filters by the method of Southern (24). Total cellular RNA was fractionated on oligo(dT)-cellulose (T3; Collaborative Research). Polyadenylated RNAs were denatured, size separated, and transferred to nitrocellulose by the method of Thomas (25).

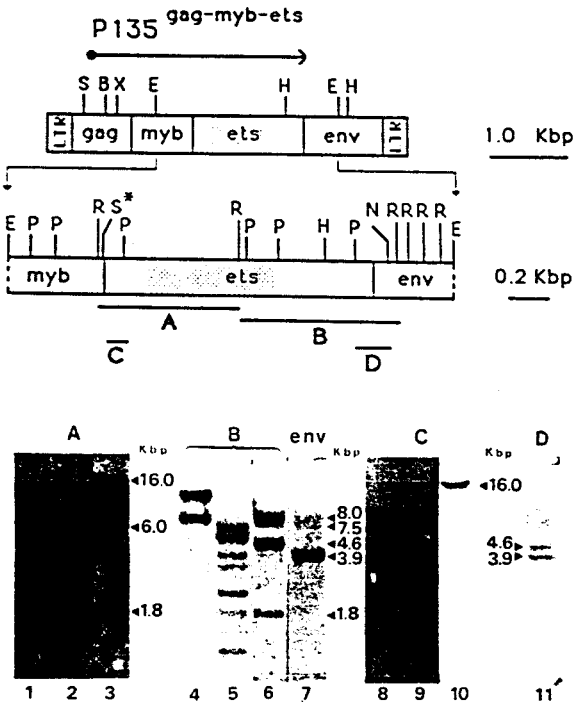


FIG. 1. (Top) Schematic drawing of the E26 provirus deduced from restriction endonuclease mapping and partial sequencing analysis of recombinant phages isolated from DNA libraries of two distinct E26-infected cells (22, 26, 28). Abbreviations: B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; H, *Hin*dIII; S, *Sst*I; X, *Xho*I. *gag*, *env*, and LTR (long terminal repeat) refer to helper virus-related sequences (13), whereby *myb* and *ets* refer to the two cell-derived sequences present in the E26 genome (16, 19). The arrow indicates the 3.6-kbp of coding capacity required for the synthesis of the fusion protein P135$^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$ (4, 5, 15). (Middle) Restriction endonuclease map of the 2.5-kbp *Eco*RI fragment subcloned into plasmid pKH47 (pVE2.5). This fragment contains all the v-*ets* sequences flanked 5′ and 3′ by E26 v-*myb* and *env* sequences, respectively. Abbreviations: E, *Eco*RI; H, *Hin*dIII; P, *Pst*I; N, *Nde*I; R, *Rsa*I. S* represents a convenient *Sau*3A restriction site located at the E26 *myb-ets* junction. The stippled area represents the regions of homology found between v-*ets* and the yeast cell cycle genes *CDC4* and *CDC36* (20). (Bottom) The different v-*ets* probes (A, B, C, and D) derived from the pVE2.5 subclone are indicated. After digestion of chicken chromosomal DNA by *Bam*HI (lanes 1, 4, and 8), *Hin*dIII (lanes 2, 5, and 9), or *Eco*RI (lanes 3, 6, 7, 10, and 11) the DNA fragments were separated by electrophoresis in the same 0.8% agarose gel and transferred onto nitrocellulose sheets (24). These Southern blots were hybridized with the v-*ets* probes indicated above: probe A (lanes 1 to 3), probe B (lanes 4 to 6), probe C (lanes 8 to 10), and probe D (lane 11). Similarly, the chicken DNA was hybridized with an *env* probe (lane 7), since probes B and D were shown to contain such sequences (19).

Hybridization of blots to ^{32}P-labeled DNA, washing, and autoradiography at −70°C with Kodak X-ray films and Du Pont Lightning-Plus X-ray intensifying screens were performed as described previously (22).

Heteroduplex mapping. The lambda chicken c-*ets* DNAs were hybridized with either E26 recombinant phages containing the v-*ets* sequence in the same orientation versus the lambda vector arms: lambda E26-1, which has been described (16), or lambda E26-2 containing the 9.0-kbp *Bam*HI fragment from lambda E26-1 but cloned in the opposite orientation into the lambda 47 vector. The heteroduplex molecules spread onto the hypophase were picked up on the parlodion-coated grids (300 mesh) and stained with uranyl acetate. The grids were subsequently dried, rotary shadowed, and viewed in a Hitachi HU12 electron microscope.

Sequencing analysis. The sequence of the *Eco*RI-*Pst*I 78-base-pair (bp) fragment was obtained by the dideoxy chain termination method (21) after cloning into the polylinker restriction sites of the M13 phage derivatives mp8 and mp9 and by the incorporation of [^{32}P]deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) onto a synthetic primer complementary to the terminus of the M13 vector in the presence of dideoxy dNTPs as described by Messing et al. (17).

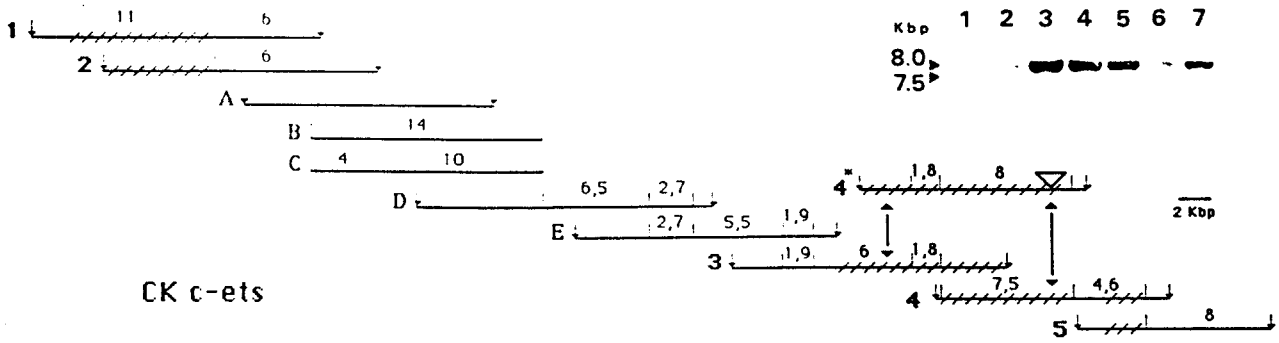
RESULTS

Restriction analysis of c-*ets* in chicken DNA. The probes used to analyze the restriction pattern of chicken c-*ets* were obtained by digestion with the restriction endonuclease *Rsa*I of the plasmid subclone pVE2.5 containing all the v-*ets* domain (Fig. 1). This yielded two fragments containing roughly the 5′ half of v-*ets* (768 bp, probe A) and the 3′ half of v-*ets* (765 bp) together with 105 bp related to helper virus *env* sequences (870 bp, probe B) (19). These two probes hybridized to several DNA fragments in Southern blots of chicken DNA digested with either *Eco*RI, *Bam*HI, or *Hin*dIII. After *Eco*RI digestion, 16.0-, 6.0- and 1.8-kbp *Eco*RI fragments hybridized with the 5′ v-*ets* probe (Fig. 1, lane 3), whereas the 3′ v-*ets* probe detected 8.0-, 7.5-, 4.6-, 3.9- (faint), and 1.8-kbp *Eco*RI fragments (Fig. 1, lane 6). However, since normal chicken DNA is known to contain endogenous retroviral information, we analyzed the same DNA sample with an *env* probe to differentiate the c-*ets* bands from the endogenous *env* sequences. Only the 3.9-kbp *Eco*RI fragment (hybridizing faintly with probe B) corresponded to *env* sequences (Fig. 1, lanes 6 and 7). Southern blots of *Bam*HI- and *Hin*dIII-digested chicken DNA also hybridized with probe A (Fig. 1, lanes 1 and 2), probe B (lanes 4 and 5), or an *env* probe (data not shown). Finally, with a convenient *Sau*3A restriction site located at the v-*myb*-v-*ets* junction (19), we prepared probe C (*Sau*3A-*Pst*I fragment, 135 bp) specific to the 5′ end of v-*ets*. This probe detected the 16.0-kbp *Eco*RI fragment (Fig. 1, lane 10) as well as the 7.5-kbp *Bam*HI and the 5.4- and 1.9-kbp *Hin*dIII fragments (Fig. 1, lanes 8 and 9) already visualized by probe A (Fig. 1, lanes 1 and 2). Similarly, a ^{32}P-labeled *Pst*I-*Nde*I 194-bp fragment (probe D) containing the 3′ end of v-*ets* and some *env* (78 nt) sequences detected in total DNA the 4.6- and 3.9-kbp *Eco*RI fragments, the latter probably representing *env*-related endogenous sequences (Fig. 1, lanes 7 and 11).

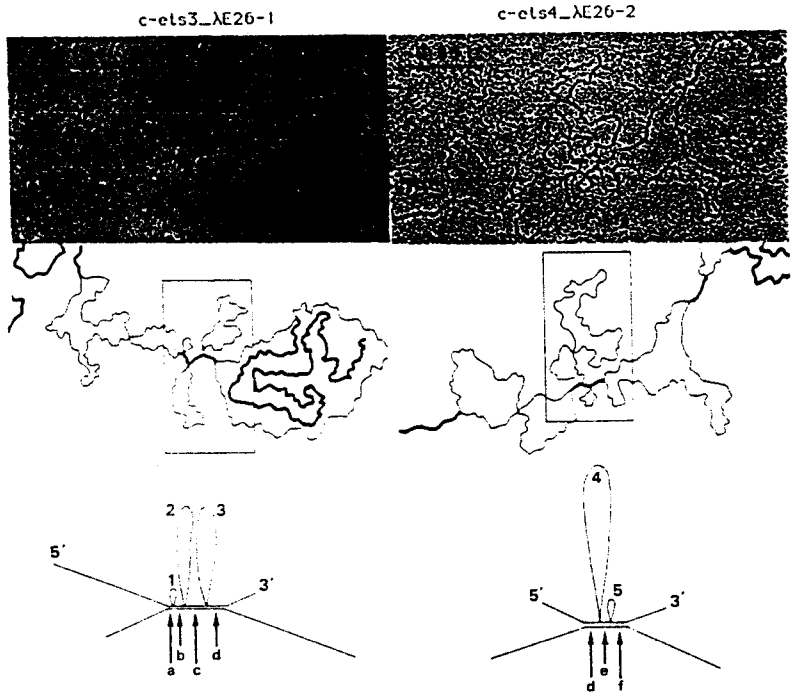
In conclusion, the v-*ets* probes detected a small number of discrete bands in *Eco*RI-digested chicken DNA.

Cloning of c-*ets* from a library of chicken DNA-bacteriophage recombinants. To gain information about the arrangement of the chicken DNA fragments homologous to v-*ets*, molecular clones of c-*ets* were obtained from a chicken erythrocyte DNA library (9). With probes A and B (Fig. 1), three such recombinant clones (lambda c-*ets* 3, 4, and 5 in Fig 2A) were isolated and studied by restriction enzyme digestion and Southern blot analysis. Results (Fig. 2A) showed the following: (i) the three recombinant clones, lambda c-*ets* 3, c-*ets* 4, and c-*ets* 5, contained different overlapping cellular inserts; (ii) none of these recombinant phages hybridized with the 5′-most v-*ets* probe (probe C) or

A



B



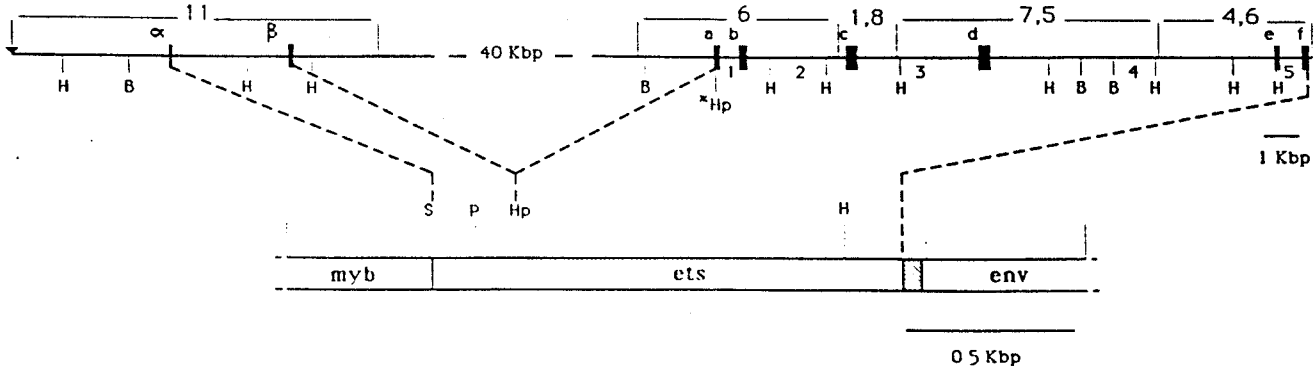
Double stranded segments

a	120 ± 30
b	220 ± 40
c	300 ± 35
d	270 ± 45
e	110 ± 20
f	210 ± 30
	1230 ± 95

Internal loops

1	650 ± 100
2	3000 ± 300
4	8300 ± 400
5	800 ± 75

C



contained part of the 16.0-kbp *Eco*RI fragment detected in cellular DNA by this probe (Fig. 1, lane 10); and (iii) lambda c-*ets* 4 and c-*ets* 5 hybridized with the 3′ v-*ets* probe (probe D in Fig. 1) and contained the 4.6-kbp *Eco*RI fragment (Fig. 1, lane 11). These 3′ v-*ets*-homologous sequences were flanked downstream by 8.0 kbp of v-*ets*-unrelated chicken DNA in lambda c-*ets* 5. Moreover, the regions of homology to v-*ets* in lambda c-*ets* 3 and c-*ets* 4 DNAs were precisely localized by heteroduplex analysis; six small double-stranded regions separated by five internal loops could be defined (Fig. 2B).

Incidentally, we also isolated from the same DNA library a recombinant phage named lambda c-*ets* 4* which seemed to overlap with both lambda c-*ets* 3 and lambda c-*ets* 4 since each ^{32}P-labeled *Eco*RI fragment of lambda c-*ets* 4* cross-hybridized with a corresponding fragment in one of the two clones (Fig. 2A). However, lambda c-*ets* 4* and c-*ets* 4 contained two *Eco*RI fragments different in size (7.5 and 8.0 kbp) which were both detected by a v-*ets* probe in the chicken DNA used in the experiments shown in Fig. 1. This is probably due to allelic variation in this region of c-*ets*, since analysis of DNA obtained from seven individual chicken embryos revealed either both *Eco*RI fragments or only the 8.0-kbp *Eco*RI fragment (Fig. 2A).

In conclusion, cellular sequences corresponding to the major part of v-*ets* (1,202 nt; see below) are split into six regions of homology (presumably exons), interrupted by five regions of nonhomology (introns) within ca. 18.0 kbp of chicken DNA (Fig. 2) cloned in lambda c-*ets* 3, 4, and 5. It should be noted that both the *ets-1* and *ets-2* sequences found split on different chromosomes in human, cat, and mouse DNA (26) can be found contiguous in chicken cellular DNA.

Cloning of the cellular sequences homologous to the 5′ part of v-*ets*. From a newly constructed library of *Sau*3A-digested chicken embryo DNA, we isolated two recombinant phages (named lambda c-*ets* 1 and lambda c-*ets* 2) hybridizing with the 5′-specific v-*ets* probe C. Lambda c-*ets* 1, although containing a single 11.0-kbp artificial *Eco*RI fragment instead of the 16.0-kbp *Eco*RI fragment (Fig. 1, lane 10), contained the 7.5-kbp *Bam*HI as well as the 5.4- and 1.9-kbp *Hin*dIII fragments detected in total chicken DNA (Fig. 1, lanes 8 and 9, and Fig. 2C). These *Hin*dIII fragments contained cellular sequences, named α and β, accounting for the 5′ part of v-*ets*. Nucleotide sequence analysis revealed that α and β exhibited the typical properties of eucaryotic exons, with open reading frames (82 and 142 nt, respectively) identical to that used by E26 virus and flanked by consensus splice signals (Fig. 3) (18). Nevertheless, we found no splice acceptor sequence at the leftward boundary of α or upstream sequence homology to v-*myb*. Thus, α represents an exon probably truncated during an illegitimate recombination with *myb* sequences. Appropriate splicing between α and β would yield the most 5′ sequences of v-*ets*. To determine more precisely the relationship between the two genomic regions homologous to v-*ets*, we also sequenced exon a, the first v-*ets*-related exon of lambda c-*ets* 3 (Fig. 2). From the results shown in Fig. 3, it appears that the most obvious mechanism to generate the v-*ets* sequences involves a consensus splicing of β to a.

These results as well as the fact that lambda c-*ets* 1 and lambda c-*ets* 3 did not contain overlapping DNA inserts raised the question whether they represented two distinct regions of the chicken genome or distant parts of a same locus. We thus extensively screened chicken DNA libraries with ^{32}P-labeled fragments of lambda c-*ets* 1 and lambda c-*ets* 3. Using in addition the "walking gene" method, we isolated five recombinant clones (lambda c-*ets* A, B, C, D, and E) containing v-*ets*-unrelated inserts totaling ca. 40 kbp which represented the junction between the two v-*ets* homologous cellular stretches (Fig. 2). The transcription of c-*ets* in chicken cells as a major 7.5-kb RNA species (16, 27) most likely correlates with a large cellular gene. E26 could therefore have transduced and joined in its genome two sequences, namely those found in lambda c-*ets* 1 and c-*ets* 3, that may belong to a same locus but are separated by a large region (40.0 kbp) of cellular DNA. To test this hypothesis, polyadenylated RNAs of MSB1 cells (a chicken line of T lymphoblasts transformed by Marek disease virus, expressing a high level of 7.5-kb c-*ets* RNA [16]) was hybridized with probe C. No signal was observed (Fig. 4, lane C1). The lack of hybridization was significant, since the same blot hybridized with the ^{32}P-labeled 870-bp *Rsa*I fragment (probe B) revealed the typical c-*ets* RNA species (Fig. 4, lane B1); furthermore, probe C readily detected the 5.7-kb E26 genomic RNA as efficiently as did probe B (Fig. 4, lanes 2). To bolster this demonstration we analyzed MSB1 mRNAs with probe E (*Pst*I-*Pst*I, fragment, 420 bp) which encompasses *myb* sequences and probe C: only the 4.0-kb c-*myb* mRNA species was detected (Fig. 4, lane E1). In addition, when we used probe A, which represents the 5′ end of v-*ets* (including α and β), only the c-*ets* mRNA species described above with probe B were detected (Fig. 4, lane A1). Therefore, the 5′ part of v-*ets* is homologous to chicken cellular sequences which are not transcribed into the major 7.5-kb c-*ets* RNA species in MSB1 cells. However, we cannot rule out the possibility that the 5′ part of v-*ets* may be expressed by an alternate splicing mechanism as part of a minor c-*ets*

FIG. 2. Structure of the c-*ets* locus. (A) Molecular clones of c-*ets* were obtained from different chicken (CK) DNA libraries: *Alu*I-*Hae*III-digested erythrocyte DNA, *Eco*RI-digested fibroblast DNA, and *Sau*3A-digested total embryonic DNA (see the text). Vertical bars represent true *Eco*RI fragments, and arrows represent artificial *Eco*RI fragments due to the construction of some of the libraries used. Fragments containing sequences homologous to v-*ets* (diagonal lines) in clones lambda c-*ets* 1, 2, 3, 4, 4*, and 5 were identified by Southern blot analysis with v-*ets* probes (data not shown). Recombinant clones A, B, C, D, and E which did not hybridize with v-*ets* probes were isolated by the walking gene technique. Orientation is 5′ to 3′. Chromosomal chicken DNAs obtained from different embryos were restricted with *Eco*RI. The DNA fragments were separated by agarose gel electrophoresis, transferred to nitrocellulose sheets, and hybridized with the ^{32}P-labeled 8.0-kbp *Eco*RI fragment of lambda c-*ets* 4*. (B) Heteroduplex analysis of chicken c-*ets* recombinant clones. Top to bottom: Representative heteroduplex, interpretative sketch (thick lines represent double strands and thin lines represent single strands), and schematic drawing of the contour lengths (features 1 to 5 refer to single strands [loop 3 was 3200 ± 300] and features a to f refer to double strands, whose lengths in base pairs are summarized in the table). (C) Restriction map of a c-*ets* chicken locus. The sites of cleavage of the following restriction endonucleases into lambda c-*ets* 1, 3, and 4 are shown: *Bam*HI (B), *Eco*RI (E), and *Hin*dIII (H). In addition the position of one *Hpa*I site (Hp*) is shown as it is also found in the viral v-*ets* sequence. The 5′ and 3′ limits of the homology found between v-*ets* and the second c-*ets* domain have been roughly determined by heteroduplex analyses. These studies revealed six regions of homology (a to f) separated by five regions of nonhomology (1 to 5) (see the table). The hatched box represents the most 3′ sequences of v-*ets* which are not derived from the c-*ets* exon f and remain of unknown origin. The stippled box represents the homology with *CDC4* and *CDC36* (20).

FIG. 3. Nucleotide sequence of α, β, and a. Nucleotide sequence of relevant portions from lambda c-*ets* 1 and c-*ets* 3 clones is aligned with the published v-*ets* sequence (19). Three open reading frames (82, 142, and 120 nt) colinear to v-*ets* (with a single base change at the beginning of exon a) and flanked by typical splice signals (18) with the exception of the leftward boundary of α (see the text) were detected. The v-*ets* sequence probably results from splicing of α and β to a. Ck, Chicken; Sd, splice donor; Sa, splice acceptor.

RNA species present at a very low level in this cell line or expressed in so far unidentified cell types.

v-*ets* and c-*ets* differ at their 3′ end. Sequencing analysis of v-*ets* and the topography of the E26 provirus suggested that the same translation stop codon was used for termination of synthesis of the viral protein P135$^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$ and the cellular c-*ets* protein P54$^{c\text{-}ets}$ (6, 11, 19). Therefore, we investigated in more detail the cellular sequences homologous to the 3′ end of v-*ets*. From hybridization experiments with total chicken DNA and with chicken DNA recombinant clones (Fig. 1, lanes 6, 7 and 11, and Fig. 2), these sequences should be localized within the 4.6-kbp *Eco*RI fragment of clones lambda c-*ets* 4 or lambda c-*ets* 5. A *Pst*I-*Eco*RI 78-bp fragment hybridizing with the 3′-distal v-*ets* probe D (Fig. 1) was isolated from the 4.6-kbp *Eco*RI fragment of lambda c-*ets* 4, subcloned into phage M13mp8, and sequenced by the chain termination method (21). This sequence was compared with the previously published v-*ets* sequence (19). A perfect homology beween the v-*ets* and the c-*ets* fragment was found (Fig. 5), but only for the first 34 nt following the *Pst*I site. No significant homology was found with the last 82 nt of v-*ets*. However, the chicken c-*ets* sequence described here is colinear, with some minor base changes probably due to phylogenetic divergence, with that of a human c-*ets* cDNA clone corresponding to human c-*ets*-2 (Fig. 5) (27). Therefore, the viral v-*ets* sequence on one hand and the sequences of human c-*ets*-2 cDNA and chicken c-*ets* DNA on the other hand appear to specify different carboxy termini for their encoded proteins. It should also be noted that from sequence analysis (Fig. 5), probe D, although containing 78 *env*-related nt, 34 nt derived from the 4.6-kbp *Eco*RI fragment of lambda c-*ets* 4 but also 82 nt of unknown origin (see sequence data in Fig. 5), hybridized only with two cellular *Eco*RI fragments (4.6 and 3.9 kbp in size) with similar

intensities (Fig. 1, lane 11). A possible explanation could be that the 4.6-kbp band (lane 6) represented a doublet of a first fragment located within the lambda c-*ets* 4 recombinant clone and derived from the c-*ets* locus and a second fragment which could contain the termination codon used by E26 for its transforming protein. The nature and origin of this latter fragment remain open questions.

DISCUSSION

In this paper, we investigate the nature and structure of the cellular sequences homologous to the E26-specific cell-derived domain v-*ets* (1,508 nt). Surprisingly, the cellular chicken sequences accounting for the v-*ets* domain appeared to be split into two stretches (6.0 kbp and 18.0 kbp, respectively) separated by about 40.0 kbp of v-*ets*-unrelated DNA. The downstream stretch related to v-*ets* contained six clusters of homology, named a to f (Fig. 2), scattered along 18.0 kbp of DNA. Therefore, the *ets-1* and *ets-2* loci which appeared to be located on different chromosomes in several mammalian species, including humans, are found contiguous in chickens, the species from which the E26 virus arose. However, at least two sets of *ets*-related proteins can be observed in chicken tissues: $P54^{c\text{-}ets}$, which is highly related to the v-*ets* domain of $P135^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$ (6, 11), and the P60, P62, and P64 proteins, which have only limited homology with $P54^{c\text{-}ets}$ and $P135^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$ (12). We do not know whether these two sets of *ets*-related proteins are translated from differentially spliced mRNA transcripts derived from the locus described here or from two distinct loci, one being highly related to v-*ets*, the other displaying only a small region of homology. The characterization of the nucleotide sequence of the corresponding cDNAs should resolve the issue.

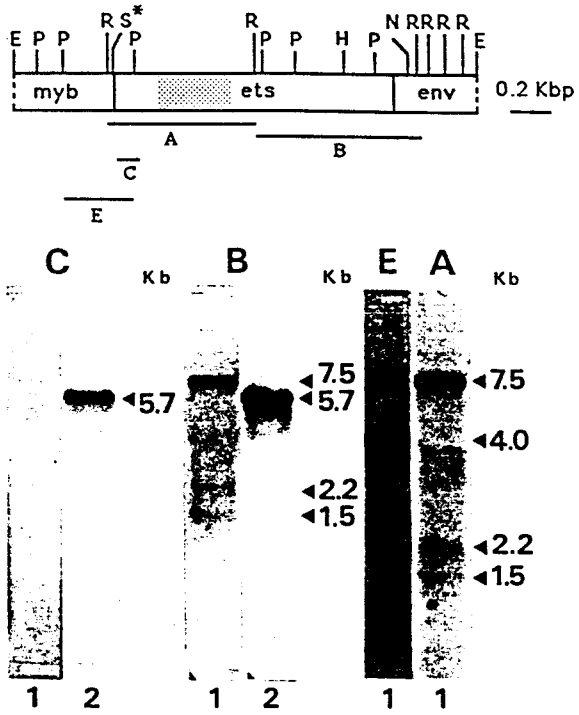


FIG. 4. The 5′ part of v-*ets* was not found transcribed into the c-*ets* or c-*myb* RNAs. Polyadenylated RNAs of MSB1 (a T-lymphoid cell line) (lanes 1) or of E26-transformed myeloblasts (lanes 2) were denatured with glyoxal-dimethyl sulfoxide, separated by agarose gel electrophoresis, bound to nitrocellulose sheets (25), and hybridized with the indicated probes (C, B, E, and A). See the Legend to Fig. 1 for symbols and abbreviations.

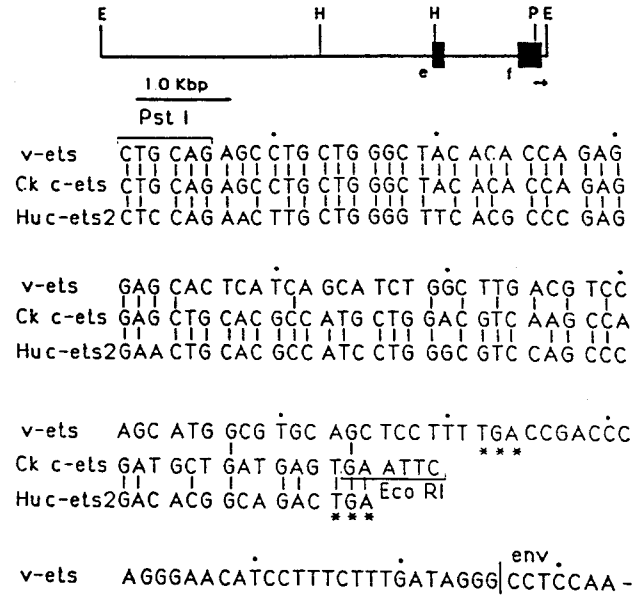


FIG. 5. P135 translational stop codon not derived from c-*ets* exon f. A 78-nt c-*ets* fragment that includes the 3′ stretch of homology between v-*ets* and the 4.6-kbp *Eco*RI fragment lambda c-*ets* 4 recombinant clone (top) was subjected to nucleotide sequence analysis. Numbering starts at the C residue of a *Pst*I restriction site (nt 1927 in reference 27). Sequencing was done as described by Sanger et al. (21) after cloning of a *Pst*I-*Eco*RI fragment into phage M13 derivatives mp8 and mp9. ***, Translation stop codon used for synthesis of the E26 transforming protein. The border with the *env* gene is also shown. The human c-*ets-2* cDNA sequence with its translation stop codon is also indicated (27). Vertical bars refer to homologous nucleotides found within the three sequences. Ck, Chicken; Hu, human.

The 5′ c-*ets* stretch contains sequences homologous to the first 224 nt of v-*ets*. This 5′ c-*ets* stretch, although displaying a split structure typical of a eucaryotic gene (Fig. 3), is not transcribed into the 7.5-kb major RNA species (Fig. 4). This suggests that these sequences could be expressed in minor RNA species present at low levels (just above the limit of sensitivity of the method we used) in the MSB1 cellular RNAs tested or in so far unidentified cell types. However, antisera directed against these sequences corresponding to the amino-terminal v-*ets*-encoded domain, although identifying the P135 viral protein, failed to precipitate any of the described cellular c-*ets* proteins in many different cell types (10). Finally, in support of these results, the beginning of homology found between v-*ets* and the yeast cell cycle genes *CDC4* and *CDC36* (20) seems to correlate with the upstream part of the second cellular stretch of homology to v-*ets* defined in this study.

Turning now to the 3′ end of v-*ets*, the topography of E26 proviral DNA as well as sequencing analysis strongly suggested that the translation stop codon used for the synthesis of the viral P135 protein was of cellular origin and derived from c-*ets* (16, 19). However, sequencing analysis of the cellular sequence homologous to the most 3′ v-*ets* sequence in the 4.6-kbp *Eco*RI fragment of lambda c-*ets* 4 demonstrated that (i) the last 16 amino acids of the $P135^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$ protein are not derived from this part of c-*ets* and (ii) the region of homology (named f in Fig. 2C) found between c-*ets* and v-*ets* displays features typical of a truncated c-*ets* exon

and is colinear (with some single base changes) to a human c-*ets-2* cDNA which contains a translation stop codon. Therefore, this f probably provides the termination codon of at least one of the chicken c-*ets* proteins, namely P54 (11).

Using specific oligonucleotide probes, we are currently cloning the cellular sequences containing the translation stop codon of the E26 transforming protein and isolating c-*ets* cDNAs. These studies will shed light on the mechanism by which three probably distinct cellular domains have been transduced in E26 virus and fused to encode a single viral protein.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank J. Coll and S. Saule for stimulating discussions and critical reading of this manuscript; A. Fritsch, G. Torpier, and A. Jacob for help with the heteroduplex analysis; J. Dogson for the chicken erythrocyte DNA library; A. Begue for the *Sau*3A chicken embryo DNA library; C. Lagrou for expert technical assistance in cell culture; and N. Devassine for patient typing.

This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (U186-U-124), Centre National de la Recherche Scientifique (UA 04 1160), Association pour la Recherche sur le Cancer, and the Pasteur Institute of Lille.

LITERATURE CITED

1. **Benton, W. D., and R. W. Davis.** 1977. Screening λgt recombinant clones to hybridization to single plaques in situ. Science **196**:180–182.
2. **Beug, H., M. S. Hayman, and T. Graf.** 1982. Myeloblasts transformed by the avian acute leukemia virus E26 are hormone-dependent for growth and for expression of a putative *myb*-containing protein, P135 E26. EMBO J. **1**:1069–1073.
3. **Bishop, J. M.** 1983. Cellular oncogenes and retrovirus. Annu. Rev. Biochem. **52**:301–334.
4. **Bister, K., M. Nunn, C. Moscovici, B. Perbal, M. A. Baluda, and P. Duesberg.** 1982. Acute leukemia viruses E26 and avian myeloblastosis virus have related transformation specific RNA sequences but different genetic structures, gene products and oncogenic properties. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79**:3677–3681.
5. **Boyle, W. S., M. A. Lampert, J. S. Lipsick, and M. A. Baluda.** 1984. Avian myeloblastosis virus and E26 virus oncogene products are nuclear proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**:4265–4269.
6. **Chen, J. H.** 1986. The proto-oncogene c-*ets* is preferentially expressed in lymphoid cells. Mol. Cell. Biol. **5**:2993–3000.
7. **Coll, J., M. Righi, 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.
8. **de Taisne, C., A. Gegonne, D. Stehelin, A. Bernheim, and R. Berger.** 1984. Chromosomal localization of the human proto-oncogene *c-ets*. Nature (London) **310**:581–583.
9. **Dodgson, J. B., J. Strommer, and D. Engel.** 1979. Isolation of the chicken B globin gene and a linked embryonic B-like globin gene from a chicken DNA recombinant library. Cell **17**:879–887.
10. **Gegonne, A., P. Pognonec, D. Leprince, D. Dernis, E. Remaut, D. Stehelin, and J. Ghysdael.** 1986. Preparation and characterization of specific antisera directed against different polypeptidic domains encoded by the *v-ets* oncogene of the avian acute leukemia virus E26. C. R. Acad. Sci. (Paris) **303**:253–256.
11. **Ghysdael, J., A. Gegonne, P. Pognonec, D. Dernis, D. Leprince, and D. Stehelin.** 1986. Identification and preferential expression in thymic and bursal lymphocytes of a *c-ets* protooncogene encoded Mr 54 000 cytoplasmic protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**:1714–1718.
12. **Ghysdael, J., A. Gegonne, P. Pognonec, K. Boulukos, D. Leprince, D. Dernis, C. Lagrou, and D. Stehelin.** 1986. Identification in chicken macrophages of a set of proteins related to, but distinct from, the chicken cellular *c-ets* encoded protein $P54^{c\text{-}ets}$. EMBO J. **5**:2251–2256.
13. **Graf, T., and D. Stehelin.** 1982. Avian leukaemia viruses oncogenes and genome structure. Biochem. Biophys. Acta **651**:245–271.
14. **Harper, M. E., G. Franchini, J. Love, M. I. Simon, R. C. Gallo, and F. Wong-Staal.** 1983. Chromosomal sublocalization of human *c-myb* and *c-fes* cellular onc genes. Nature (London) **304**:169–171.
15. **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.
16. **Leprince, D., A. Gegonne, J. Coll, C. de Taisne, A. Schneeberger, C. Lagrou, and D. Stehelin.** 1983. A putative second cell-derived oncogene of the avian leukaemia retrovirus E26. Nature (London) **306**:395–397.
17. **Messing, J., R. Crea, and P. H. Seeburg.** 1981. A system for shotgun DNA sequencing. Nucleic Acids Res. **9**:309–321.
18. **Mount, S. M.** 1982. A catalogue of splice junction sequences. Nucleic Acids Res. **10**:459–472.
19. **Nunn, M. F., P. H. Seeburg, C. Moscovici, and P. H. Duesberg.** 1983. Tripartite structure of the avian erythroblastosis virus E26 transforming gene. Nature (London) **306**:391–395.
20. **Peterson, T. A., J. Yochem, B. Byers, M. F. Nunn, P. H. Duesberg, R. F. Doolittle, and S. I. Reed.** 1984. A relationship between the yeast cell cycle genes CDC4 and CDC36 and the *ets* sequence of oncogenic virus E26. Nature (London) **309**:556–558.
21. **Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain terminator inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**:5463–5467.
22. **Saule, S., J. Coll, M. Righi, C. Lagrou, M. B. Raes, and D. Stehelin.** 1983. Two different types of transcription for the myelocytomatosis viruses MH2 and CMII. EMBO J. **2**:805–809.
23. **Saule, S., A. Sergeant, G. Torpier, M. B. Raes, S. Pfeifer, and D. Stehelin.** 1982. Subgenomic mRNA in OK10 defective leukemia virus transformed cells. J. Virol. **42**:71–82.
24. **Southern, E. M.** 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. **98**:503–517.
25. **Thomas, P. S.** 1980. Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**:5201–5205.
26. **Watson, D. K., M. S. McWilliams-Smith, C. Kozak, R. Reeves, J. Gearhart, M. F. Nunn, W. Nash, J. R. Fowle III, P. Duesberg, T. S. Papas, and S. J. O'Brien.** 1986. Conserved chromosomal positions of dual domains of the *ets* protooncogene in cats, mice and humans. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**:1792–1794.
27. **Watson, D. K., M. J. McWilliams, M. F. Nunn, P. H. Duesberg, S. S. O'Brien, and T. S. Papas.** 1985. The *ets* sequence from the transforming gene of avian erythroblastosis virus, E26, has unique domains on human chromosomes 11 and 21: both loci are transcriptionally active. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**:7294–7298.

Article 4

Proc. Natl. Acad. Sci. USA
Vol. 83, pp. 1714–1718, March 1986
Cell Biology

Identification and preferential expression in thymic and bursal lymphocytes of a c-*ets* oncogene-encoded M_r 54,000 cytoplasmic protein

(E26 leukemia virus oncogenes/*ets*-specific antibodies/lymphocytes differentiation)

J. GHYSDAEL, A. GEGONNE, P. POGNONEC, D. DERNIS, D. LEPRINCE, AND D. STEHELIN

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unite 186, Centre National de la Recherche Scientifique UA 04 1160, Institut Pasteur, 1 Rue Calmette, 59019 Lille Cedex, France

Communicated by J. Brachet, October 21, 1985

ABSTRACT **The avian retrovirus E26 is unique among acute leukemia viruses in its ability to induce transformation of cells belonging to either the myeloid or erythroid lineage. The genome of E26 carries two oncogenes, v-*myb* and v-*ets*, that are derived from distinct cellular loci, c-*myb* and c-*ets*. We have constructed a plasmid vector that allows expression of part of the coding region of v-*ets* in a bacterial host. Antisera to the bacterially synthesized ets protein specifically precipitated the E26-encoded $P135^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$ transforming protein. These antisera permitted us to identify a chicken c-*ets*-encoded protein of M_r 54,000 ($P54^{c\text{-}ets}$) that shares 7 out of 10 of its major [^{35}S]methionine-containing tryptic peptides with the v-*ets*-encoded domain of $P135^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$. Unlike $P135^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$ and the M_r 75,000 translation product of c-*myb* ($P75^{c\text{-}myb}$), which are nuclear proteins, $P54^{c\text{-}ets}$ was found to be predominantly cytoplasmic. $P54^{c\text{-}ets}$ is expressed at low levels in most cell lines and tissues tested, including bone marrow cells and circulating lymphocytes. $P54^{c\text{-}ets}$, together with a minor but closely related M_r 56,000 protein, was found to be expressed at high levels in chicken thymocytes and bursal lymphocytes.**

The replication-defective avian leukemia virus E26 induces a mixed erythroid/myeloid leukemia in chickens and transforms cells belonging to either the myeloid or erythroid lineage in tissue culture (1–3). The genomic RNA of E26 contains, in addition to the v-*myb* oncogene also found in the strictly myeloid transforming retrovirus avian myeloblastosis virus (AMV) (4), a second transformation-specific sequence, v-*ets* (5, 6). It is generally believed that the broader oncogenic potential of E26 compared to that of AMV results at least in part from the expression of the v-*ets* oncogene. The v-*myb* and v-*ets* oncogenes are expressed as part of a unique M_r 135,000 transforming polyprotein ($P135^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$) containing retroviral *gag* determinants at its amino terminus (7). $P135^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$ is localized in the nucleus of transformed cells (8) and exhibits DNA binding activity *in vitro*, a property that appears instrumental in its ability to transform myeloblasts (9). The v-*myb* oncogene apparently arose by transduction of portions of a cellular c-*myb* protooncogene, which is present in the genome of all vertebrate animals (10) and encodes a M_r 75,000 nuclear protein (11). High level expression of c-*myb* appears restricted to hematopoietic tissues and cell lines and is particularly prominent in thymocytes (12, 13). The v-*ets* oncogene is also derived from cellular DNA sequences (c-*ets*) clearly distinct from the c-*myb* locus (5).

To gain some insight on the physiological role(s) of c-*ets* and the mode of oncogenic activation of v-*ets*, we undertook to identify the protein encoded by c-*ets* and to study its pattern of expression in various tissues and cell lines.

We describe here the production of a rabbit antiserum specific for the *ets*-encoded domain of $P135^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$ and report the expression of high levels of a c-*ets*-encoded M_r 54,000 cytoplasmic protein ($P54^{c\text{-}ets}$) in avian thymocytes and bursal lymphocytes.

MATERIALS AND METHODS

Cells and Viruses. E26-transformed chicken fibroblasts and myeloblasts were obtained from T. Graf (European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg). Other cell lines used in this study were described (14) and included erythroblasts transformed by avian erythroblastosis virus (AEV-Ebl); myeloblasts transformed by AMV (AMV-Mbl); HD11, a macrophage cell line transformed by the avian myelocytomatosis virus MC29; OK10 BM, a macrophage-like cell line obtained from an OK10 virus-infected chicken; RP9 and TLT, B-lymphoblastic cell lines derived from avian leukosis virus-induced leukemia; TV1, a non-B non-T lymphoblastoid cell line derived from an avian reticuloendotheliosis virus-induced leukemia; MSB1 and RP1, T-lymphoblastoid cell lines obtained from chickens infected with Marek disease virus. Chicken embryo cells were obtained by trypsinization of decapitated 9-day-old embryos; cell suspensions from thymus and bursa were prepared by squeezing the organ through a plastic mesh to obtain single cells; bone marrow cells were obtained by flushing the femurs of 3-week-old chickens with Dulbecco's modified Eagle's medium; peripheral leukocytes were obtained by Ficoll/Hypaque centrifugation of whole blood.

Construction of a v-*ets* Expression Vector. The E26 molecular clone used has been described (5). A fragment of the v-*ets* coding region was inserted into the bacterial expression vector pPLc24 (15) as described in Fig. 1*A*.

Purification of the Bacterial Protein and Preparation of Antisera. To prepare large amounts of the bacterial fusion protein $bP17^{MS2\text{-}ets}$ for immunization, induced bacterial cells from a 1-liter culture were centrifuged (8000 × *g*, 15 min) and resuspended in 0.1 vol of 50 mM Tris·HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA and 2 mg of lysozyme/ml. After 5 min at 4°C, the crude lysate was adjusted to 0.5 M NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 1% Nonidet P-40 and 50 μg of DNase I/ml and incubated for 60 min at 4°C. $bP17^{MS2\text{-}ets}$ is insoluble under these conditions and was recovered by centrifugation at 10,000 × *g* for 10 min. The pellet was washed several times in 10 mM Tris·HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, and 1% Nonidet P-40, and proteins were solubilized by boiling in $NaDodSO_4$ as described above and electrophoresed on a preparative $NaDodSO_4$/polyacrylamide gel. $bP17^{MS2\text{-}ets}$ was recovered by electroelution (16). Rabbits were immunized with 100–200 μg of purified $bP17^{MS2\text{-}ets}$ emulsified in complete Freund adjuvant by intra-

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be hereby marked "*advertisement*" in accordance with 18 U.S.C. §1734 solely to indicate this fact.

Abbreviation: AMV, avian myeloblastosis virus.

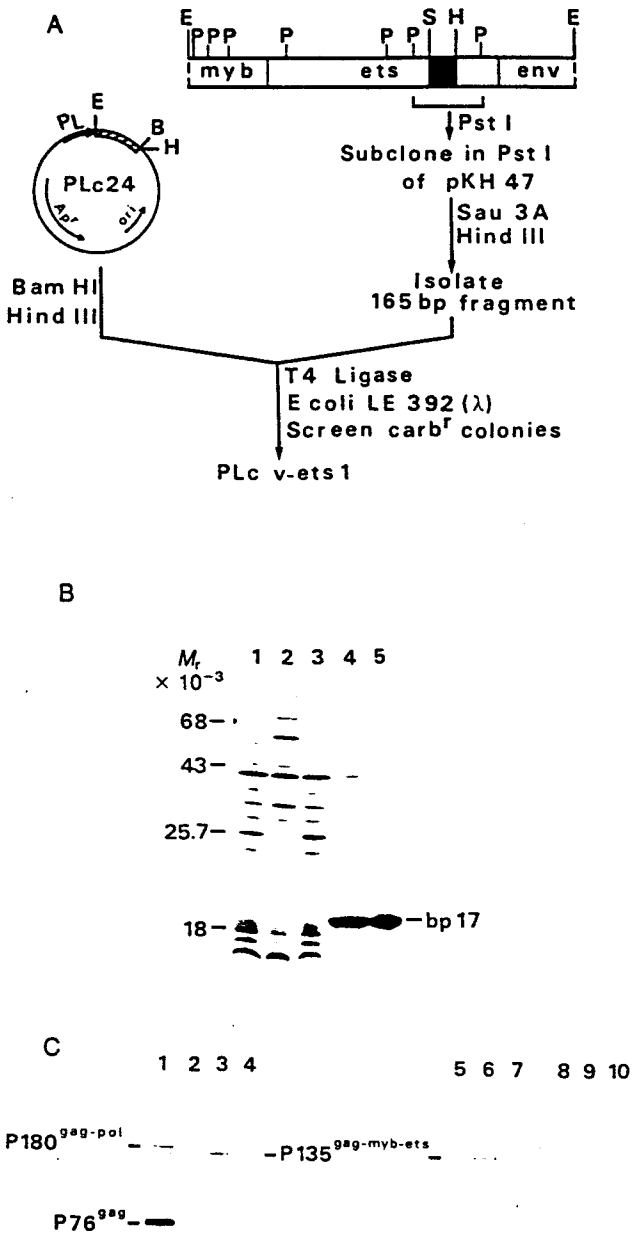


FIG. 1. Expression of a portion of v-*ets* in bacteria and specificity of an antiserum to the bacterially expressed v-*ets* product. (*A*) Schematic outline describing the construction of pPLc24-v-ets-1. A *Sau*3A–*Hin*dIII fragment (nucleotides 1603–1765 in ref. 6) was isolated from a plasmid containing a biologically active E26 provirus. The purified fragment was inserted between the *Bam*HI and *Hin*dIII sites of pPLc24 (15), an expression vector that contains the P_L promoter of bacteriophage λ, the ribosome binding site, and sequences for the first 99 amino acids of the polymerase of phage MS2. This results in the in-frame fusion of the sequence for 56 v-*ets*-encoded amino acids to the MS2 polymerase sequences. Recombinant plasmids were cloned into an *Escherichia coli* LE 392 (λ) host. For expression, plasmids were transferred into an *E. coli* K12 Δ H1 Δ Trp host (23) that supplies a temperature-sensitive repressor coded by a resident defective prophage. In this host, repression is complete at 28°C and full induction obtained at 42°C. Restriction enzymes are as follows: B, *Bam*HI; H, *Hin*dIII; P, *Pst* I; S, *Sau*3A; E, *Eco*RI. (*B*) Expression of a v-*ets* polypeptide ($bP17^{MS2-ets}$) in *E. coli*. Cultures of exponentially growing bacteria carrying pPLc24-v-ets-1 or the parental pPLc24 vector were incubated at 28°C or 42°C for 3 hr. Aliquots containing bacterial cells were removed from each culture, the cells were disrupted by boiling in a $NaDodSO_4$-containing buffer (18), and the lysates were electrophoresed in a 15% $NaDodSO_4$/polyacrylamide gel. Proteins were visualized by staining with Coomassie brilliant blue. Transformants are as follows: (lane 1) pPLc24, 28°C; (lane 2) pPLc24, 42°C; (lane 3) pPLc24-v-ets-1, 28°C; (lane 4) pPLc24-v-ets-1, 42°C; (lane 5) purified $bP17^{MS2-ets}$. (*C*) Immunoprecipitation analysis of E26-transformed cells. Myeloblasts transformed by E26 were grown in either the presence (lanes 5–7) or absence (lanes 8–10) of chicken myelomonocytic growth factor and E26-transformed fibroblasts (lanes 1–4) were labeled for 60 min with L-[^{35}S]methionine (100 μCi/ml; 1 Ci = 37 GBq), lysates were prepared, viral-encoded proteins were immunoprecipitated, and immunoprecipitates were analyzed by electrophoresis on a 10% $NaDodSO_4$/polyacrylamide gel followed by fluorography. Sera used were as follows: (lanes 2, 5, and 8) nonimmune; (lane 1) antiserum to avian retroviral gag structural proteins; (lanes 3, 6, and 9) anti-ets serum; (lanes 4, 7, and 10) anti-ets serum blocked by preincubation with an excess of $bP17^{MS2-ets}$.

dermal injections at 30 different spots along the back. Booster injections were done subcutaneously and intramuscularly in incomplete Freund adjuvant at intervals of 3 weeks.

Cell Labeling, Immunoprecipitation, and Tryptic Peptide Analyses. Labeling of cells with L-[^{35}S]methionine, preparation of cell lysates, immunoprecipitation, $NaDodSO_4$/polyacrylamide gel electrophoresis, and two-dimensional tryptic peptide analyses have been described (17, 18).

Subcellular Fractionation. We followed essentially the method described by Abrams *et al.* (19) for subcellular fractionation. Labeled cells were rinsed twice in phosphate-buffer saline (Na_2HPO_4, 8 mM; KH_2PO_4, 1.5 mM; NaCl, 0.136 M; KCl, 2 mM; pH 7.2), pelleted, and resuspended at 10^7 cells/ml in lysis buffer [20 mM Hepes (pH 7.1), 5 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, and 1% Trasylol]. After 15 min at 0°C cells were broken by 20–30 strokes of a tight fitting pestle in a Dounce homogenizer. The homogenate was adjusted to 150 mM NaCl and centrifuged at 2000 × *g* for 10 min to pellet nuclei. The 2000 × *g* supernatant was further separated into soluble and membrane fractions by centrifugation at 100,000 × *g* for 30 min. The pelleted nuclei were resuspended in 1 ml of lysis buffer adjusted to 0.5% Nonidet P-40, centrifuged at 2000 × *g*, and then washed twice in N buffer (19). The pooled supernatants of these centrifugations represented the nuclear-wash fraction. Nuclei were finally centrifuged through a 1.8 M sucrose cushion at 2500 × *g* for 15 min. All subcellular fractions were adjusted to 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% $NaDodSO_4$, and 1% Trasylol and centrifuged at 100,000 × *g* for 30 min to pellet debris. Integrity of each fraction was monitored on parallel fractionations of MSB1 cells infected with Rous-associated virus, type 1. *gag*-encoded proteins served as markers of the cytoplasmic fraction and *env*-encoded glycoproteins as markers of the membrane fraction. Since MSB1 cells express increased levels of c-*myc*, $P61^{c\text{-}myc}$ was used as nuclear marker.

RESULTS

To obtain antisera against the *ets*-encoded proteins, a v-*ets*-specific *Sau*3A–*Hin*dIII fragment (nucleotides 1603–1765 in ref. 6) of a plasmid containing a biologically active E26 provirus (5) was inserted between the *Bam*HI and *Hin*dIII sites of the expression vector pPLc24 (15), which contains the thermoinducible P_L promoter from phage λ. In the resultant plasmid (pPLc-v-ets-1), the sequence coding for 56 v-*ets*-encoded amino acids is fused in frame with that coding for 99 amino acids of the polymerase of phage MS2, as diagrammed in Fig. 1*A*. Upon temperature induction, bacte-

rial cells synthesized large amounts of a polypeptide with an apparent M_r 17,000 ($bP17^{MS2\text{-}ets}$; Fig. 1*B*, lane 4). Antisera directed against *ets*-encoded proteins were obtained by immunizing rabbits with $NaDodSO_4$/PAGE purified $bP17^{MS2\text{-}ets}$. The reactivity and specificity of these antisera were tested by their ability to immunoprecipitate the E26-encoded $P135^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$ protein. As shown in Fig. 1*C*, lanes 3 and 6, an antiserum obtained from an immunized rabbit specifically immunoprecipitated a M_r 135,000 polypeptide from lysates of [^{35}S]methionine-labeled E26-transformed fibroblasts or myeloblasts. Several lines of evidence indicate that this protein is the E26-encoded $P135^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$. First, the same protein (as judged by tryptic peptide analysis, data not shown) is precipitated by a serum to *gag* virion proteins (Fig. 1*C*, lane 1). Second, it is absent from lysates of various uninfected cells or lysates of helper virus-infected cells precipitated in similar conditions (Fig. 2). Third, its level in E26-transformed myeloblasts is enhanced in the presence of chicken myelomonocytic growth factor (ref. 20; Fig. 1*C* compare lanes 6 and 9), a property of $P135^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$ (21). The immunoprecipitation of $P135^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$ from lysates of E26-transformed cells with our anti-ets serum can be completely suppressed in the presence of purified $bP17^{MS2\text{-}ets}$ thus demonstrating that the antibodies responsible for the precipitation of $P135^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$ are directed against $bP17^{MS2\text{-}v\text{-}ets}$ (Fig. 1*C*).

To identify products encoded by c-*ets*, we screened various avian cell lines for the presence of proteins reactive with our anti-ets serum. As shown in Fig. 2*A*, lane 2, the anti-ets serum specifically immunoprecipitated a protein of apparent M_r 54,000 from lysates of [^{35}S]methionine-labeled MSB1 cells, a T-lymphoid cell line. The reaction of the antiserum with this protein is abolished in the presence of an excess of $bP17^{MS2\text{-}v\text{-}ets}$ (Fig. 2*A*, compare lane 1 and 2), suggesting that the M_r 54,000 protein might be encoded by c-*ets* ($P54^{c\text{-}ets}$). To substantiate this point, we compared the two-dimensional maps of the [^{35}S]methionine-containing peptides obtained by trypsin digestion of $P54^{c\text{-}ets}$ and $P135^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$. As shown in Fig. 3 *B*, *C*, and *E*, 7 out of 10 of the major peptides obtained from $P54^{c\text{-}ets}$ are shared by $P135^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$. Most of the other peptides of $P135^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$ are contributed by the *gag*-encoded domain of $P135^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$, since they were also found in the tryptic peptide map of $Pr76^{gag}$, the translation product of the *gag* gene of replication-competent retroviruses (Fig. 3 *A* and *B*). The remaining peptides unique to $P135^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$ presumably derived from the v-*myb*-encoded domain of $P135^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$. These results are summarized in Fig. 3*F*. All of the seven peptides shared between $P54^{c\text{-}ets}$ and $P135^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$ were found to be present in a M_r 80,000 fragment generated from the carboxyl-terminal domain of $P135^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$ by cleavage with virion protease p15 (result not shown). We conclude from these experiments that the M_r 54,000 protein precipitated by the anti-ets serum is closely related to the carboxyl-terminal domain of $P135^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$ and thus represents a protein encoded by c-*ets*. Polypeptides with similar size and structurally related to the avian $P54^{c\text{-}ets}$ were also identified by the anti-ets serum in lysates of murine, bovine, and human cells, indicating the high conservation of c-*ets* in vertebrates (results not shown).

To determine the subcellular location of $P54^{c\text{-}ets}$, we fractionated lysates of [^{35}S]methionine-labeled MSB1 cells into cytoplasmic, membrane, and nuclear fractions and immunoprecipitated an equivalent amount of each fraction with an excess of anti-ets serum. As shown in Fig. 4, the majority of $P54^{c\text{-}ets}$ was found to be present in the cytoplasmic fraction. Similar fractionation experiments using E26-transformed myeloblasts showed that, in accordance with previous results (10), $P135^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$ is localized predominantly in the nucleus of transformed cells (data not shown).

We next compared the level of expression of $P54^{c\text{-}ets}$ in avian tissues and cell lines of various histological origins. Cells were labeled with [^{35}S]methionine, and lysates were immunoprecipitated with an excess of anti-ets serum. Low levels of $P54^{c\text{-}ets}$ were found in most tissues and cell lines tested including total chicken embryo, bone marrow cells, fibroblasts, macrophages, and erythroblasts (Fig. 2*A* and data not shown). As shown in Fig. 2*A*, in addition to low amounts of $P54^{c\text{-}ets}$, the anti-ets serum precipitates three additional polypeptides of M_r 60,000, M_r 62,000, and M_r 64,000 from lysates of the MC29-transformed macrophage cell line HD11. These polypeptides are highly related to each other but show only a limited domain of sequence homology to $P54^{c\text{-}ets}$ (unpublished results). Conspicuous levels of $P54^{c\text{-}ets}$ were found in most lymphoid cell lines tested, whether of B, T, or non-B/non-T origin (Fig. 2*A*). Large amounts of $P54^{c\text{-}ets}$ were detected in lymphocytes obtained from avian embryonic and postnatal thymuses and bursa of Fabricius and analyzed in similar conditions (Fig. 2*B*). In

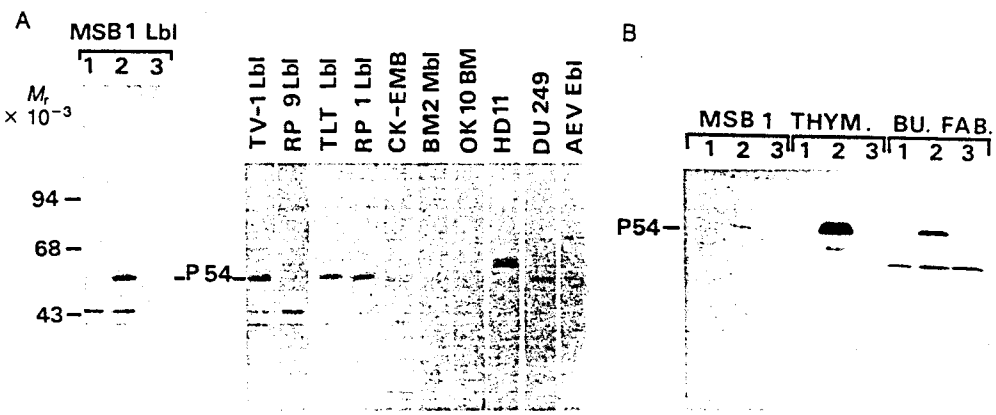


FIG. 2. Identification of a protein encoded by c-*ets*. Approximately 10^7 cells were labeled for 60 min with 250 μCi/ml of L[^{35}S]methionine, lysates were prepared and immunoprecipitated, and immunoprecipitates were electrophoresed on a 15% $NaDodSO_4$/polyacrylamide gel. The amount of radioactivity incorporated into total cellular proteins of each lysate was determined from trichloroacetic acid precipitates. Equal amounts of acid-insoluble radioactivity of each lysate were used in all immunoprecipitations. Cell types used are listed across the top of the figure. (*A*) MSB1 cell line lysate immunoprecipitated with the following: (lane 1) anti-ets serum adsorbed with an excess of $bP17^{MS2\text{-}ets}$; (lane 2) anti-ets serum; (lane 3) nonimmune serum. Other lysates were immunoprecipitated with anti-ets serum. (*B*) Cell suspensions from thymuses of 16-day-old embryos and bursa of Fabricius (B.F.) from 2-week-old chickens immunoprecipitated with the following: (lane 1) nonimmune serum; (lane 2) anti-ets serum; (lane 3) anti-ets serum absorbed with an excess of $bP17^{MS2\text{-}ets}$. Exposure time of fluorograms of *A* and *B* were 10 days and 3 days, respectively.

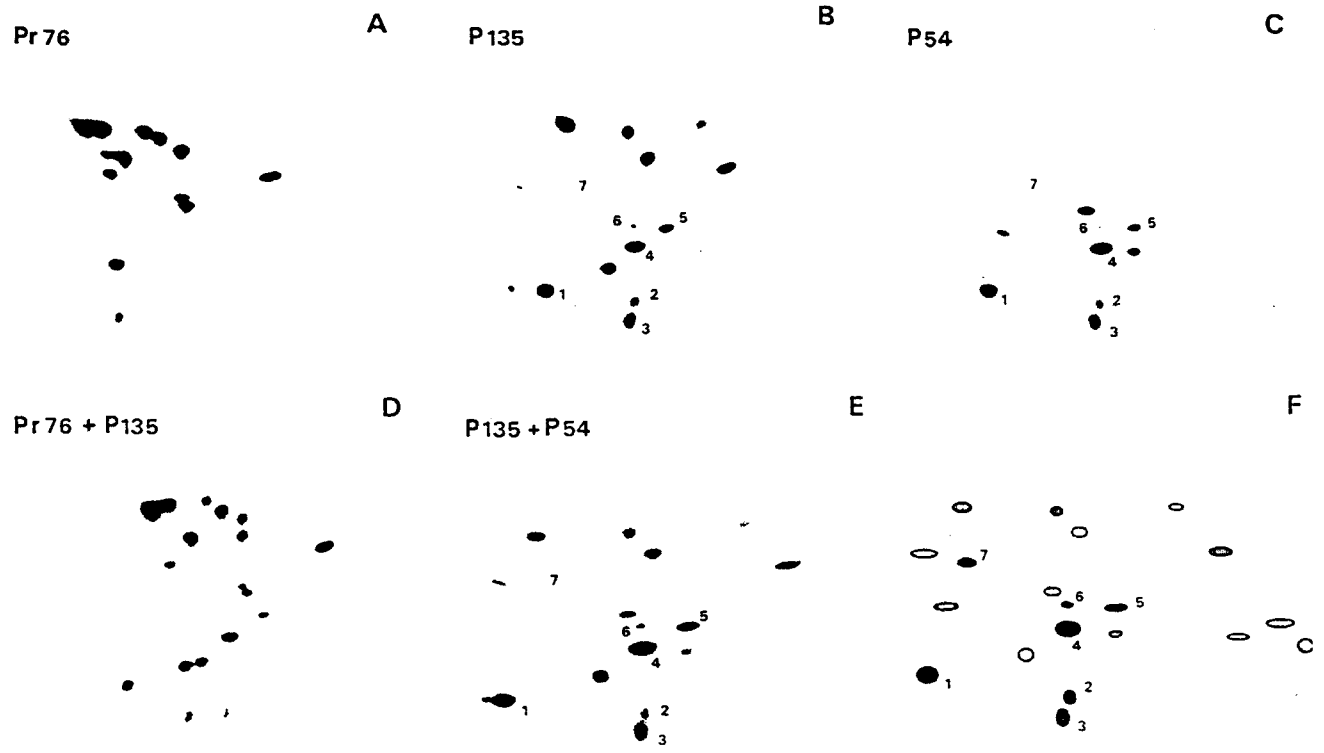


FIG. 3. Two-dimensional tryptic peptide maps of *ets*-encoded polypeptides. [^{35}S]methionine labeled proteins were eluted from gels similar to those of Figs. 1 and 2, oxidized with performic acid, digested with L-1-tosylamido-2-phenylethyl chloromethyl ketone-treated trypsin, applied to cellulose thin layer plates, and separated in the first dimension by electrophoresis at pH 4.5 and by ascending chromatography in the second dimension. The origin of each map is at the lower left. Electrophoresis toward the cathode is from left to right and chromatography from bottom to top. (*A*) Pr76^{gag}. (*B*) P135$^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$. (*C*) P54$^{c\text{-}ets}$. (*D* and *E*) Mixing experiments where similar amounts of radioactivity of tryptic digests (as indicated) are combined prior to two-dimensional separation. (*F*) Schematic drawing of *E*. Peptides shared by P135$^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$ and P54$^{c\text{-}ets}$ are numbered and represented as solid spots. (Hatched spots) Peptides shared by P135$^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$ and Pr76^{gag}. (Stippled spots) Peptides unique to P54$^{c\text{-}ets}$. (Open spots) Peptides unique to P135$^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$.

contrast, expression of P54$^{c\text{-}ets}$ was found to be below the limit of detection in circulating lymphocytes and myeloblasts (Fig. 2*A* and results not shown). In addition to P54$^{c\text{-}ets}$, small amounts of a M_r 56,000 protein are specifically precipitated by the anti-ets serum from thymocyte lysates (Fig. 2). This protein is closely related to P54$^{c\text{-}ets}$ by two-dimensional tryptic peptide analysis (data not shown) and might result from posttranslational modifications of P54$^{c\text{-}ets}$.

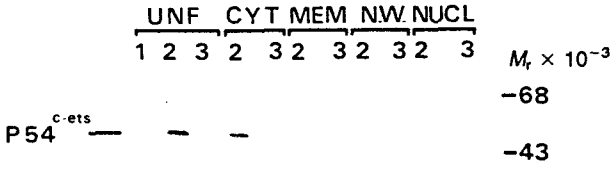


FIG. 4. Subcellular fractionation of MSB1 cells. Approximately 3×10^7 MSB1 cells were labeled with 500 μCi of L-[^{35}S]methionine for 2 hr as described in Fig. 1. Labeled cells were fractionated into nuclear, membrane, cytoplasmic, and nuclear wash fractions. Aliquots of the unfractionated lysate (UNF) and of each fraction corresponding to the same number of cells were immunoprecipitated, and immunoprecipitates were analyzed by electrophoresis on 15% NaDodSO$_4$/polyacrylamide gels.

DISCUSSION

In this study we identified a c-*ets*-encoded protein of M_r 54,000 (P54$^{c\text{-}ets}$) on the basis of its immunological and structural relatedness to the v-*ets*-encoded domain of P135$^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$. From the comparison of its apparent size and the alleged size of the E26 v-*ets*-encoded domain (475 amino acids, unpublished data) and from the fact that P54$^{c\text{-}ets}$ contains unique peptides in addition to those shared with P135$^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$, we conclude that v-*ets* includes most but not all of the coding sequence of c-*ets*.

Unlike the avian c-*myb* protein and E26 P135$^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$, which are nuclear, P54$^{c\text{-}ets}$ was found to be cytoplasmic. This result strongly suggests that the features that determine the nuclear location of P135$^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$ are encoded by the E26 v-*myb* gene. The oncogenic potential of E26 differs markedly from that of another v-*myb*-containing retrovirus, AMV, since myeloblasts transformed by E26 appear to be more tightly blocked in their differentiation capacity than AMV-transformed myeloblasts (22) and since only E26 induces erythroid and fibroblastic transformation (1–3). Although the exact contribution of v-*ets* to the unique oncogenic potential of E26 remains to be formally established by the study of appropriate deletion mutants, it is tempting to speculate that the abnormal (nuclear) location of the v-*ets*-encoded domain of P135$^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$ might be of importance to the oncogenic activation of v-*ets*.

We found P54$^{c\text{-}ets}$ to be expressed at high levels (similar to those of P135$^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$ in E26-transformed cells) in lymphocytes of both the thymus and bursa of Fabricius. In contrast, only low levels of P54$^{c\text{-}ets}$ were found in circulating blood lymphocytes as well as in all other tissues or cell lines tested,

suggesting a role for $P54^{c\text{-}ets}$ in lymphocyte proliferation. Large amounts of c-*myb* transcripts have been reported in primary lymphoid organs of chicken and mouse (12, 13). Furthermore, the level of c-myb RNA in mouse thymocytes appears to be modulated during thymocyte maturation (13). These observations raise the possibility that coexpression of both c-*myb* and c-*ets* might be of importance to thymocyte proliferation and/or maturation.

We thank Dr. E. Remaut (Ghent University, Belgium) for providing us with pPLc24, Dr. S. Saule and B. Vandenbunder for critical reading of the manuscript, C. Lagrou for expert technical assistance, and N. Devassine for patient typing. 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.

1. Moscovici, C., Samarut, J., Gazzolo, L. & Moscovici, M. G. (1981) *Virology* **113**, 765–768.
2. Radke, K., Beug, H., Kornfeld, S. & Graf, T. (1982) *Cell* **31**, 643–653.
3. Moscovici, M. G., Jurdic, P., Samarut, J., Gazzolo, L., Murra, C. V. & Moscovici, C. (1983) *Virology* **129**, 65–78.
4. Roussel, M., Saule, S., Lagrou, C., Rommens, C., Beug, H., Graf, T. & Stehelin, D. (1979) *Nature (London)* **281**, 452–455.
5. Leprince, D., Gegonne, A., Coll, J., de Taisne, C., Schneeberger, A., Lagrou, C. & Stehelin, D. (1983) *Nature (London)* **306**, 395–397.
6. Nunn, M. F., Seeburg, P. M., Moscovici, C. & Duesberg, P. H. (1983) *Nature (London)* **306**, 391–395.
7. Bister, K., Nunn, M., Moscovici, C., Perbal, B., Baluda, M. A. & Duesberg, P. H. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 3677–3681.
8. Klempnauer, K., Symonds, G., Evan, G. & Bishop, J. M. (1984) *Cell* **37**, 537–547.
9. Moelling, K., Pfaff, E., Beug, H., Beimling, P., Bunte, T., Schaller, H. E. & Graf, T. (1985) *Cell* **40**, 983–990.
10. Klempnauer, K., Gonda, T. J. & Bishop, J. M. (1982) *Cell* **31**, 453–463.
11. Klempnauer, K., Ramsay, G., Bishop, J. M., Moscovici, M. G., Moscovici, C., McGrath, J. P. & Levison, A. D. (1983) *Cell* **33**, 345–355.
12. Gonda, T. J., Sheiness, D. & Bishop, J. M. (1982) *Mol. Cell. Biol.* **2**, 617–624.
13. Sheiness, D. & Gardinier, M. (1984) *Mol. Cell. Biol.* **4**, 1206–1212.
14. Coll, J., Saule, S., Martin, P., Raes, M. B., Graf, T., Beug, H., Simon, H. E., Lagrou, C. & Stehelin, D. (1984) *Exp. Cell Res.* **149**, 151–162.
15. Remaut, E., Stanssens, P. & Fiers, W. (1981) *Gene* **15**, 81–93.
16. Mendel-Hartvig, I. (1982) *Anal. Biochem.* **121**, 215–217.
17. Ghysdael, J., Kettmann, R. & Burny, A. (1979) *J. Virol.* **29**, 1087–1098.
18. Ghysdael, J., Neil, J. C., Wallbank, A. M. & Vogt, P. K. (1981) *Virology* **111**, 386–400.
19. Abrams, H. D., Rohrschneider, L. R. & Eisenman, R. N. (1982) *Cell* **29**, 427–429.
20. Leutz, A., Beug, H. & Graf, T. (1984) *EMBO J.* **3**, 3191–3197.
21. Beug, H., Hayman, M. J. & Graf, T. (1982) *EMBO J.* **1**, 1069–1073.
22. Beug, H., Leutz, A., Kahn, P. & Graf, T. (1984) *Cell* **39**, 579–588.
23. Bernard, H. H., Remant, E., Hershfield, M. V., Das, H. K., Helinski, D. R., Yanofsky, C. & Franklin, N. (1979) *Gene* **5**, 59–76.

Article 5

VIROLOGY 156, 177–180 (1987)

The 5′ Extremity of the *v-ets* Oncogene of Avian Leukemia Virus E26 Encodes Amino Acid Sequences Not Derived from the Major *c-ets*-Encoded Cellular Proteins

ANNE GEGONNE, DOMINIQUE LEPRINCE, PHILIPPE POGNONEC, DOMINIQUE DERNIS, MARIE BERTHE RAES, DOMINIQUE STEHELIN, AND JACQUES GHYSDAEL[1]

INSERM U 186/CNRS UA 041160, Institut Pasteur, 1 Rue Calmette, 59019 Lille, France

Received July 7, 1986; accepted September 30, 1986

Antibodies were prepared against bacterially expressed polypeptides corresponding to various portions of the *v-ets*-encoded domain of P135$^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$, the transforming protein of avian leukemia virus E26. Immunoprecipitation analyses show that ca. 80 *v-ets*-encoded amino-acids located immediately after the *v-myb/v-ets* junction are not found in P54/56$^{c\text{-}ets}$, the translation product of the *c-ets* proto-oncogene, nor in a set of cellular proteins of 64, 62, and 60 kDa related to but distinct from P54/56$^{c\text{-}ets}$. In addition, Northern blot analyses show that these 5′ *v-ets* sequences neither derive from the nontranslated region of the known cellular transcripts hybridizing to a *v-ets* probe nor from the *c-myb* transcript or the helper virus genetic information. Tryptic peptide analyses furthermore indicate that, except for these sequences and the last 16 carboxy terminal amino acids of P135$^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$, the amino acids encoded by *v-ets* are essentially colinear with those of P54$^{c\text{-}ets}$. © 1987 Academic Press, Inc.

E26 is a replication-defective avian acute leukemia virus that induces a mixed erythroid/myeloid leukemia in chickens and transforms myeloblasts and erythroblasts in tissue culture (*1–4*). In addition to partial retroviral *gag* and *env* genes, the genome of E26 contains a slightly diverged version of the *v-myb* oncogene of avian myeloblastosis virus (AMV) and a E26-specific oncogene named *v-ets* (*5–8*). The *v-myb* and *v-ets* oncogenes are expressed, together with a partial viral *gag* gene as a 135-kDa polyprotein (P135$^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$) localized in the nucleus of transformed cells (*9, 10*). Immunoprecipitation and two-dimensional tryptic peptide analyses indicate that the coding domains of both *v-myb* and *v-ets* are truncated as compared to the 75 kDa (P75*c-myb*) and the 54/56 kDa (P54/56$^{c\text{-}ets}$) proteins encoded by the chicken *c-myb* and *c-ets* proto-oncogenes, respectively (*11–13*). Recent experiments have furthermore identified in chicken cells a second set of proteins of 64, 62, and 60 kDa immunologically and structurally related to, but distinct from P54/56$^{c\text{-}ets}$ (*14*).

To further characterize the relationship between the coding domain of *v-ets* and *c-ets*, we prepared antibodies against various domains of P135$^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$ and analyzed their ability to immunoprecipitate P54/56$^{c\text{-}ets}$ as well as P64, P62, and P60. High level expression in *E. Coli* of polypeptides encoded by several portions of *v-ets* was obtained by inserting *v-ets*-specific DNA fragments into the expression vector pPLC24 (*15*). For expression of the carboxy terminal domain of P135$^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$, a 897-nucleotide-long *Sau*3A–*Hin*dIII fragment spanning the *v-ets-env* region of E26 was inserted between the *Bam*HI and *Hin*dIII sites of pPLC24 (Fig. 1). Upon temperature induction, this plasmid di-

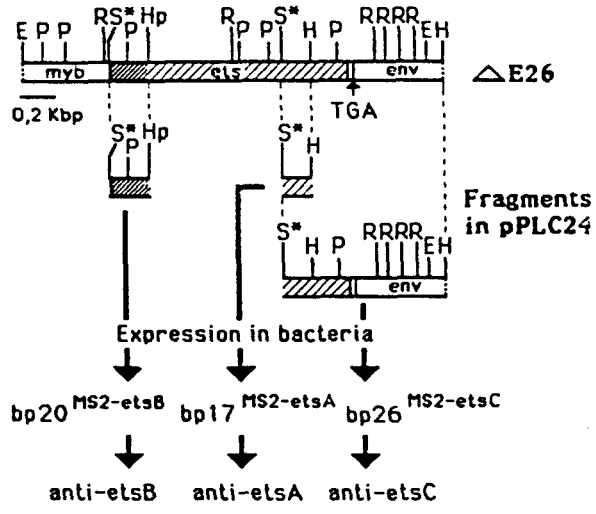


FIG. 1. Schematic outline describing the constructions of bacterial expression vectors used to prepare antisera to different regions of the *v-ets*-encoded domain of P135$^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$. We used the expression vector pPLC24 (*15*), that contains the PL promotor of bacteriophage λ and the ribosome binding site and sequences encoding the first 99 amino acids of the polymerase of phage MS2. For expression, plasmids were transfected into an *E. coli*$^{K12\Delta H1\Delta Trp}$ host (*18*) that supplies a temperature-sensitive repressor coded by a resident defective λ prophage. In this host, repression is complete at 28° and full induction obtained at 42°. Fusion polypeptides were purified and used as immunogens as previously described (*13*).

[1] To whom requests for reprints should be addressed.

0042-6822/87 $3.00
Copyright © 1987 by Academic Press, Inc.
All rights of reproduction in any form reserved.

rected the synthesis of a mol wt 26,000-Da protein (bp $26^{MS2\text{-}ets\ C}$, Fig. 1) containing the 135 carboxy terminal amino acids of $P135^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$, fused to MS2 replicase sequences. The expression of a *v-ets*-specific *Sau*3A–*Hin*dIII fragment (nucleotides 1603-1765 in Ref. *7*) as a mol wt 17,000-Da fusion polypeptide ($bp17^{MS2\text{-}ets\ A}$; Fig. 1) has been described earlier (*13*). Expression of the amino-terminal portion of the *v-ets*-encoded domain of $P135^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$ was obtained by inserting a *Sau*3A–*Hpa*I fragment (nucleotides 526-784 of Ref. *7;* Fig. 1) into a derivative of pPLC24. Upon temperature induction, this plasmid directed the synthesis of a mol wt 20,000-Da fusion protein ($bp20^{MS2\text{-}ets\ B}$, Fig. 1) containing the last three *v-myb*-encoded-and the first 83 *v-ets*-encoded amino acids of $P135^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$. As previously described (*13*), these polypeptides were purified by

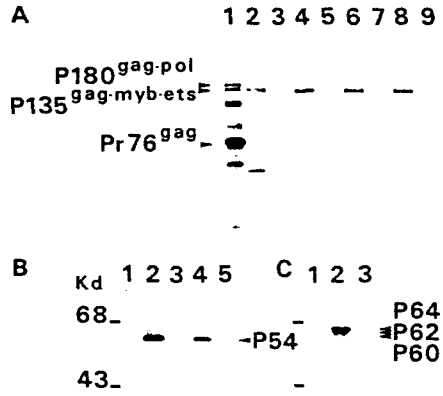


FIG. 2. (A) Immunoprecipitation analyses of E26 transformed cells. E26 transformed myeloblasts (10^7 cells) were labeled for 1 hr with 250 μCi/ml of L-[^{35}S]methionine. After labeling, cells were washed, lysed in 1 ml of a boiling 1% SDS solution, and diluted with 10 vol of 20 m*M* Tris–HCl, pH 7.2, NaCl 150 m*M*, Triton X-100 1%, Na deoxycholate 0.5%, Trasylol 1%. After centrifugation of the lysates at 100,000 *g* for 1 hr, immunoprecipitations were performed as described previously (*13*). Immunoprecipitated proteins were separated by electrophoresis on a 10% polyacrylamide slab gel in the presence of SDS followed by fluorography. Sera used were as follows: (1) antiserum to avian retroviral structural proteins; (2) anti-*myb* serum; (3) nonimmune control serum; (4) anti-*ets A* serum; (6) anti-*ets C* serum; (8) anti-*ets B* serum; (5, 7, 9), as (4, 6, 8) but sera were blocked by preincubation with an excess of the corresponding bacterially expressed polypeptides. (B) Immunoprecipitation of $P54/56^{c\text{-}ets}$ by the different *v-ets* antisera. Chicken thymocytes (10^7 cells) were labeled for 1 hr with 250 μCi/ml of L-[^{35}S]methionine, lysed, and immunoprecipitates prepared and analyzed by electrophoresis on a 10% NaDodSO4/polyacrylamide gel. Sera used were as follows: (1) anti-*ets B* serum; (2) anti-*ets A* serum; (3) anti-*ets A* serum blocked with an excess of bp $17^{MS2\text{-}ets\ A}$; (4) anti-*ets C* serum; (5) anti-*ets C* serum blocked with an excess of bp $26^{MS2\text{-}ets\ C}$. (C) Immunoprecipitation of *ets*-related proteins P64, P62, and P60 by the different *v-ets* antisera. Chicken macrophages transformed by MC29 (10^7 cells) were labeled with [^{35}S]methionine, lysed, and immunoprecipitation performed with (1) anti-*ets B* serum, (2) anti-*ets A* serum, (3) anti-*ets A* serum blocked with an excess of its bacterial polypeptide bp $17^{MS2\text{-}ets\ A}$. Analyses are by electrophoresis on a 10% polyacrylamide gel.

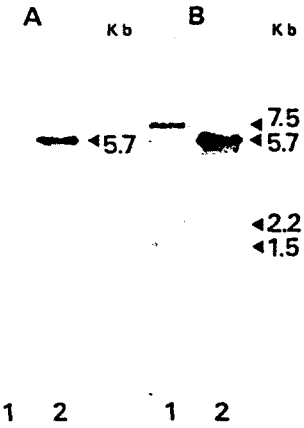


FIG. 3. The 5′ part of *v-ets* is not transcribed into the major *c-ets* RNAs. Polyadenylated RNA of the T lymphoid cell line MSB1 (lanes 1) and polyadenylated RNA of E26 transformed myeloblasts (lanes 2) were isolated by oligo (dT) cellulose chromatography, electrophoresed in 1% formaldehyde/agarose gel (*19*), blotted to nitrocellulose sheets (*20*) and hybridized with the following probes: A, a probe corresponding to the fragment *Sau*3A–*Hpa*I inserted into pPLC24 to obtain the anti-*ets B* serum; B, a probe corresponding to most of *v-ets* (*Rsa*I fragment extending from nucleotide 1277 to nucleotide 2224 in Ref. *7*).

preparative SDS–polyacrylamide gel electrophoresis and used to immunize rabbits to generate the anti-*ets A*, anti-*ets B*, and anti-*ets C* antisera (Fig. 1).

The results of Fig. 2A show that the three anti-*ets* antisera were able to immunoprecipitate the E26-encoded $P135^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$ transforming protein (Fig. 2A, lanes 4, 6, 8) with an efficiency similar to a *v-myb*-specific antiserum (Fig. 1, lane 2) or a serum to solubilized virion proteins (Fig. 2A, lane 1). This latter serum also precipitates the viral proteins encoded by the *gag, pol,* and *env* genes of the RAV-2 helper virus. Further evidence of the specificity of the anti-*ets* sera is provided by the fact that the reactivity of these antisera is blocked in the presence of an excess of the respective purified bacterial antigens (Fig. 2, lanes 5, 7, and 9).

In contrast to the ability of all three antisera to precipitate $P135^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$, the experiments of Fig. 2B show that, although the anti-*ets A* and anti-*ets C* sera were able to precipitate the *c-ets*-encoded $P54/56^{c\text{-}ets}$ (Fig. 2B, lanes 2 and 4), the anti-*ets B* serum was unable to recognize these proteins (Fig. 2B, lane 1). The results of Fig. 2C show that, unlike anti-*ets A* (Fig. 2C, lane 2) and anti-*ets C* (data not shown), the anti-*ets B* serum was similarly unable to immunoprecipitate P64, P62, and P60 (Fig. 2C, lane 1). It therefore appears from these experiments that most of the polypeptide domain encoded by the portion of *v-ets* located 5′ to the *Hpa*I site is not part of the *c-ets*-encoded products $P54/56^{c\text{-}ets}$ nor of the P60-P64 products encoded by a gene(s) related to, but distinct from *c-ets.* Screening of avian cell lines of various origins with the anti-*ets B* serum have

so far failed to detect any cross-reacting cellular proteins.

In order to rule out that the lack of reactivity of the anti-*ets B* serum could be due to amino acid sequence divergence between the viral and cellular proteins is that region, Northern blot analyses were performed using a probe specific of the 5′ extremity of *v-ets*. The results of Fig. 3A show that a *Sau*3A–*Hpa*I probe encompassing the 258 most 5′ nucleotides from *v-ets* failed to hybridize to the previously described (*6*) 7.5-, 2.2-, and 1.5-kb *c-ets* transcripts (Fig. 3A, lane 1) although that probe easily detected the 5.7-kb E26 genomic RNA (Fig. 3A, lane 2). This probe also failed to hybridize to the 4.0-kb *c-myb* transcript or to the RAV-2 helper virus genomic RNA. From the recently determined (Gegonne *et al.*, submitted for publication) genetic organization of the *v-ets* homologous exons of the chicken proto-*c-ets* it appears in fact that the cellular sequences homologous to the portion of *v-ets* located 5′ to the *Hpa*I site are included within a fragment of cellular DNA of approximately 6 kbp separated from the remaining of the *v-ets* homologous cellular sequences by 40 kbp of *v-ets*-unrelated DNA. These results, together with the fact that the last 16 amino acids of *v-ets* appear to be derived from sequences unrelated to *c-ets* (Gegonne *et al.*, submitted for publication) indicate that the genetic organization of the *v-ets* oncogene of E26 is complex and includes at the *v-myb/v-ets* junction amino-acid sequences neither found in P54/56*c-ets* nor P64-P60 nor transcribed in the major *v-ets* related cellular RNAs and, at its 3′-end amino acid sequences of unknown origin.

Recently, the *v-ets*-related sequences in human DNA have been shown to disperse in two different loci: the first locus, named Hu-*ets-1* is localized on chromosome 11 (11q23; *16, 17*) whereas the second locus, named Hu-*ets-2* is localized on chromosome 21 (21q22; *17*). Except for a short overlap region of 14 amino acids, the Hu-*ets-1* and Hu-*ets-2* loci appear to be discontiguous with respect to *v-ets* coding sequences and to be transcribed into different mRNA species (*17*). In the experiment of Fig. 4, we have compared the two-dimensional tryptic peptide maps of bp17$^{MS2\text{-}ets\ A}$, bp 26$^{MS2\text{-}ets\ C}$, and P54$^{c\text{-}ets}$. As expected from the constructions of Fig. 1, the unique [^{35}S]methionine-containing peptide of bp 17$^{MS2\text{-}ets\ A}$ is also found in the peptide map of bp 26$^{MS2\text{-}ets\ C}$ (compare Figs. 3A and B and mixing experiment in C). From the sequence of *v-ets* (*7*), this common methionine-containing peptide is expected to have the sequence Ala-Asp-Met-Asn-Lys (see Fig. 3) and, from the data of Watson *et al.* (*17*) to represent, in man, a Hu-*ets1* marker. The results of Fig. 3D show that the bp 26$^{MS2\text{-}ets\ C}$ contains an additional [^{35}S]methionine-containing tryptic peptide also

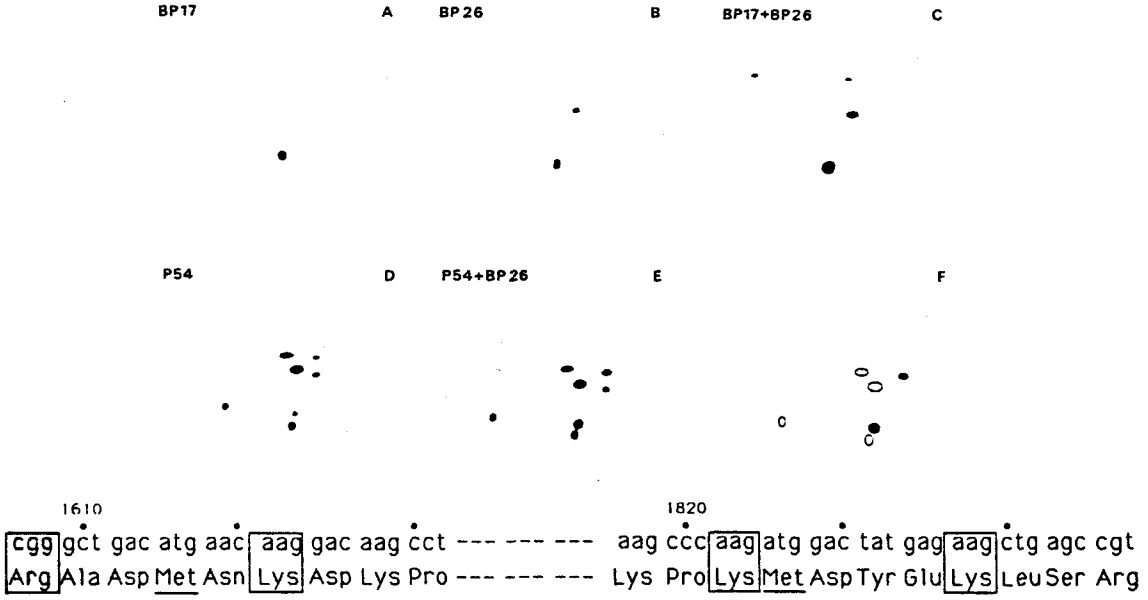


FIG. 4. Comparison of the two-dimensional tryptic peptides maps of the bacterial polypeptides bp17MS2-*ets A*, bp26MS2-*ets C*, and P54*c-ets*. [^{35}S]Methionine-labeled proteins were eluted from gels similar to those of Fig. 2, oxidized with performic acid, digested with TPCK-treated trypsin, applied to cellulose thin-layer plates, and separated in the first dimension by electrophoresis at pH 4.5 and by ascending chromatography in the second dimension (*13*). The origin of each map is at the lower left. Electrophoresis toward the cathode is from left to right and chromatography from bottom to top. A, bacterial polypeptide bp17$^{MS2\text{-}ets\ A}$; B, bacterial polypeptide bp26$^{MS2\text{-}ets\ C}$; C, mixing experiments between bp17$^{MS2\text{-}ets\ A}$ and bp26$^{MS2\text{-}ets\ C}$; D, P54$^{c\text{-}ets}$; E, mixture of bp26$^{MS2\text{-}ets\ C}$ and P54$^{c\text{-}ets}$; F, schematic drawing of E peptides shared by P54$^{c\text{-}ets}$ and bp26$^{MS2\text{-}ets\ C}$ are represented as solid spots. The partial sequence defined under the two-dimensional peptide maps display the presumed structure of the tryptic peptides shared by P54$^{c\text{-}ets}$ and bp26$^{MS2\text{-}ets\ C}$.

shared with $P54^{c\text{-}ets}$ and $P135^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$ (*13*). From the sequence of *v-ets* (*7*), and that of a human *c-ets-2* cDNA (*17*) this peptide is expected to have the sequence Met-Asp-Tyr-Glu-Lys and to be, in man, a Hu-*ets-2* marker. As shown in Fig. 4D (and mixing experiment in E) and schematized in Fig. 4F, both of these peptides are found in the [^{35}S]methionine tryptic peptides map of $P54^{c\text{-}ets}$. It therefore appears that at least some of the coding sequence defined as unique of Hu-*ets-1* and Hu-*ets-2* (*17*) are found to be part of a single polypeptide ($P54^{c\text{-}ets}$) in chicken cells. These data, together with the fact that all but one of the tryptic peptides of $P54^{c\text{-}ets}$ are found in the *v-ets*-encoded domain of $P135^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$ (*13*), furthermore suggest that, except for the first ca. 80 amino acids following the *v-myb/v-ets* junction and for its last 16 amino acids, the amino acid sequence of the *v-ets*-encoded domain of $P135^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$ is essentially colinear with that of $P54^{c\text{-}ets}$. Definitive demonstration of this point will require the comparison of the nucleotide sequence of *v-ets* and that of a cDNA representative of the total coding region of $P54^{c\text{-}ets}$.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Nicole Devassine for patient typing of the manuscript. This study was supported by funds from INSERM, CNRS, Association de la Recherche contre le Cancer, and Institut Pasteur de Lille.

REFERENCES

1. Graf, T., Oker-Blom, N., Todorov, T. G., and Beug, H., *Virology* **99**, 431–436 (1979).
2. Moscovici, C., Samarut, J., Gazzolo, L., and Moscovici, M. G., *Virology* **113**, 765–768 (1981).
3. Radke, K., Beug, H., Kornfeld, S., and Graf, T., *Cell* **31**, 643–653 (1982).
4. Moscovici, M. G., Jurdic, P., Samarut, J., Gazzolo, L., Murra, C. V., and Moscovici, C., *Virology* **129**, 65–78 (1983).
5. Roussel, M., Saule, S., Lagrou, C., Rommens, C., Beug, H., Graf, T., and Stehelin, D., *Nature (London)* **281**, 452–455 (1979).
6. Leprince, D., Gegonne, A., Coll, J., De Taisne, C., Schneeberger, C., Lagrou, C., and Stehelin, D. *Nature (London)* **306**, 395–397 (1983).
7. Nunn, M. F., Seeburg, P. M., Moscovici, C., and Duesberg, P., *Nature (London)* **306**, 391–395 (1983).
8. Nunn, M. F., Weiher, H., Bullock, P., and Duesberg, P., *Virology* **139**, 330–339 (1984).
9. Beug, H., Hayman, M. J., and Graf, T., *EMBO J.* **1**, 1069–1073 (1982).
10. Klempnauer, K., Symonds, G., Evan, G., and Bishop, J. M., *Cell* **37**, 537–547 (1984).
11. Klempnauer, K. H., Ramsay, G., Bishop, J. M., Moscovici, M. G., Moscovici, C., Mc Grath, J. P., and Levison, A. D., *Cell* **33**, 345–355 (1983).
12. Chen, J. H., *Mol. Cell. Biol.* **5**, 2993–3000 (1985).
13. Ghysdael, J., Gegonne, A., Pognonec, P., Dernis, D., Leprince, D., and Stehelin, D., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 1714–1718 (1986).
14. Ghysdael, J., Gegonne, A., Pognonec, P., Boulukos, K., Leprince, D., Lagrou, C., and Stehelin, D., *EMBO J.*, in press (1986).
15. Remaut, E., Stanssens, P., and Fiers, W., *Gene* **15**, 81–93 (1981).
16. De Taisne, C., Gegonne, A., Stehelin, D., Bernheim, A., and Berger, R., *Nature (London)* **310**, 581–583 (1984).
17. Watson, D. K., Williams-Smith, M. J., Nunn, M., Duesberg, P. H., O'Brien, S. J., and Papas, T. S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 7294–7298 (1985).
18. Bernard, H., Remaut, E., Hershfield, M., Das, H., Helinski, D., Yanofsky, C., and Franklin, N., *Gene* **5**, 59–76 (1979).
19. Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J. M., and Boedtker, H., *Biochemistry* **16**, 4743–4751 (1977).
20. Thomas, P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 5201–5205 (1980).

Article 6

The EMBO Journal vol.5 no.9 pp.2251–2256, 1986

Identification in chicken macrophages of a set of proteins related to, but distinct from, the chicken cellular c-*ets*-encoded protein p54$^{c\text{-}ets}$

J.Ghysdael, A.Gegonne, P.Pognonec, K.Boulukos, D.Leprince, D.Dernis, C.Lagrou and D.Stehelin

INSERM U 186/CNRS UA 1160, Institut Pasteur, 1 Rue Calmette, 59019 Lille Cedex, France

Communicated by D.Stehelin

Using an antiserum to a bacterially expressed polypeptide corresponding to 56 amino acids of v-*ets*, we previously identified in chicken tissues a protein of 54 kd (p54$^{c\text{-}ets}$) which shares extensive sequence homology to the v-*ets*-encoded domain of the E26-transforming protein p135$^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$ and is thus apparently encoded by the c-*ets* proto-oncogene. We report here that the anti-*ets* serum specifically identifies in chicken cells a second set of proteins of 60 kd (p60), 62 kd (p62) and 64 kd (p64) which appear to be highly related to each other but display only a limited domain of homology with p54$^{c\text{-}ets}$ and p135$^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$ and are thus probably encoded by a gene(s) partially related to, but different from c-*ets*. In contrast to p54$^{c\text{-}ets}$ which is expressed at high levels in chicken lymphoid tissues, prominent syntheses of p62 and p64 were found in both normal and transformed chicken macrophages but not in avian cells corresponding to immature stages of the myeloid differentiation pathway. These observations together with the fact that differentiation of avian myeloblastosis virus-transformed myeloblasts into macrophage-like cells after treatment with 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate is accompanied by the synthesis of p62 and p64 suggest a role for these proteins in chicken macrophage differentiation or function. Induction of differentiation of human leukemia cell lines HL60 and U937 into macrophages is also accompanied by the increased synthesis of c-*ets*-encoded 68 kd, 62 kd and 58 kd proteins.

Key words: c-*ets*/proto-oncogene product/macrophage/differentiation

Introduction

The extensive phylogenetic conservation of proto-oncogenes, the cellular progenitors of retroviral transforming genes, has led to the notion that these genes participate in fundamental cellular processes such as proliferation and/or differentiation. This idea has been supported by the demonstration that several proto-oncogenes are expressed in a tissue-specific manner and differentially at various stages of mouse development (Müller and Verma, 1984). Also, the expression of specific proto-oncogenes is induced in response to several growth factors (Kelly *et al.*, 1983; Armelin *et al.*, 1984; Müller *et al.*, 1984) and diminished or induced during certain differentiation processes (Westin *et al.*, 1982a, b; Gonda *et al.*, 1984; Mitchell *et al.*, 1985; Müller *et al.*, 1985). Finally, the cellular progenitors of the retroviral oncogenes v-*sis*, v-*erb*-B and v-*fms* have been shown to be highly related to genes encoding the B chain of platelet-derived growth factor (PDGF), the epidermal growth factor (EGF) receptor and the macrophage colony-stimulating factor [M-CSF (CSF-1)] receptor, respectively (Waterfield *et al.*, 1983; Downward *et al.*, 1984; Scherr *et al.*, 1985).

The acute leukemia virus E26 induces a mixed erythroid/myeloid leukemia in chickens and transforms myeloblasts and erythroblasts in tissue culture (Graf *et al.*, 1979; Moscovici *et al.*, 1981, 1983; Radke *et al.*, 1982). The genome of E26 contains, in addition to the v-*myb* oncogene also found in avian myeloblastosis virus (AMV), a second cell-derived oncogene v-*ets* (Leprince *et al.*, 1983; Nunn *et al.*, 1983). The v-*myb* and v-*ets* oncogenes are expressed, together with a partial viral *gag* gene, as a 135-kd polyprotein (p135$^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$), localized in the nucleus of transformed cells (Beug *et al.*, 1982; Bister *et al.*, 1982; Klempnauer *et al.*, 1984). Previous studies have shown that expresion of the c-*myb* oncogene is prominent in immature cells of the lymphoid, erythroid and myeloid lineages (Chen, 1980; Westin *et al.*, 1982a, b; Gonda *et al.*, 1982; Coll *et al.*, 1984) and appears to correlate with the proliferative status of these cells (Westin *et al.*, 1982b). To understand the physiological role of the cellular progenitor (c-*ets*) of the v-*ets* oncogene, we recently derived antisera to part of the amino acid sequence encoded by the v-*ets* oncogene. These antisera allowed us to identify in various chicken tissues and cell lines a major 54-kd cytoplasmic protein (p54$^{c\text{-}ets}$) and a minor 56-kd (p56$^{c\text{-}ets}$) component that show extensive sequence homology with the v-*ets*-encoded domain of p135$^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$ and which appear to be expressed at high levels in chicken thymocytes and bursal lymphocytes as well as in most avian lymphoid cell lines (Ghysdael *et al.*, 1986).

We describe here the identification in chicken cells of three additional proteins that share a limited domain of homology with both p54$^{c\text{-}ets}$ and p135$^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$. These proteins are expressed at high levels in transformed and normal macrophages and their synthesis is specifically induced when AMV-transformed myeloblasts are induced with 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) to differentiate into macrophages. TPA-induced differentiation of the human promyelocytic cell line HL60 (Collins *et al.*, 1978) and the human histiocytic cell line U937 (Sundström and Nilsson, 1976) into non-dividing macrophages is accompanied by the increased synthesis of human c-*ets*-encoded proteins of 68, 62 and 58 kd.

Results

Using an antiserum directed against a bacterially synthesized polypeptide corresponding to 56 v-*ets*-encoded amino acids (anti-*ets* serum), we previously identified in chicken lymphoid cells a major c-*ets*-encoded polypeptide of mol. wt 54 kd (p54$^{c\text{-}ets}$) and a minor component of 56 kd (p56$^{c\text{-}ets}$). During these studies we also found the anti-*ets* serum to precipitate three additional proteins of 60 kd (p60), 62 kd (p62) and 64 kd (p64) from lysates of the MC29-transformed macrophage cell line HD11 (Ghysdael *et al.*, 1986; and Figure 1, lanes C and I). The precipitation of p60, p62 and p64 is specific of the anti-*ets* serum since none of these proteins were found to be precipitated by a non-immune control serum (Figure 1, lane A) and since their precipitation

© IRL Press Limited, Oxford, England

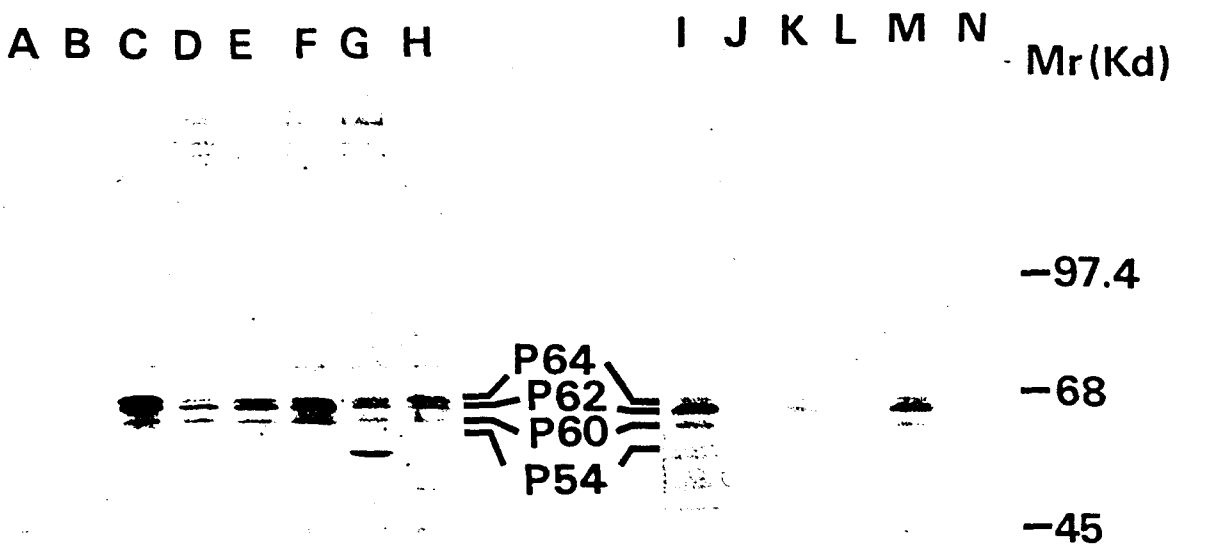


Fig. 1. Expression of *ets*-related polypeptides in transformed macrophages and normal bone marrow-derived macrophages. Cells were labelled for 60 min with 250 μCi/ml of L-[^{35}S]methionine, lysed and the immunoprecipitations were carried out on 10^7 radioactive counts of each lysate with: **A**, non-immune serum; **B, J, L, N**, anti-*ets* serum blocked by pre-incubation with an excesss of the bacterially expressed *ets*-antigen; **C–H, I, K, M**, anti-*ets* serum. Immunoprecipitates were analyzed by electrophoresis on a 10% polyacrylamide slab gel followed by fluorography. Cells analyzed were as follows: **A–C, I, J**, MC29-transformed macrophage cell line HD11; **D, E**, OK10-transformed macrophages, clones 1 and 2; **F**, MH2- E1 mil$^-$ myc$^-$-transformed macrophages; **G, H**, MH2-transformed macrophages, clones 1 and 2; **K, L**, 3-day-old culture of chicken bone marrow cells, non-adherent cells; **M, N**, 3-day-old culture of chicken bone marrow cells, adherent macrophages.

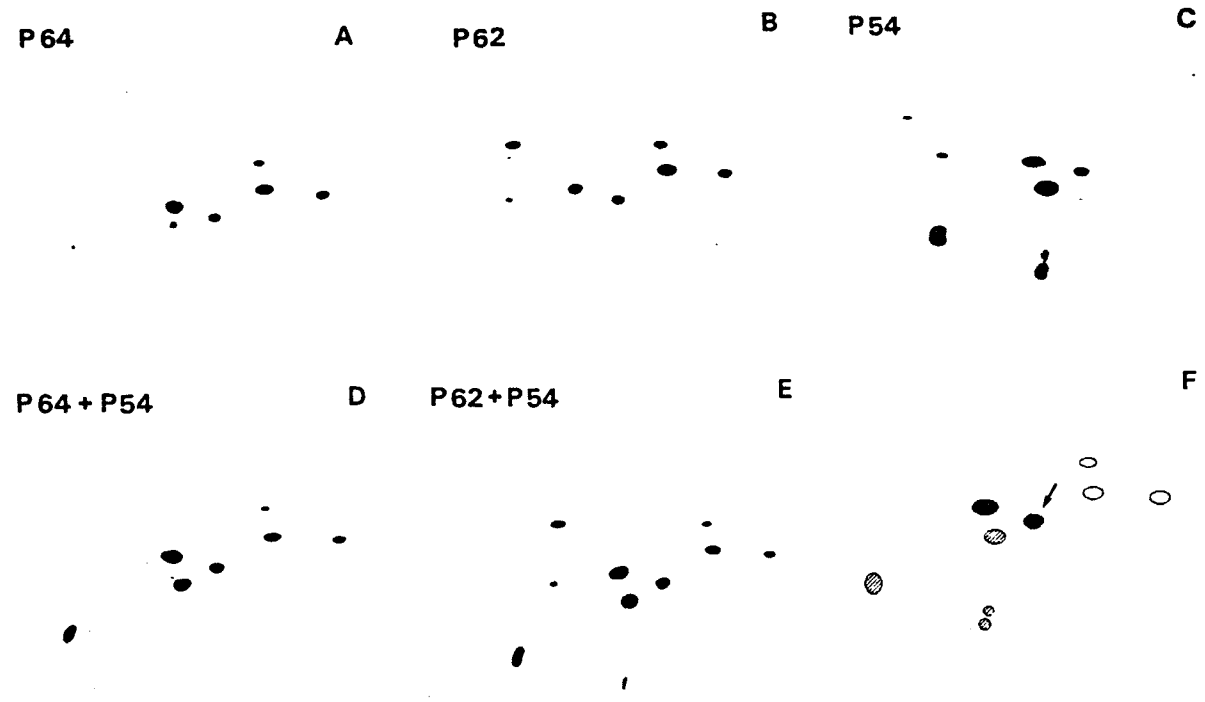


Fig. 2. Two-dimensional tryptic peptide maps of *ets*-related proteins. [^{35}S]methionine-labelled proteins were excised from gels similar to those of Figure 1, eluted, oxidized with performic acid and digested with TPCK-treated trypsin. The resulting peptides were separated by electrophoresis in the first dimension (origin at the left, cathode at the right) and chromatography in the second dimension. **Panel A**, p 64; **panel B**, p62; **panel C**, p54$^{c\text{-}ets}$; **panel D**, mixture of p64 and p54$^{c\text{-}ets}$; **panel E**, mixture of p62 and p54$^{c\text{-}ets}$; **panel F**, summary of *ets*-specific peptides. Solid spots, peptides shared between p54$^{c\text{-}ets}$ and p60–p64; hatched spots, peptides unique to p54$^{c\text{-}ets}$; open spots, peptides unique to p60–p64. Arrow points to the peptide shared between p135$^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$, p54$^{c\text{-}ets}$ and p60–p64.

by the anti-*ets* serum was completely abolished in the presence of an excess of the bacterial immunogen (Figure 1, lanes B and J). To test whether the synthesis of these polypeptides was particular to that cell line or was a general characteristic of chicken macrophages, we first analyzed several independent clones of macrophages freshly obtained by infection of chicken bone marrow cells with several v-*myc*-containing retroviruses. Two classes of transformed macrophages were analyzed. The first class included macrophages transformed by retroviruses carrying only the v-*myc* oncogene and which require the continuous presence of chicken myelomonocytic growth factor (cMGF, Beug *et al.*, 1982; Leutz *et al.*, 1984) for growth and survival. The second class included macrophages transformed by MH2, a retrovirus containing both the v-*myc* and v-*mil* oncogenes. These macrophages produce cMGF or cMGF-related factor(s) and grow in an autocrine fashion (Graf *et al.*, 1986). The results of Figure 1, lanes C–H show that all transformed macrophage clones analyzed synthesized levels of p60, p62 and p64 similar to those detected in the HD11 cell line. The synthesis of these proteins is not restricted to transformed macrophages since they were also detected in normal chicken macrophages. In the presence of cMGF, culture of cell suspensions derived from chicken bone marrow resulted within 3–4 days in the emergence of a population of non-adherent proliferating macrophages which progressively differentiated into adherent slowly proliferating macrophages. The experiment of Figure 1, lanes I–N, shows that the level of synthesis of p60, p62 and p64 in adherent macrophages was similar to that observed in the MC29-transformed macrophage cell line HD11 (Figure 1, compare lanes I and M). The lower levels of these proteins detected in the non-adherent cell population as compared with adherent macrophages (Figure 1, compare lanes K and M) probably reflect the fact that this population is heterogeneous and includes other cell types in addition to macrophages.

To analyze the structural relationship between p64, p62, p60 and p54$^{c\text{-}ets}$, we compared the two-dimensional maps of the [^{35}S]-methionine-containing peptides obtained after trypsin digestion of each of the purified proteins. As shown in Figure 2 (panels A and B) the peptide maps of p64 and p62 are very similar since all the peptides of p64 were also found in the map of p62. Two peptides are present in the map of p62 which appear to be absent in that of p64. The tryptic peptide map of p60 is indistinguishable from that of p62 (result not shown). The duplication of some of the peptides in these maps results from partial oxidation of the peptides during their preparation. Comparison of the tryptic peptide maps of p54$^{c\text{-}ets}$ with that of either p64 or p62 shows that only two out of the six major peptides of p54$^{c\text{-}ets}$ are also found in p64 and p62 (Figure 2, panels A–C, and mixing experiments in panels D and E). All other peptides are unique to either p54$^{c\text{-}ets}$ or p64/p62. The results of these comparisons are summarized in Figure 2, panel F. As previously described, most of the peptides of p54$^{c\text{-}ets}$ are found in the v-*ets*-encoded domain of the E26-transforming protein p135$^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$ (Ghysdael *et al.*, 1986). It also appears that none of the peptides unique to p64, p62 and p60 are found in the peptide map of p135$^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$ whereas only one of the peptides shared between p54$^{c\text{-}ets}$ and p60–p64 is found in the peptide map of p135$^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$ (indicated by an arrow in Figure 2, panel F). We conclude from these experiments that p64, p62 and p60 are highly related to each other but probably exhibit only a limited domain of homology with p54$^{c\text{-}ets}$. To further substantiate this point, we compared the one-dimensional cleavage patterns obtained from these polypeptides after partial digestion with *Staphylococcus aureus* V8 protease,

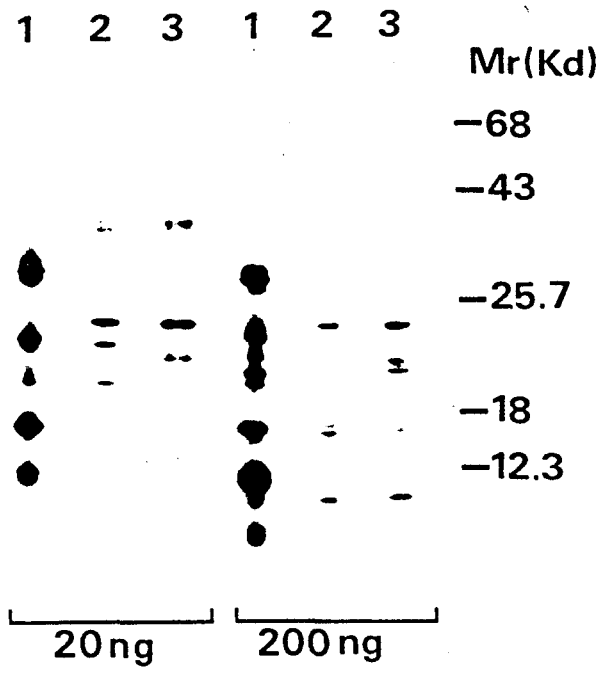


Fig. 3. One-dimensional V8 protease mapping of *ets*-related proteins. [^{35}S]methionine proteins were excised from gels similar to those of Figure 1 and run on a 15% polyacrylamide gel after partial digestion for 30 min with either 200 or 20 ng of *S. aureus* V8 protease. **Lane 1**, p54$^{c\text{-}ets}$; **lane 2**, p64; **lane 3**, p62.

a procedure particularly suited to demonstrate extensive sequence homology between polypeptides (Cleveland *et al.*, 1977). The results of Figure 3 show that the V8 partial digests of p64 and p62 are very similar although not identical since one of the major peptides obtained after digestion of p62 with low doses of V8 protease is not observed in the digest of p64. This result is in agreement with those obtained after digestion to completion of p64 and p62 with trypsin (Figure 2). In contrast, no common peptides could be detected between the V8 partial digests of p54$^{c\text{-}ets}$ and that of either p64 or p62. We conclude that p54$^{c\text{-}ets}$ and p60–p64 are different in most of their sequences and that these two sets of proteins share only a limited domain of homology.

The experiments described in Figure 1 together with our previous observations (Ghysdael *et al.*, 1986) showed the synthesis of p62 and p64 to be most prominent in macrophages but low or below the limit of detection in other avian cells including immature cells of the myeloid lineage. These observations suggest that these proteins might be of importance to macrophage differentiation or function. To lend support to this hypothesis we analyzed the synthesis of p60, p62 and p64 during induced macrophage differentiation.

AMV-transformed myeloblasts differentiate into cells with the phenotype and functional properties of mature macrophages following treatment by phorbol esters (Pessano *et al.*, 1979). This induced differentiation is accompanied by the translocation of the p45$^{v\text{-}myb}$ AMV-transforming protein from its original location in the nucleus to the perinuclear cytoplasm (Klempnauer *et al.*, 1984). The experiment of Figure 4 shows that, while exponentially growing cells of the AMV-transformed myeloblasts cell line 5YS synthesized low levels of p60 and barely detectable levels of p62 and p64 (Figure 4, panel A), treatment of these cells with 20 nM TPA induced both differentiation into macrophage-like cells and a considerable increase in the level of syn-

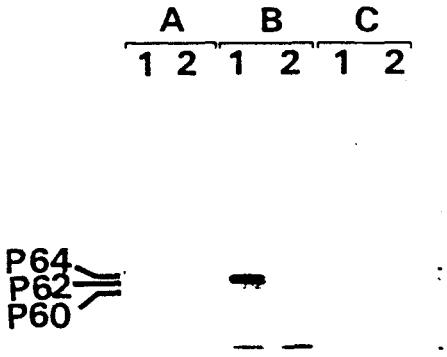


Fig. 4. Expression of *ets*-related polypeptides after induction of differentiation of AMV-transformed myeloblasts with TPA. Exponentially growing AMV-transformed myeloblasts (5YS cell line) were incubated at 10^6 cells/ml in differentiation medium without **(panel A)** or with 20 nM TPA **(panel B)** for 18 h and labelled for 60 min with 250 μCi/ml of L-[^{35}S]methionine. **Panel C**, cells were treated as in panel B and then shifted to standard growth medium for 24 h before labelling. Lysates were prepared and immunoprecipitations carried out on 5×10^6 acid-insoluble radioactive count. **Lane 1**, anti-*ets* serum and **lane 2**, anti-*ets* serum blocked by an excess of the bacterially expressed *ets*-antigen. Immunoprecipitated proteins were separated by electrophoresis on a 12.5% polyacrylamide slab gel followed by fluorography.

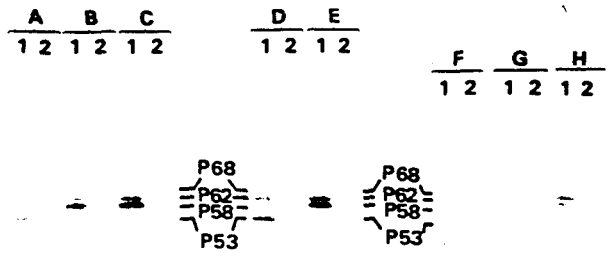


Fig. 5. Expression of *ets*-related polypeptides after induction of differentiation of HL60 with TPA. Exponentially growing HL60 cells were either untreated **(A and F)**, or treated with 40 nM TPA for 1 day **(B)** or 2 days **(C and H)** or treated with 400 nM TPA for 15 min **(D)** or treated with 400 nM TPA for 15 min, washed extensively and further incubated in complete growth medium without TPA **(E)**, or treated with 1 μM retinoic acid **(G)**, were labelled for 30 min with 500 μCi/ml of L-[^{35}S]methionine, lysed and immunoprecipitates were prepared on the same amount of acid-insoluble radioactive count with (1) anti-*ets* serum and (2) anti-*ets* serum blocked by pre-incubation with an excess of bacterially expressed *ets* antigen. Immunoprecipitated proteins were separated by electrophoresis on a 10% polyacrylamide slab gel followed by fluorography.

thesis of p62 and p64 (Figure 4, panel B). This increase appears to be specific since no detectable increase in the synthesis of p54$^{c\text{-}ets}$ was observed in differentiated cells as compared with untreated cells (Figure 4, panels A and B). Similar results were obtained with another AMV-transformed cell line BM2 (data not shown). TPA-induced differentiation of AMV-transformed myeloblasts requires the continuous presence of TPA and can be reversed upon TPA removal (Pessano *et al.*, 1979). As shown in Figure 4, panel C, reversion of differentiation by further culture of differentiated cells in the absence of TPA is accompanied by a decrease in the synthesis of p64 and p62.

Several human immature hematopoietic cell lines can differentiate terminally following induction with a wide range of different substances. For example, treatment of both human promyelocytic cell line HL60 and histiocytic cell line U937 by TPA induces these cells to differentiate into macrophages (Rovera *et al.*, 1979; Nilsson *et al.*, 1981), whereas treatment of HL60 by dimethylsulfoxide or retinoic acid induces differentiation into granulocytes (Collins *et al.*, 1978; Breitman *et al.*, 1980). As shown in Figure 5, exponentially growing HL60 cells only synthesize an *ets*-related protein of 53 kd as well as low amounts of immunologically related 58 kd, 62 kd and 68 kd proteins (Figure 5, panels A and F). TPA-induced differentiation of this cell line into macrophages is accompanied by a considerable increase in the level of synthesis of the 58 kd, 62 kd and 68 kd (Figure 5, panels B and C). Differentiation of HL60 cells can be induced by continuous treatment with low amounts of TPA or by short treatment with a high TPA concentration followed by incubation in regular growth medium (Collins *et al.*, 1978). The results of Figure 5, panels D and E, show that the synthesis of the 58 kd, 62 kd and 68 kd *ets*-related proteins is rapidly induced after a 15-min TPA pulse and that their synthesis at high levels does not require the continuous presence of TPA. These observations, together with the fact that increased synthesis of these proteins does not occur when HL60 cells are induced to differentiate into granulocytes by retinoic acid treatment (Figure 5, panel G), suggest that the induction of these proteins is specific of macrophage differentiation. The significance of the decrease in the synthesis of the 53-kd protein observed after 48 h of TPA treatment in the experiment of Figure 5, panels A–C, is unclear since it is not consistently observed in other experiments (see Figure 5, panels F–G). We conclude from these experiments that the induction of differentiation of various progenitor cells of avian and human origin into macrophages is accompanied by the synthesis of cellular proteins related to the v-*ets*-encoded domains of p135$^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$.

Discussion

We previously identified a major 54-kd protein in chicken tissues (p54$^{c\text{-}ets}$) and a minor 56-kd component (p56$^{c\text{-}ets}$) which are apparently encoded by the cellular progenitor (c-*ets*) of the v-*ets* oncogene of avian leukemia virus E26. These proteins are precipitated by an antiserum to a bacterially expressed polypeptide corresponding to a portion of v-*ets* (anti-*ets* serum) and share most (five out of six) of their [^{35}S]methionine-containing tryptic peptides with those derived from the v-*ets*-encoded domain of p135$^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$, the transforming protein of E26 (Ghysdael *et al.*, 1986).

We report here that the anti-*ets* serum identifies a second set of three proteins of 60 kd (p60), 62 kd (p62) and 64 kd (p64) in chicken cells. Comparative analyses of the [^{35}S]methionine-containing tryptic peptides and V8 protease digestion of these two sets of immunologically cross-reactive proteins showed p60, p62 and p64 to be highly related to each other and to share only a limited domain of homology with p54$^{c\text{-}ets}$. These results, together with the fact that these two sets of polypeptides do not appear to display any precursor-to-product relationship (personal observations of our laboratory) and that their synthesis is differential and independently regulated in chicken tissues and cell lines (see below), strongly suggest that each set originates from the translation of distinct mRNA species. Northern blot analyses

of normal chicken cell, poly(A)-containing, RNAs have identified three RNA species of 7.5 kb, 2.2 kb and 2.0 kb that hybridize with a v-*ets*-specific probe (Leprince *et al.*, 1983; Chen, 1985; Watson *et al.*, 1985). Although the precise genetic content of these RNAs still needs to be formally established by *in vitro* translation experiments, several assumptions can be made. Since chicken lymphoid tissues have been shown to contain both high levels of the 7.5-kb transcript and to synthesize high levels of p54$^{c\text{-}ets}$ (Chen, 1985; Ghysdael *et al.*, 1986), it is reasonable to hypothesize that the 7.5-kb RNA species encodes p54$^{c\text{-}ets}$. In this context and since the v-*ets*-encoded domain of p135$^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$ shares extensive amino acid sequence homology with p54$^{c\text{-}ets}$ and only a limited domain of homology with p64, p62 and p60, it is probable that most of the v-*ets* oncogene of E26 derived from retrotranscription of part of the mRNA encoding p54$^{c\text{-}ets}$. Experiments are in progress to characterize further the structural relationship between p60, p62 and p64 and to determine whether these proteins are encoded by the 2.0–2.2-kb size class RNAs or by mRNA species different from those detected so far by the probes used.

Evidence has been provided recently for the existence of two distinct c-*ets* chromosomal loci (c-*ets*-1 and c-*ets*-2) in man and other vertebrate species (Watson *et al.*, 1985). In man, these loci map on chromosome 11 (11q23; de Taisne *et al.*, 1984; Watson *et al.*, 1985) and 21 (21q22; Watson *et al.*, 1985), respectively, and share at least one common domain of homology of 14 amino acids (Watson *et al.*, 1985). We do not believe that the two sets of *ets*-related polypeptides identified in this study are the translation products of chicken genes corresponding to the human c-*ets*-1 and c-*ets*-2 proto-oncogenes. Indeed, from the comparison of the tryptic peptide maps of p135$^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$, p54$^{c\text{-}ets}$, p64–p60 (Figure 2; Ghysdael *et al.*, 1986) and of bacterially synthesized proteins corresponding to various portions of v-*ets* (data not shown) it appears that the domain of homology between p54$^{c\text{-}ets}$ and p64–p60 is more extended than that described for the putative human c-*ets*-1 and c-*ets*-2 gene products (Watson *et al.*, 1985) and, in fact, includes a peptide (indicated by an arrow in Figure 2, panel F) corresponding to a domain defined as unique (Watson *et al.*, 1985) to the human c-*ets*-2 proto-oncogene product. Furthermore, p54$^{c\text{-}ets}$ shares tryptic peptides with p135$^{gag\text{-}myb\text{-}ets}$ (peptides No. 2 and No. 5 of Figure 2 in Ghysdael *et al.*, 1986) corresponding to coding regions defined by Watson *et al.* (1985) as unique to the human c-*ets*-1 and c-*ets*-2 proto-oncogenes, respectively (A.Gegonne *et al.*, submitted). These data suggest that the mode of expression and organization of the cellular sequences related to v-*ets* are probably different in birds and mammals. Whether the mRNA species corresponding to the two sets of *ets*-related proteins we have identified in chicken tissues either derived from different loci or are translated from differentially spliced RNA transcripts derived from a single locus is presently under study.

We and others previously found p54$^{c\text{-}ets}$ to be expressed at high levels in chicken thymocytes and bursal lymphocytes but not in quiescent circulating lymphocytes, suggesting a role for p54$^{c\text{-}ets}$ in lymphocyte proliferation (Ghysdael *et al.*, 1986; Chen, 1985). Several lines of evidence suggest that p62 and p64 may play a role in either macrophage differentiation or function. First, these proteins were found to be synthesized at low or undetectable levels in chicken bone marrow cells and in chicken cells corresponding to immature stages of the myeloid lineage (Ghysdael *et al.*, 1986). Second, increased synthesis of these proteins was found in both normal chicken bone marrow-derived macrophages as well as in macrophage clones obtained after infection of bone marrow cells with various v-*myc*-containing retroviruses. Third, the synthesis of p64 and p62 is considerably increased during TPA-induced differentiation into macrophages of AMV-transformed myeloblasts. The synthesis of these proteins does not appear to be a non-specific response of transformed chicken myeloblasts to TPA since treatment of E26-transformed myeloblasts with TPA failed to induce their synthesis (personal observations of our laboratory) as well as macrophage differentiation (Beug *et al.*, 1984). Several human leukemic cell lines believed to be the neoplastic derivatives of committed progenitor cells of the myelomonocytic lineage can be induced to differentiate terminally by a variety of inducers. Differentiation of both the promyelocytic cell line HL60 (Figure 5) and the histiocytic cell line U937 (results not shown) into adherent non-proliferating macrophages by TPA is accompanied by the increased synthesis of proteins of 58 kd, 62 kd and 68 kd that share immunological cross-reactivity and structural homology with each other and with the avian p54$^{c\text{-}ets}$ and p60–p64 (unpublished data). Experiments are in progress to determine whether these proteins are encoded by either the human c-*ets*-1 or c-*ets*-2 loci. Increased synthesis of these proteins occurs rapidly after TPA treatment and, once induced, their synthesis at high levels no longer requires the continuous presence of TPA. Furthermore, increased syntheses of these proteins are not observed when HL60 cells are induced to differentiate into granulocytes.

Taken together these observations show that expression of cellular gene(s) related to the v-*ets* oncogene of avian leukemia virus E26 accompanies macrophage differentiation, suggesting a role for products encoded by the c-*ets* proto-oncogene or gene(s) related to c-*ets* in the induction or maintenance of macrophage differentiation or function.

Materials and methods

Cells and viruses

Chicken bone marrow-derived macrophages were obtained by culturing bone marrow cells for 4 days in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum and 2% chicken serum (standard growth medium) in the presence of 4 U/ml of cMGF (Leutz *et al.*, 1984). The MC29-transformed macrophage cell line HD11 and macrophages transformed by MH2, OK10 and various v-*mil* deletion mutants of MH2 were provided by Dr T.Graf (EMBL) and grown in standard growth medium (HD11 cell line and MH2-transformed macrophages) or growth medium supplemented with 5 μg/ml of bacterial lipopolysaccharide (macrophages transformed by OK10 and v-*mil* deletion mutants of MH2). The AMV-transformed myeloblast lines BM2 and 5YS were obtained from C.Moscovici and grown in standard growth medium. Induction of differentiation of AMV-transformed myeloblasts was obtained by culturing the cells in Iscove's modified DMEM supplemented with 30 μg/ml transferrin, 5 μg/ml insulin, 20 μM ethanolamine, 2% fetal calf serum, 1.5% chicken serum, 2 U/ml cMGF and 20 mM TPA (Sigma), essentially as described by Beug *et al.* (1984).

Cell labelling and immunoprecipitation analyses

Cells were labelled with L-[^{35}S]methionine (as indicated in figure legends) in methionine-free Eagle's medium supplemented with 5% dialyzed calf serum and lysed by boiling for 5 min in a 1% solution of sodium dodecylsulfate (SDS). After dilution with 10 vol of Tris–HCl 10 mM, pH 7.4, Triton X-100 1%, Na deoxycholate 0.5%, Trasylol 1%, the lysates were centrifuged at 100 000 *g* for 60 min and immunoprecipitations carried out as described previously (Ghysdael *et al.*, 1979). Immunoprecipitates were analyzed by electrophoresis on 10% or 12.5% polyacrylamide slab gels (acrylamide:bisacrylamide 30:0.4) in the presence of SDS, followed by fluorography. Cellular *ets*-related polypeptides were precipitated using a rabbit antiserum to a bacterially expressed protein corresponding to a portion of the v-*ets* oncogene of E26 (Ghysdael *et al.*, 1986).

Peptide mapping analyses

[^{35}S]methionine-labelled proteins were eluted from gel slices, precipitated, oxidized with performic acid and digested to completion with L-1-Tosylamide-2-phenylethyl chloromethyl ketone (TPCK)-treated trypsin. Tryptic peptides were separated in the first dimension by electrophoresis at 600 V for 100 min at pH 4.5 on thin-layer cellulose plates (Merck) and by chromatography in *n*-butanol:acetic acid:water:pyridine (75:15:60:60) in the second dimension as

described previously (Ghysdael *et al.*, 1979, 1981). Plates were prepared for fluorography by treatment with a 7% solution of diphenyloxazole in ether and exposed to Kodak XAR film at −70°C.

Partial digestion in gel slices containing [^{35}S]methionine-labelled proteins by *S. aureus* V8 protease was essentially as described by Cleveland *et al.* (1977).

Acknowledgements

We thank Drs H.T.Graf and H.Beug for valuable discussions and for their generous gift of various transformed chicken cells. B. Vandenbunder for critical reading of the manuscript and N.Devassine for patient typing of the manuscript. This work was supported by funds from the 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.

References

Armelin,H., Armelin,M.J., Kelly,K., Stewart,T., Leder,P., Cochran,B. and Stiles,C.D. (1984) *Nature*, **310**, 655–660.

Beug,H., Hayman,M.J. and Graf,T. (1982) *EMBO J.*, **1**, 1069–1073.

Beug,H., Leutz,A., Kahn,P. and Graf,T. (1984) *Cell*, **39**, 579–588.

Bister,K., Nunn,M., Moscovici,C., Perbal,B., Baluda,M.A. and Duesberg,P.H. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 3677–3681.

Breitman,T.R., Selonick,S.E. and Collins,S.J. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 2936–2940.

Chen,H.J. (1980) *J. Virol.*, **36**, 162–170.

Chen,J.H. (1985) *Mol. Cell. Biol.*, **5**, 2993–3000.

Cleveland,D.W., Fischer,S.G., Kirschner,M.W. and Laemmli,U.K. (1977) *J. Biol. Chem.*, **252**, 1102–1106.

Coll,J., Saule,S., Martin,P., Raes,M.B., Graf,T., Beug,H., Simon,H.E., Lagrou, C. and Stehelin,D. (1984) *Exp. Cell. Res.*, **149**, 151–162.

Collins,S.J., Ruscetti,F.W., Gallagher,R.E. and Gallo,R.C. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 2458–2462.

Downward,J., Yarden,Y., Mayes,E., Scrace,G., Totty,N., Stockwell,P., Ullrich, A., Schlessinger,J. and Waterfield,M.D. (1984) *Nature*, **307**, 521–527.

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

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

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

Gonda,T.J. and Metcalf,D. (1984) *Nature*, **310**, 249–251.

Gonda,T.J., Sheiness,D. and Bishop,J.M. (1982) *Mol. Cell. Biol.*, **2**, 617–624.

Graf,T., Oker-Blom,N., Todorov,T.G. and Beug,H. (1979) *Virology*, **99**, 431–436.

Graf,T., v.Weizsaecker,F., Grieser,S., Coll,J., Stehelin,D., Patschinsky,T., Bister,K., Bechade,C., Calothy,G. and Leutz,A. (1986) *Cell*, **45**, 357–364.

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

Klempnauer,K., Symonds,G., Evan,G. and Bishop,J.M. (1984) *Cell*, **37**, 537–547.

Leprince,D., Gegonne,A., Coll,J., De Taisne,C., Schneeberger,A., Lagrou,C. and Stehelin,D. (1983) *Nature*, **306**, 395–397.

Leutz,A., Beug,H. and Graf,T. (1984) *EMBO J.*, **3**, 3191–3197.

Mitchell,R.L., Zokas,L., Shreiber,R.D. and Verma,I. (1985) *Cell*, **40**, 209–217.

Moscovici,C., Samarut,J., Gazzolo,L. and Moscovici,M.G. (1981) *Virology*, **113**, 765–768.

Moscovici,M.G., Jurdic,P., Samarut,J., Gazzolo,L., Murra,C.V. and Moscovici, C. (1983) *Virology*, **129**, 65–78.

Müller,R. and Verma,I. (1984) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **112**, 73–116.

Müller,R., Bravo,R., Burckhardt,J. and Curran,T. (1984) *Nature*, **312**, 716–720.

Müller,R., Curran,T., Muller,D. and Guilbert,L. (1985) *Nature*, **314**, 546–548.

Nilsson,K., Forsbeck,K., Gildlund,M., Sundstrom,G., Toterman,T., Sallström,J. and Venge,P. (1981) *Hematol. Blood Transfus.*, **26**, 215–221.

Nunn,M.F., Seeburg,P.M., Moscovici,C. and Duesberg,P.H. (1983) *Nature*, **306**, 391–395.

Pessano,S., Gazzolo,L. and Moscovici,C. (1979) *Microbiologica*, **2**, 379–392.

Radke,K., Beug,H., Kornfeld,S. and Graf,T. (1982) *Cell*, **31**, 643–653.

Rovera,G., Santoli,D. and Damsky,C. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 2779–2783.

Scherr,C.J., Rettenmeier,C.W., Sacca,R., Roussel,M., Look,T. and Stanley,R. (1985) *Cell*, **41**, 665–676.

Sundström,C. and Nilsson,K. (1976) *Int. J. Cancer*, **17**, 565–577.

de Taisne,C., Gegonne,A., Stehelin,D., Bernheim,A. and Berger,R. (1984) *Nature*, **310**, 581–583.

Waterfield,M.D., Scrace,G.T., Whittle,N., Stroobant,P., Johnsson,A., Wasteson, A., Westermark,B., Heldin,C.H., Huang,J.S. and Deuel,T.F. (1983) *Nature*, **304**, 35–39.

Watson,D.K., Williams-Smith,M.J., Nunn,M., Duesberg,P.H., O'Brien,S.J. and Papas,T.S. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 7294–7298.

Westin,E.H., Wong-Staal,F., Gelmann,E.P., Dalla-Favera,R., Papas,T., Lautenberger,J.A., Eva,A., Reddy,E.P., Tronick,S.R., Aaronson,S.A. and Gallo,R.C. (1982a) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 2490–2494.

Westin,E.H., Gallo,R.C., Arya,S.K., Eva,A., Souza,L.M., Baluda,M.A., Aaronsson,S.A. and Wong-Staal,F. (1982b) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 2194–2198.

Received on 17 March 1986; revised on 6 June 1986

BIBLIOTHÈQUE INTERUNIVERSITAIRE
SECTION DE SCIENCES
LILLE

RESUME

Le rétrovirus airaire E26 induit chez le poulet une leucémie mixte érythroïde et myéloïde à prédominance érythroïde.

Nous avons tout d'abord montré que son génome contient deux oncogènes indépendants v-myb et v-ets. Ces deux oncogènes ont des équivalents cellulaires c-myb et c-ets qui sont conservés phylogénétiquement.

Nous avons ensuite tenté de caractériser l'équivalent c-ets chez l'homme et chez le poulet.

D'une part, nous avons localisé une portion de l'homologue c-ets humain sur le chromosone 11 dans sa portion q23 q24. D'autre part, en criblant différentes banques génomiques, nous avons reconstitué l'équivalent cellulaire c-ets chez le poulet et montré que l'oncogène v ets, à l'exception de ses 82 derniers nucléotides dérive de huit exons cellulaires raboutés en phase dans le virus E26.

Enfin, à l'aide de séra dirigés contre différentes portions du produit du gène v-ets, nous avons identifié deux familles de protéines cellulaires présentant des déterminants communs avec le produit du gène v-ets : l'une est homologue à la majeure partie du produit du gène v-ets et est exprimée dans le thymus et la bourse de Fabricius, l'autre présente peu d'homologie avec le produit du gène v-ets et est exprimée dans les macrophages.

BIBLIOTHEQUE INTERUNIVERSITAIRE
SECTION DE SCIENCES
LILLE