

50376
1988
63

50376
1988
63

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

N° D'ordre 232



THESE

présentée pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

par

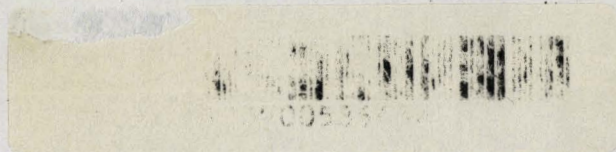
Christine DOZIER

ETUDE STRUCTURALE ET FONCTIONNELLE DE L'ONCOGENE v-mil

ET DE SON PROTO-ONCOGENE c-mil CHEZ LE POULET

1988

soutenu le 3 Juin devant la commission d'examen



Président : J. MONTREUIL

Rapporteurs : G. CALOTHY
J. KREMBEL

Examineur : D. STEHELIN

UNIVERSITE DES SCIENCES
ET TECHNIQUES DE LILLE
FLANDRES ARTOIS

DOYENS HONORAIRES DE L'ANCIENNE FACULTE DES SCIENCES

M. H. LEFEBVRE, M. PARREAU.

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

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

PROFESSEUR EMERITE

M. A. LEBRUN

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

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

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE FLANDRES ARTOIS

M. A. DUBRULLE.

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

PROFESSEURS - 1ère CLASSE

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BILLARD Jean	Physique du solide
M. BOILLY Bénoni	Biologie
M. BONNELLE Jean Pierre	Chimie-Physique
M. BOSCQ Denis	Probabilités
M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie végétale
M. BREZINSKI Claude	Analyse numérique
M. BRIDOUX Michel	Chimie-Physique
M. CARREZ Christian	Informatique
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. DHAINAUT André	Biologie animale
M. DOUKHAN Jean Claude	Physique du solide
M. DYMENT Arthur	Mécanique
M. ESCAIG Bertrand	Physique du solide
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOCT Jacques	Métallurgie
M. FRONTIER Serge	Ecologie numérique
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. LEROY Jean Marie	Spectrochimie
M. LHOMME Jean	Chimie organique biologique
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LOUCHEUX Claude	Chimie physique
M. LUCQUIN Michel	Chimie physique
M. MACKE Bruno	Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques
M. MIGEON Michel	E.U.D.I.L.
M. PAQUET Jacques	Géologie générale
M. PETIT Francis	Chimie organique
M. POUZET Pierre	Modélisation - Calcul scientifique
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. SALMER Georges	Electronique
M. SCHAMPS Joel	Spectroscopie moléculaire
M. SEQUIER Guy	Electrotechnique
M. SIMON Michel	Sociologie
Mlle SPIK Geneviève	Biochimie
M. STANKIEWICZ François	Sciences Economiques
M. TILLIEU Jacques	Physique théorique
M. TOULOTTE Jean Marc	Automatique
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS - 2ème CLASSE

M. ALLAMANDO Etienne	Composants électroniques
M. ANDRIES Jean Claude	Biologie des organismes
M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie animale
M. BASSERY Louis	Génie des procédés et réactions chimiques
Mme BATTIAU Yvonne	Géographie
M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BELLET Jean	Physique atomique et moléculaire
M. BERTRAND Hugues	Sciences Economiques et Sociales
M. BERZIN Robert	Analyse
M. BKUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BODARD Marcel	Biologie végétale
M. BOIS Pierre	Mécanique
M. BOISSIER Daniel	Génie civil
M. BOIVIN Jean Claude	Spectrochimie
M. BOUQUELET Stéphane	Biologie appliquée aux enzymes
M. BOUQUIN Henri	Gestion
M. BRASSELET Jean Paul	Géométrie et topologie
M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CAPURON Alfred	Biologie animale
M. CATTEAU Jean pierre	Chimie organique
M. CAYATTE Jean Louis	Sciences Economiques
M. CHAPOTON Alain	Electronique
M. CHARET Pierre	Biochimie structurale
M. CHIVE Maurice	Composants électroniques optiques
M. COMYN Gérard	Informatique théorique
M. COQUERY Jean Marie	Psychophysiologie
M. CORIAT Benjamin	Sciences Economiques et Sociales
Mme CORSIN Paule	Paléontologie
M. CORTOIS Jean	Physique nucléaire et corpusculaire
M. COUTURIER Daniel	Chimie organique
M. CRAMPON Norbert	Tectonique Géodynamique
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. DEJAEGER Roger	Electrochimie et Cinétique
M. DELORME Pierre	Physiologie animale
M. DELORME Robert	Sciences Economiques
M. DEMUNTER Paul	Sociologie
H. DENEL Jacques	Informatique
M. DE PARIS Jean Claude	Analyse
M. DEPRES Gilbert	Physique du solide - Cristallographie
M. DERIEUX Jean Claude	Microbiologie
Mle DESSAUX Odile	Spectroscopie de la réactivité chimique
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie minérale
Mme DHAINAUT Nicole	Biologie animale
M. DHAMELINCOURT Paul	Chimie physique
M. DORMARD Serge	Sciences Economiques
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.A.E.)
Mme EVRARD Micheline	Génie des procédés et réactions chimiques
M. FAKIR Sabah	Algèbre
M. FAUQUEMBERGUE Renaud	Composants électroniques
M. FONTAINE Hubert	Dynamique des cristaux
M. FOUQUART Yves	Optique atmosphérique
M. FOURNET Bernard	Biochimie structurale
M. GAMBLIN André	Géographie urbaine, industrielle et démographie
M. GLORIEUX Pierre	Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie physique
M. GOURIEROUX Christian	Probabilités et statistiques
M. GREGORY Pierre	I.A.E.
M. GREMY Jean Paul	Sociologie
M. GREVET Patrice	Sciences Economiques
M. GRIMBLOT Jean	Chimie organique
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie animale
M. HENRY Jean Pierre	Génie mécanique
M. HERMAN Maurice	Physique spatiale
M. HOUDART René	Physique atomique
M. JACOB Gérard	Informatique
M. JACOB Pierre	Probabilités et statistiques
M. JEAN Raymond	Biologie des populations végétales
M. JOFFRE Patrick	Vie de la firme (I.A.E.)
M. JOURNAL Gérard	Spectroscopie hertzienne
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LANGRAND Claude	Probabilités et statistiques
M. LATTEUX Michel	Informatique
Mme LECLERCQ Ginette	Catalyse
M. LEFEBVRE Jacques	Physique
M. LEFEVRE Christian	Pétrologie
Mlle LEGRAND Denise	Algèbre
Mlle LEGRAND Solange	Algèbre
M. LEGRAND Pierre	Chimie
Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LEMAIRE Jean	Spectroscopie hertzienne
M. LE MAROIS Henri	Vie de la firme (I.A.E.)
M. LEROY Yves	Composants électroniques
M. LESENNE Jacques	Systèmes électroniques
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique théorique
M. LOSFELD Joseph	Informatique
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MAHIEU Jean Marie	Optique - Physique atomique
M. MAIZIERES Christian	Automatique
M. MAURISSON Patrick	Sciences Economiques et Sociales
M. MESMACQUE Gérard	Génie Mécanique
M. MESSELYN Jean	Physique atomique et moléculaire
M. MONTEL Marc	Physique du solide
M. MORCELLET Michel	Chimie organique
M. MORTREUX André	Chimie organique
Mme MOUNIER Yvonne	Physiologie des structures contractiles
M. NICOLE Jacques	Spectrochimie
M. NOTELET Francis	Systèmes électroniques
M. PARSY Fernand	Mécanique
M. PECQUE Marcel	Chimie organique
M. PERROT Pierre	Chimie appliquée

M. PERTUZON Emile	Physiologie animale
M. PONSOLLE Louis	Chimie physique
M. PORCHET Maurice	Biologie animale
M. POSTAIRE Jack	Informatique industrielle
M. POVY Lucien	Automatique
M. RICHARD Alain	Biologie animale
M. RIETSCH François	Physique des polymères
M. ROBINET Jean Claude	EUDIL
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROY Jean Claude	Psychophysiologie
Mme SCHWARZBACH Yvette	Géométrie
M. SLIWA Henri	Chimie organique
M. SOMME Jean	Géographie
M. STAROSWIECKI Marcel	Informatique
M. STEREOUL François	Informatique
M. TAILLIEZ Roger	Génie alimentaire
M. THERY Pierre	Systèmes électroniques
M. THIEBAULT François	Sciences de la terre
M. THUMERELLE Pierre	Démographie - Géographie Humaine
Mme TJOTTA Jacqueline	Mathématiques
M. TOURSEL Bernard	Informatique
M. TREANTON Jean René	Sociologie du Travail
M. TURREL Georges	Spectrochimie infrarouge et Raman
M. VANDORPE Bernard	Chimie minérale
M. VASSEUR Christian	Automatique
M. VAST Pierre	Chimie inorganique
M. VERBERT André	Biochimie
M. VERNET Philippe	Génétique
M. WACRENIER Jean Marie	Electronique
M. WALLART Francis	Spectrochimie infrarouge et Raman
M. WARTEL Michel	Chimie inorganique
M. WATERLOT Michel	Géologie générale
M. WEINSTEIN Olivier	Analyse économique de la recherche et développement
M. WERNER Georges	Informatique théorique
M. WOZNIAK Michel	Spectrochimie
Mme ZINN JUSTIN Nicole	Algèbre

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé dans le laboratoire d'Oncologie Moléculaire dirigé par Dominique STEHELIN. Je le remercie sincèrement non seulement de m'avoir accueillie dans son laboratoire, mais également pour les conseils qu'il m'a prodigués au cours de ce travail ainsi que pour la rigueur scientifique qu'il m'a inculquée.

Je remercie Monsieur le Président et Messieurs les membres du Jury d'avoir accepté de juger ce mémoire.

Ce mémoire relate un travail de groupe, je voudrais donc remercier les membres du laboratoire avec qui j'ai eu plaisir à travailler. Je remercie particulièrement Simon SAULE et Jean COLL pour leur patience, leur disponibilité constante ainsi que pour les conseils et les encouragements prodigués au cours de ce travail.

Je remercie Agnès BEGUE et Christian LAGROU pour m'avoir initiée aux techniques de la biologie moléculaire et à la culture cellulaire.

Je remercie également Nicole DEVASSINE et Valérie DUFRESNOY pour leur aide dans la dactylographie de ce mémoire.

Enfin, je remercie tous les membres du laboratoire que je n'ai pas nommés, pour leur aide constante et leur sympathie.

L'accomplissement de ce travail n'aurait pas été possible sans l'aide financière que m'ont accordée le Ministère de la Recherche et de la Technologie, l'Institut Pasteur de Lille ainsi que l'Association pour la Recherche sur le Cancer.

PUBLICATIONS

- DOZIER, C., S. WALBAUM, D. LEPRINCE and D. STEHELIN. 1986.
EcoRI RFLP linked to the human myb gene.
Nucleic Acids Research **14** : 1928.

- TEYSSIER, J.R., I. HENRY, C. DOZIER, D. FERRE, J.J. ADNET and M. PLUOT. 1986.
Recurrent deletion of the short arm of chromosome 3 in human renal cell carcinoma : shift of the c-raf 1 locus.
Journal of National Cancer Institute **77** : 1187-1195.

- DOZIER, C., F. DENHEZ, J. COLL, P. AMOUYEL, B. QUATANNENS, A. BEGUE, D. STEHELIN and S. SAULE. 1987.
Induction of proliferation of neuroretina cells by LTR activation of the carboxy-terminal part of c-mil.
Molecular and Cellular Biology **7** : 1995-1998

- KERCKAERT, J.P., C. DOZIER, M.H. LOUCHEUX-LEFEBVRE and D. STEHELIN. 1987.
Sst I RFLP linked to the human ets-1 gene.
Nucleic Acids Research **15** : 5905.

- DOZIER, C., F. DENHEZ, C. HENRY, J. COLL, A. BEGUE, C. LAGROU, B. QUATANNENS, S. SAULE and D. STEHELIN.
Alternative splicing of RNAs transcribed from the chicken c-mil gene.
Molecular and Cellular Biology **8** : 1835-1838.

- DOZIER, C., J. COLL, S. RAVIT, D. STEHELIN et S. SAULE.
Prolifération cellulaire et coopération des oncogènes v-mil et v-myc.
Sous presse dans Biochimie.

- DENHEZ, F., F. GALIBERT, B. HEIMANN, C. DOZIER, K. MOELLING, D. STEHELIN and J. GHYSDAEL.
An invariant asparagine residue belonging to a highly conserved domain in all protein kinases is instrumental in the protein kinase activity of the v-mil gene product.
Accepté à Oncogene Research.

- COLL, J., C. DOZIER, S. SAULE, C. HENRY, B. QUATANNENS, B. DEBUIRE and D. STEHELIN.
Mapping by in-vitro constructs of the P100~~sag~~-mil region accounting for the induction of chicken NR cell proliferation.
Soumis à Journal of Virology.

GLOSSAIRE

- ADNc** : copie ADN double brin d'un ARN
- ALV** : Associated leukosis virus, rétrovirus aviaire compétent pour la réplication et dépourvu de gène oncogène
- AMPc** : AMP cyclique
- bp** : paire de base d'ADN
- CNR** : Chicken Neuroretina cell, cellule de neurorétine de poulet
- DLSV** : Defective Leukemia Sarcoma Virus, rétrovirus aviaire induisant des leucémies aiguës ou des sarcomes et déficient pour la réplication
- épissage** : mécanisme permettant l'élimination des introns d'un ARN
- GMPc** : GMP cyclique
- gp** : glycoprotéine
- "helper"** : ALV auxiliaire, permettant la propagation de rétrovirus aviaires défectifs pour la réplication
- Kb** : Kilobase, millier de bases d'ARN
- Kbp** : Kilobase pair, millier de paires de base d'ADN
- Kd** : kilodalton
- LTR** : Long Terminal Repeat (promoteur fort de transcription viral), séquence présente à chaque extrémité de l'ADN proviral
- MuLV** : Murine Leukemia Virus
- Oncogène** : gène dont le produit peut induire la transformation cellulaire. Par extension, gène fréquemment impliqué dans les tumeur
- v-onc** : oncogène viral
- c-onc** : oncogène cellulaire
- PKA** : AMPc dépendante Protéine Kinase
- PKC** : Protéine Kinase C
- Px** : protéine de fusion x
- QNR** : Quail Neuroretina cell, cellule de neurorétine de caille

Code des acides aminés

A : Alanine
C : Cystéine
D : Acide Aspartique
E : Acide Glutamique
F : Phénylalanine
G : Glycine
H : Histidine
I : Isoleucine
K : Lysine
L : Leucine
M : Méthionine
N : Asparagine
P : Proline
Q : Glutamine
R : Arginine
S : Sérine
T : Thréonine
V : Valine
W : Tryptophane
Y : Tyrosine

Sommaire

PRESENTATION DU MEMOIRE	1
INTRODUCTION	
A - LES RETROVIRUS ET LA DECOUVERTE DES ONCOGENES	2
B - LES ONCOGENES	3
C - LES PROTEINES KINASES	5
I Homologies structurales	
II Mécanismes de régulation	
III Mécanismes d'activation	
D - L'ONCOGENE <u>mil/raf</u>	13
I Les virus ayant transduit l'oncogène <u>mil/raf</u>	
A Pathologie des virus 3611MSV et MH2	
B Structure et mode d'expression des virus 3611MSV et MH2	
II Le locus c- <u>mil/raf</u>	
A Localisation chromosomique	
B Structure du gène c- <u>mil/raf</u>	
C Expression du gène c- <u>mil/raf</u>	
III Les protéines <u>mil/raf</u>	
IV Le gène <u>mil/raf</u> et la transformation cellulaire	
A Rôle de v- <u>mil</u> sur les cellules aviaires	
B Rôle de v- <u>mil</u> dans la tumorigénicité du virus MH2 <i>in vivo</i>	
C Transformation des cellules murines par le gène v- <u>raf</u>	
D Activation du gène c- <u>mil/raf</u>	
V Le gène c- <u>mil/raf</u> appartient à une famille de gènes	
RESULTATS ET DISCUSSIONS	
I CARACTERISATION DE L'HOMOLOGUE CELLULAIRE POULET DE v- <u>mil</u>	25
1 Isolement des séquences cellulaires homologues à v- <u>mil</u>	
2 Localisation des exons	
3 Séquences des sites de recombinaison	
CONCLUSION ET DISCUSSION	
II CARACTERISATION ET EXPRESSION DU GENE c- <u>mil</u> (article 1)	29
1 Isolement et caractérisation de deux ADNc différents	
2 Détection et expression des ARN messagers c- <u>mil</u>	
3 Produits de traduction de ces ARN messagers	
CONCLUSION ET DISCUSSION	

III ACTIVATION DU GENE <u>c-mil</u> - DOMAINE FONCTIONNEL	33
DE LA P100 gag - <u>mil</u> (articles 2 et 3)	
1 Activité biologique de la portion carboxy-terminale du gène <u>c-mil</u> sur NR	
2 Analyse de la protéine synthétisée par le recombinant SmXHc- <u>mil</u>	
3 Influence des mutations entre le gène viral et le gène cellulaire	
4 Influence des séquences délétées	
5 Importance du domaine kinase	
CONCLUSION ET DISCUSSION	
CONCLUSION	39
BIBLIOGRAPHIE	41
ANNEXES : articles 1 à 3	

PRESENTATION DU MEMOIRE

Les cancers proviennent de la prolifération anarchique de certaines cellules. Comment une cellule peut-elle s'affranchir des règles de la croissance cellulaire ? La croissance est sous la dépendance de gènes qui normalement contrôlent cycle cellulaire et/ou différenciation. Certains de ces gènes (appelés proto-oncogènes) sont susceptibles, sous certaines conditions, d'induire un processus de transformation (ils sont alors appelés oncogènes). La découverte de ces gènes est due aux progrès effectués dans deux voies de recherche.

La première voie, qui constitue l'étape initiale des découvertes, a été ouverte par l'étude des rétrovirus transformants. Ces rétrovirus, qui possèdent la remarquable propriété de pouvoir recombinaison avec du matériel génétique cellulaire, ont capturé et activé certains de ces gènes, ce qui leur confère leurs propriétés transformantes. Ces virus constituent donc une source privilégiée pour l'étude de tels gènes. Quelques 30 oncogènes ont été isolés à partir de rétrovirus qui produisent des carcinomes, des sarcomes, des leucémies et des lymphomes chez le poulet et chez d'autres oiseaux ainsi que chez le rat, la souris, le chat et le singe.

La deuxième voie de recherche qui s'est développée plus tardivement, a consisté à isoler des oncogènes dans les cellules tumorales chez l'homme et chez l'animal.

Plus de la moitié des oncogènes ainsi isolés codent pour des protéines pourvues d'une activité kinase. L'oncogène v-mil présent au sein du rétrovirus aviaire MH2 et objet de ce mémoire appartient à cette famille d'oncogènes.

Dans l'introduction de ce mémoire, nous avons donc tenté de décrire les caractéristiques que présentent les protéines kinases. Nous avons également abordé les mécanismes de régulation possibles de ces protéines, ainsi que les différents modes d'activation de ces protéines en protéines kinases oncogènes. Enfin, nous nous sommes particulièrement intéressé au gène mil/raf et nous avons tenté de récapituler les connaissances actuelles concernant ce gène.

Dans la seconde partie de ce mémoire, nous présentons les résultats des recherches menées sur l'oncogène v-mil et son homologue cellulaire, le gène c-mil. Nous avons tout d'abord cloné et caractérisé l'équivalent cellulaire du gène v-mil chez le poulet, en vue d'établir si tout ou partie du gène c-mil a été transduite par le virus MH2. Nous avons ensuite étudié l'activité biologique de cet équivalent cellulaire sur le système des cellules de neurorétine en vue de proposer un mécanisme d'activation du gène c-mil capable de conférer à ce gène des propriétés biologiques semblables à celles de son homologue viral. Nous avons également isolé des ADNc du gène c-mil, et leur caractérisation nous ont permis de définir un mode d'expression de ce gène. Enfin, nous avons étudié l'activité biologique de mutants MH2 construits *in vitro* en vue de localiser au sein de la protéine codée par le gène v-mil la (ou les) région(s) importante(s) pour son activité mitogène observée sur les cellules de neurorétine.

INTRODUCTION

A - LES RETROVIRUS ET LA DECOUVERTE DES ONCOGENES

Les rétrovirus sont des virus dont le génome diploïde est constitué d'ARN. Lorsque le virus pénètre dans le cytoplasme, cet ARN viral est transcrit en ADN double brin par une enzyme codée par le virus : la rétopolymérase (Baltimore 1970, Temin et Mizutani 1970). Cet ADN s'intègre ensuite dans le génome de la cellule hôte et les gènes viraux intégrés sont alors répliqués, transcrits et traduits comme les gènes de la cellule hôte (Figure 1).

Les rétrovirus oncogènes sont répartis en deux groupes selon leurs propriétés biologiques :

1) Les rétrovirus peu ou non oncogènes. Ces virus ne transforment pas les cellules en culture mais induisent chez l'animal des tumeurs, principalement des lymphomes, avec un temps de latence de plusieurs mois.

Leur génome est constitué de trois gènes : le gène gag codant pour les protéines de la nucléocapside virale, le gène pol codant pour la rétopolymérase et le gène env codant pour les glycoprotéines d'enveloppe responsables de l'infectivité du virus. Ces gènes sont disposés : 5'gag-pol-env3' (RNA Tumor Viruses 1982,1985) (Figure 2). Le génome viral présente à ses extrémités les séquences U5 (en 5') et U3 (en 3') qui, après rétrotranscription se retrouvent dupliquées dans l'ADN proviral (U3RU5) (RNA Tumor Viruses). Ces séquences, appelées LTR (Long Terminal Repeat), contiennent les signaux d'activation, de promotion, d'initiation et de terminaison de la transcription du génome viral. Ces virus (ALV), possédant toutes les séquences nécessaires au cycle infectieux, peuvent se propager de façon autonome.

2) Les rétrovirus transformants. Ces virus sont capables de transformer les cellules en culture et induisent chez l'animal des leucémies aiguës, des sarcomes ou des carcinomes avec un temps de latence très court (de l'ordre de quelques semaines) (Graf et Beug 1978, Graf et Stehelin 1982).

Leur génome contient des séquences spécifiques (oncogène viral ou v-onc) responsables de leurs propriétés biologiques et qui résultent de la transduction de gènes cellulaires appelés proto-oncogènes (Stehelin et al. 1976, revue de Bishop 1983). Ces gènes, qui se trouvent modifiés après leur capture et leur propagation par les rétrovirus, ont été acquis au détriment des gènes gag, pol et env (à l'exception du virus du sarcome de Rous ou RSV). Ces virus défectifs (DLSV) sont, de ce fait, devenus incapables de se propager seuls et nécessitent pour leur propagation la présence d'un virus autonome ou virus "helper" (Figure 2).

L'étude des rétrovirus transformants et de leur v-onc a permis l'identification de gènes cellulaires phylogénétiquement conservés (proto-oncogènes) qui sont susceptibles, lorsqu'ils sont altérés (par mutation, surexpression, délétion..), de devenir des oncogènes (c-onc) et d'être impliqués dans les processus cancéreux. Cependant, outre les c-onc présentant des homologies avec les gènes viraux, il existe des c-onc pour lesquels il n'a pas été isolé d'équivalent viral.

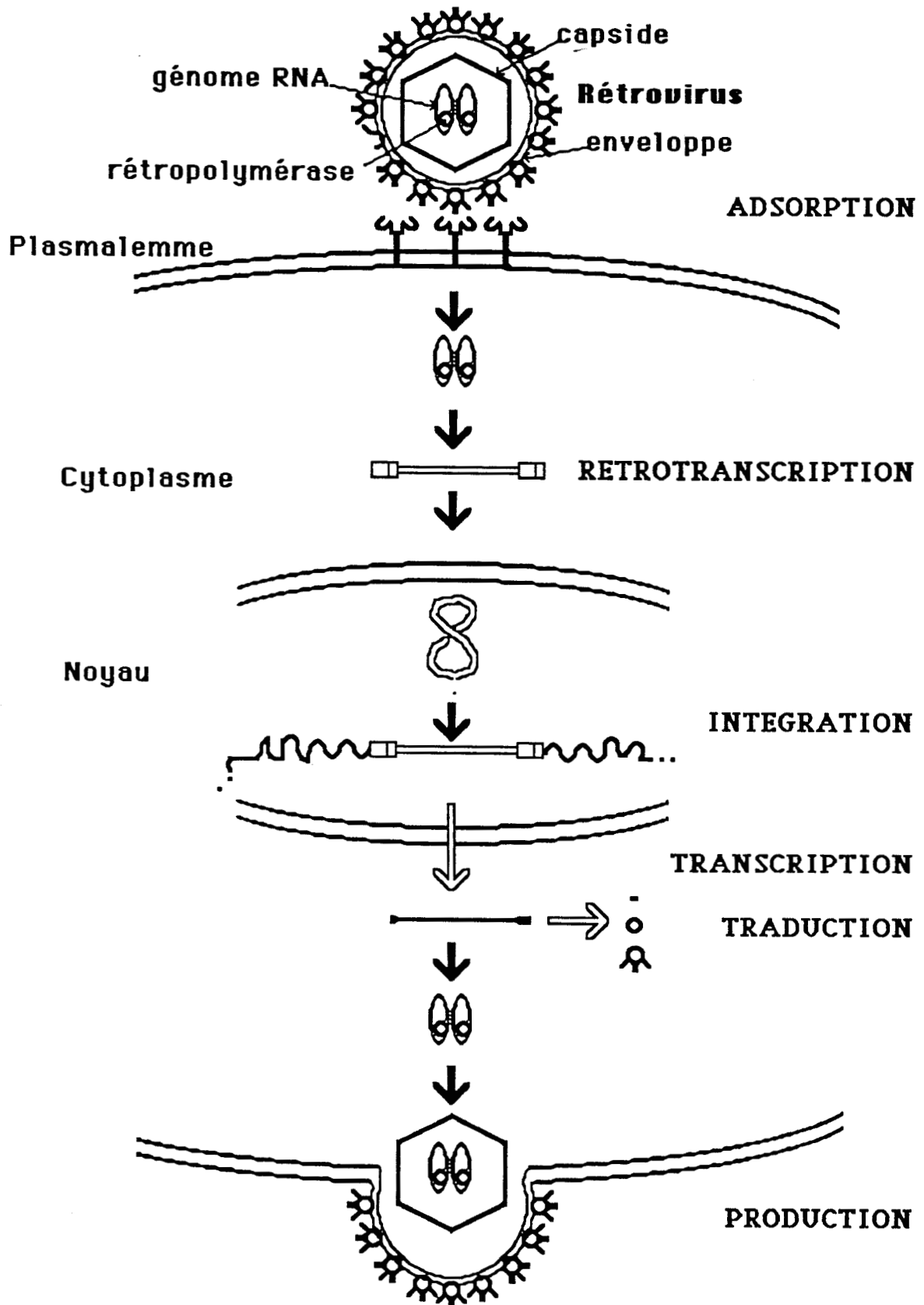


Figure 1 : Schéma général de la propagation des rétrovirus.

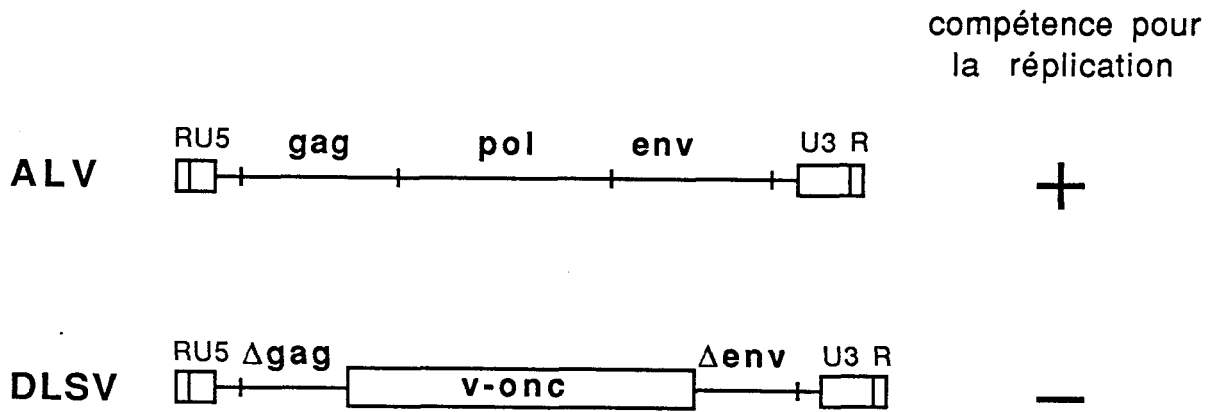


Figure 2 : Structure du génome viral

B - LES ONCOGENES

Plus de 50 oncogènes ont été identifiés, la plupart par l'intermédiaire des rétrovirus. Comment les oncogènes interviennent-ils dans la transformation cellulaire ? Les cellules transformées peuvent présenter une dérégulation dans leur prolifération et manifestent souvent, pour leur croissance, une indépendance ou une dépendance réduite vis à vis des facteurs de croissance exogènes.

La prolifération des cellules en culture est régulée par des facteurs extracellulaires et notamment par les facteurs de croissance. Certains de ces facteurs interagissent avec des récepteurs membranaires qui transmettent le signal à l'intérieur de la cellule. Le signal mitotique est ensuite acheminé jusqu'au noyau pour aboutir finalement à la synthèse d'ADN et à la division cellulaire.

Or certains proto-oncogènes sont impliqués directement dans la croissance cellulaire. En effet, ils peuvent coder pour :

- un facteur de croissance tel le gène c-sis qui code pour la sous-unité β du facteur de croissance dérivé des plaquettes : le PDGF (Chiu et al. 1984, Johnsson et al. 1984).

- pour un récepteur de facteur de croissance tels les gènes c-erbB et c-fms qui codent respectivement pour les récepteurs du facteur de croissance épidermique (EGF) (Downward et al. 1984b, Ullrich et al. 1984) et du facteur de croissance spécifique des macrophages (M-CSF ou CSF-1)(Sherr et al. 1985). De même les gènes c-neu/erbB2, c-kit, c-ros, et c-met codent pour des protéines présentant des homologies structurales avec des récepteurs membranaires, bien que leurs ligands n'aient pas encore été identifiés (Bargmann et al. 1986a, Neckameyer et al. 1986, Yamamoto et al. 1986, Park et al. 1987, Yarden et al. 1987).

- ou pour des protéines participant à la transmission du signal mitotique de la membrane au noyau. Ainsi les gènes ras (c-Harvey ras, c-Kirsten ras et Nras) codent pour des protéines nécessaires dans la réponse des cellules NIH3T3 aux facteurs de croissance (Mulcahy et al. 1985) ou à d'autres métabolites mitogènes (Yu et al. 1988). Ces protéines présentent des homologies structurales et fonctionnelles avec des protéines de relais membranaires : les protéines G (revue de Barbacid 1987).

Les gènes c-myc, c-fos et c-myb, qui codent pour des protéines nucléaires associées à l'ADN, joueraient un rôle dans la transmission du signal mitotique au niveau du noyau : leur transcription est activée en réponse à certains facteurs de croissance ou agents mitogènes (Torelli et al. 1985, revues de Goustin et al. 1986, Rozengurt 1986) et dans le cas du gène c-fos, cette activation a été montrée nécessaire pour la prolifération des cellules NIH3T3 (Holt et al. 1986, Nishikura et Murray 1987). La protéine myc notamment pourrait intervenir dans la synthèse d'ADN en se fixant sur les origines de réplication (Iguchi-Arigo et al. 1987).

Le gène c-jun code pour une protéine possédant des homologies structurales et fonctionnelles avec le facteur de transcription Ap1 (Bohmann et al. 1987). Enfin on peut également citer le cas du proto-oncogène c-erbA qui code pour une protéine nucléaire, récepteur des hormones thyroïdiennes (Sap et al. 1986, Weinberger et al. 1986).

On peut comprendre dès lors, que des versions altérées de ces gènes (v-onc ou c-onc) vont coder pour des protéines susceptibles de perturber le déroulement normal du processus mitotique. Par exemples : l'oncogène v-sis (du virus sarcomatogène simien SSV) code pour une protéine dont la structure et l'activité ressemblent à celles du PDGF (Huang et al. 1984, Owen et al. 1984, Johnsson et al. 1985), la protéine codée par l'oncogène KS (isolé d'un sarcome de Kaposi) présente des homologies significatives avec les facteurs de croissance fibroblastiques (FGF) (Delli Bovi et al. 1987). Les oncogènes v-erbB (du virus de l'érythroblastose aviaire AEV) et v-fms (du virus sarcomatogène félin Mc Donough) codent respectivement pour des versions tronquées des récepteurs de l'EGF (Ullrich et al. 1984) et du CSF-1 (Coussens et al. 1986b). Ces récepteurs tronqués sont constitutivement activés, c'est à dire qu'ils transmettent le signal mitogène en absence de leurs facteurs de croissance respectifs (Kris et al. 1985, Sacca et al. 1986, Wheeler et al. 1986).

Dans de nombreux tissus, la division cellulaire est régulée par la différenciation qui limite le potentiel mitotique des cellules. Certaines voies de transmission du stimulus conduisant à la mitose et à la différenciation sont semblables. Certains facteurs de croissance peuvent en effet agir selon le type cellulaire comme des facteurs de différenciation. De plus, la transduction des stimuli mitogènes et de différenciation peut mettre en jeu des protéines membranaires, des seconds messagers, et des effecteurs nucléaires identiques. Les proto-oncogènes peuvent donc intervenir également dans le contrôle de la différenciation. Par exemple, le gène c-src jouerait un rôle dans la différenciation des cellules neuronales (revue de Müller 1986). Le produit du gène c-ras est requis également pour la différenciation des cellules de phéochromocytome PC12 (Hagag et al. 1986). De même le gène c-fos est également impliqué dans la différenciation cellulaire (Curran et Morgan 1985, revue de Verma et Sassone-Corsi 1987) et notamment dans la différenciation des adipocytes (Distel et al. 1987).

Mais ces voies de communication intracellulaires interviennent aussi dans la transduction de nombreux stimuli autres que les stimuli mitogènes et de différenciation. Il est donc possible que les oncogènes soient impliqués dans d'autres fonctions que la prolifération ou la différenciation. Ainsi, par exemple, l'induction du gène c-fos peut être également observée, selon le type cellulaire, en réponse à des stimuli sensoriels (Hunt et al. 1987) ou même de stress (Andrews et al. 1987).

L'objet de ce mémoire étant l'étude de l'oncogène v-mil et de son homologue cellulaire, oncogène dont le produit possède une activité sérine/thréonine-kinase *in vitro*, nous nous intéresserons dans le chapitre qui suit, aux oncogènes codant pour des protéines pourvues d'activité kinase. Cette analyse, qui débordera le cadre des oncogènes, ne prétend pas être exhaustive, et seuls quelques exemples illustrant les propos cités dans le texte seront décrits.

C - LES PROTEINES KINASES

Les mécanismes de phosphorylation, déphosphorylation, catalysés par des protéines spécifiques : les protéines kinases et les phosphatases, constituent un processus de régulation de diverses fonctions cellulaires. La phosphorylation des protéines intervient notamment dans le métabolisme du glycogène, dans la transduction de stimuli externes (de nombreux récepteurs membranaires possèdent une activité tyrosine-kinase), dans la régulation de l'activité des récepteurs membranaires, dans la régulation des facteurs de transcription, dans la biosynthèse protéique (plusieurs facteurs d'initiation sont phosphorylés), ainsi que dans les échanges ioniques (les canaux ioniques et les pompes ioniques sont régulés par phosphorylation) (revue de Hunter 1987).

Plus de la moitié des oncogènes isolés à ce jour appartient à la famille des gènes codant pour des protéines kinases (Tableau 1). Cette activité kinase se révèle importante dans l'activité transformante de ces oncogènes puisque l'abolition de l'activité kinase des protéines codées par les oncogènes *v-src* (Snyder et al. 1985), *v-mos* (Hannink et Donoghue 1985) et *v-fps* (Weinmaster et al. 1986) élimine leur pouvoir transformant.

La famille des protéines kinases peut être subdivisée en deux groupes. Le premier groupe est constitué de protéines kinases spécifiques des résidus sérine et/ou thréonine, caractéristiques de certaines protéines cytoplasmiques. Le second groupe est constitué de protéines kinases spécifiques des résidus tyrosine, caractéristiques de certains récepteurs et protéines membranaires.

I) Homologies structurales

Les protéines kinases possèdent une structure variable : elles peuvent être constituées d'une seule chaîne polypeptidique, cas du récepteur de l'EGF ou des protéines kinases Ca^{++} /phospholipides dépendantes (PKC), ou de plusieurs sous-unités, cas du récepteur de l'insuline ou des protéines kinases AMPc dépendante (PKA) (Figure 4). Dans ce dernier cas, seules certaines sous-unités peuvent exercer une fonction catalytique.

Malgré cette variabilité structurale, toutes les protéines kinases (à l'exception de certaines protéines impliquées dans la régulation de la transcription chez les procaryotes) présentent des homologies de séquence dans la région responsable de l'activité catalytique (domaine catalytique ou domaine kinase) (Foster et al. 1986, Hunter 1987). Cette région, dont la position au sein de la molécule est variable selon les protéines, s'étend sur environ 260 nucléotides et comprend des séquences extrêmement conservées (Figure 3) dont certaines sont importantes dans l'activité catalytique :

- La séquence $GXGXXGX_{15-20}K$ (G : Gly, K : Lys, X : acide aminé variable) impliquée dans la fixation de l'ATP (Kamps et al. 1984). La lysine, considérée comme le site de fixation de l'ATP, apparaît essentielle pour l'activité tyrosine-kinase des protéines *v-src* (Snyder et al. 1985), *v-fps* (Weinmaster et al. 1986) et des récepteurs de l'EGF (Chen et al. 1987) et de l'insuline (Chou et al. 1987, Ebina et al. 1987).

v-onc	virus	maladie	hôte	protéine v-onc	activité	localis.	protéine proto-onc	activité	localis.
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	gP 180 ^{gag-fms}	Tyr. Kin.	Membrane plasmique	gp165	Tyr. Kin. Réc. CSF-1	Tran. Mbr.
ros	UR2	Sarcome	Poulet	p68 ^{gag-ros}	Tyr. Kin.	Membranes		Tyr. Kin. ? Réc ?	Tran. Mbr. ?
src	RSV S1 S2	Sarcome	Poulet	pp60 ^{v-src} pp62 ^{s-src}	Tyr. Kin.	Face. int. du Plasmaleme	pp60	Tyr. Kin.	Mbr. et Cytosquel.
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	p59-62	Tyr. Kin.	
fgr	GR-FeSV	Sarcome	Chat	P70 ^{gag-actin-fgr}	Tyr. Kin.				
abl	Ab-MuLY	Leuc. préB	Souris	P160 ^{gag-abl}	Tyr. Kin.	Membrane plasmique	p150		Cytoplasme
	HZ2-FeSV	Sarcome	Chat	p98 ^{gag-abl}	Tyr. Kin.	Membrane plasmique			
kit	HZ4-FeSV	Sarcome	Chat	p80 ^{gag-kit}	Tyr. Kin.		p145 (homme)	Tyr. Kin. Réc ?	Tran. Mbr.
sea	S13	Sarcome Erythro.	Poulet	gP155 ^{env-sea} → gP85+gP70	Tyr. Kin. (gP70)	Cytoplasme			
mos	Mo-MSV	Sarcome	Souris	p37 ^{env-mos}	Thr/Ser. Kin.	Cytoplasme			
mil/ raf	MH2	Carcinome	Poulet	p100 ^{gag-mil}	Thr/Ser. Kin.	Cytoplasme	p71/73		
	MSV-3611	Sarcome	Souris	gP90 ^{gag-raf} p75 ^{gag-raf}	Thr/Ser. Kin.				

Tableau 1 : Oncogènes codant pour des protéines kinases

Tableau 1 (suite)

c-onc	isolement	protéine c-onc	activité	localis.	protéine proto-onc	activité	localis.
neu/ erbB2	rat : neuroblastome	p185	Tyr. Kin.	Tran. Mbr.	p185	Tyr. Kin. Réc. ?	Tran. Mbr.
trk	homme : carcinome du colon ascendant	p75	Tyr. Kin.	cytoplasme		Tyr. Kin.? Réc. ?	Tran. Mbr.?
met	MNNG-HOS : lignée cellulaire humaine	p65	Tyr. Kin.		p140	Tyr. Kin. Réc. ?	Tran. Mbr.

HI-R LGQGSFGMVYEGNARDII.KGEAETRVAVKTVNESASLRERIE..FLNEASVMKGFTHH..VVR.LL..GVVSKGQ
 IGFI-R LGQGSFGMVYEGVAKGVV.KDEPETRVAIKTVNEAASMRERIE..FLNEASVMKEFNCHH..VVR.LL..GVVSQGG
 met IGRGHFGCVYHGTLLDNDGKKIH..CAVKSLNRITDIGEVSQ..FLTEGIIMKDF.S.HPNVLS.LL..GICLRSE
 neu LGSGAFGTVYKGIWIPDGENVKIP..VAIKVLRENTSPKANKE..ILDEAYVMAGVGSPIY..VSR.NL..GICLTST
 v-erbB LGSGAFGTVYKGIWIPDGENVKIP..VAIKVLRENTSPKANKE..ILDEAYVMAGVGSPIY..VSR.LL..GICLTST
 v-abl LGGGQYGEVYEGVWKKYSLT.....VAVKTLKEDTMEVEE...FLKEAAVMK..EIKHPNLVQ.LL..GVCTREP
 v-fes IGRGNFGEVFSGRLLRADNTL.....VAVKSCRE.TLPPDIKAK.FLQEAAILK..QYSHPNIVR.LI..GVCTQKQ
 v-fgr LGTGCFGDVWLGWNGST.K.....VAVKTLKPGTMSPKA...SLEEAQIMK..LLRHDKLVQ.LY..AVV.PEE
 v-fms LGTGAFGKVVVEATAFGLG.KEDAVLKVAVKMLKS.TAHADEKEA.LMSELKIM.SHLGQHENIVN.LL..GACTHGG
 v-kit LGAGAFGKVVVEATAYGLI.KSDAAMTVAVKMLKPSAHLTEREA..LMSELKVS.SYLGNHMNIIVN.LL..GACTVGG
 PDGF-R LGSGAFGQVVEATAHGLS.HSQATMKVAVKMLKSTARSEK.QA.LMSELKIM.SHLGPHLNVVN.LL..GACTKGG
 v-ros LGSGAFGEVYEGTALDILADGSGESRVAVKTLKRGAT.DQEKSE.FLKEAHLM..SKFDHPHILK.LL..GVCLLNE
 v-yes LGQGCFFGEVWMTWNGTT.K.....VAIKTLKLGTMPEA...FLQEAQIMK..KLRHDKLVP.LY..AVVSEE.
 v-src LGQGCFFGEVWMTWNTT.R.....VAIKTLKPGTMSPEA...FLQEAQVMK..KLRHEKLVQ.LY..AVVSEE.
 lck LGAGQFFGEVWMTWNGHT.....VAVKSLKQGSMSPEA...FLAEANLMK..QLQHPRLVR.LY..AVVTQK.
 v-mos LGSGGFGSVYKATYHGV.....P..VAIKQVNKCTKDLRASQRSFWAELN...IARLRHNDIVR.....VVAAST
 v-mil IGSGSFGTVYKKGKWHGD.....VAVKILKVVDPTPEQFQA.FRNEVAVLR..KTRH...VNILLFMGYMTKD.
 A-raf IGTGSFGTVFRGLWHGD.....VAVKVLKVAQPTAEQAQA.FKNEMQVLR..KTRH...VNILLFMGMFTRP.
 PKG LGVGGFGRVELVQLKSEESKT....FAMKILKRRHIVDTRQQEHIRSEK.....QIMQGAH.S.DF..IVRLYRT
 PKA LGTGSFGRVMLVKHMETGNH.....YAMKILDKQKVVKLQIEHTLNEK.....RILQAVN.F.PF..LVKLEFS
 PKCI LGKGSFQVLMVAERRGSDDEL.....YAIKIMKKDVIQDDVDCTLVEKRVLA.. [26 AA]
 GXGXXG K
 HI-RPTLVVMEI.MA....HG.DLKSYLRLRPEAENNPGRPPPTLQEMIQMAAEIADGMAYLNAKFFVHRDL
 IGFI-RPTLVIMEI.MT....RG.DLKSYLRLRPEMENNPVLAPPSLSKMIQMAEIIADGMAYLNANKFFVHRDL
 metGSPLVVLPMK....HG.DLRNFIRNETHNP.....TVKDLIGFGLQVAKGMKYLASKKFFVHRDL
 neuVQLVTQL.MP....YG.CLLDHVR.EHRGRL.....GSQDLLNWCMIQAKGMSYLEDVRLVHRDL
 v-erbBVQLVTQL.MP....YG.CLLDHVR.ENRGRL.....GSQDLLNWCMIQAKGMSYLEDVRLVHRDL
 v-ablPFYIITEF.MT....YG.NLLDYLR.ECNRQEV.....SAVLLYMATQISSAMEYLEKKNFIHRDL
 v-fesPIYIVMEI.VQ....GG.DFLTFLRTEGARL.....RMKTLQVMGDAAGMEYLESKCCIHRDL
 v-fgrPIYIVTEF.MC....HG.SLLEFLKQDEGQDL.....TLPQLVDMAAQVAEGMAYMERMDYIHRDL
 v-fmsP.VLVITEYCC....YG.DLLNFLRR [71 AA] ELRDLHFSSQVAQGMFLASKNCIHRDV
 v-kitPTLVITE.YCC....YG.DLLNFLRR [80 AA] DLEDLLSFSYQVAKGMFLASKNCIHRDL
 PDGF-RPIYIITE.YCR....YG.DLVLDYLR [103 AA] SYTDLVGFSYQVANGMDFLASKNCVHRDL
 v-rosPQYLILEL.ME....GG.DLLSYLRGARKQKQFQSPLL...TLTDLDDICLDICKGCVYLEKMRFIHRDL
 v-yesPIYIVTEF.MT....KG.SLLDFLKEGEGKFL.....KLPQLVDMAAQIADGMAYIERMNYIHRDL
 v-srcPIYIVIE.YMS....KG.SLLDFLKGEMGYL.....RLPQLVDMAAQIASGMAYVERMNYVHRDL
 lckPIYIITE.YME....NG.SLVDFLKTTPSGIKL.....NVNKLDDMAAQIAEGMAFIEEQNYIHRDL
 v-mos RTPEDSNLSGTII...ME...FGG. [26 AA] GKCLKYSLDVVNGLLFLHSQSILHLDL
 v-milNLAIVTQWCE....GSSLYKHLHVQETKQMF.....QLIDIARQTAQGMVYLHAKNIIHRDM
 A-rafGFAIITQ.WCE....GSSLYHHLHVADTRFDMV.....QLIDVARQTAQGMVYLHAKNIIHRDL
 PKGFKDSKYL.YMLMEACLG.GELWTILDRGSF.....EDSTRFYTACVVEAFAYLHSGKIIYRDL
 PKAFKDNNSL.YMVMEYVPGG.EMFSLRIRGRF.....SEPHARFYAAQIVLTFEYLHSLDLIYRDL
 PKCIYEVMEYVTGG.DLMYHIQQLGKFKF.....PHAAFYAAEIAIGLFFLHNQGIYRDL
 HRDL

Figure 3 : homologies structurales entre les protéines kinases

- située à une distance de 80 à 180 résidus, on retrouve une région d'une soixantaine d'acides aminés comprenant le motif HRDLX₃N (His-Arg-Asp-Leu-X₃-Asn) conservé également dans de nombreuses phosphotransférases (Brenner 1987), ainsi que les motifs DFG (Asp-Phe-Glu) et APE (Ala-Pro-Glu). Cette dernière séquence s'est révélée importante dans l'activité tyrosine-kinase de la protéine v-src (Bryant et Parsons 1984). En ce qui concerne le motif HRDLX₃N, la séquence X₃ : AAR (Ala-Ala-Arg) ou RAA (Arg-Ala-Ala) semble caractéristique des protéines tyrosine-kinases ; en effet, cette séquence diffère dans les protéines sérine/thréonine-kinases (Foster et al. 1986).

Les séquences s'étendant entre DFG et APE, quoiqu'assez peu conservées, présentent également quelques caractéristiques différenciant les protéines tyrosine-kinases des protéines sérine/thréonine-kinases. En effet, l'existence dans cette région d'une tyrosine (Y) entourée d'acides aminés : DX₁₋₃Y, semble une caractéristique commune aux protéines tyrosine-kinases (Hunter 1987).

Malgré les homologies de séquence observées, il existe à l'intérieur du domaine catalytique conservé des différences qui sont susceptibles de conférer aux protéines kinases leur spécificité fonctionnelle. Par exemple, le domaine kinase de v-abl contient des séquences qui confèrent à cet oncogène sa spécificité de transformation des cellules lymphoïdes (Mathey-Prevot et Baltimore 1988).

II) Mécanismes de régulation

les protéines kinases peuvent présenter des mécanismes de régulation diversifiés.

1) Régulation par fixation d'un ligand

Certaines protéines kinases peuvent être stimulées par fixation d'un ligand sur une région régulatrice (protéines monomériques) ou sur une sous-unité régulatrice (protéines oligomériques).

Ainsi les protéines tyrosine-kinases récepteurs de facteurs de croissance (seront considérés comme facteurs de croissance les molécules biologiques possédant des propriétés mitogènes) sont stimulées par fixation de leur facteur de croissance. Ce type de protéines kinases possède des caractéristiques structurales et fonctionnelles communes : les récepteurs sont constitués de deux domaines séparés par une région transmembranaire, un domaine extracellulaire responsable de la fixation du facteur de croissance ou de l'hormone et un domaine intracytoplasmique qui contient la région catalytique (revue de Carpenter 1987) (Figure 4). La fixation du facteur de croissance sur le domaine extracellulaire entraîne une stimulation rapide de l'activité tyrosine-kinase du récepteur, en partie responsable de la transmission intracellulaire et de l'amplification du signal délivré par le facteur de croissance. Pour les récepteurs de l'EGF et de l'insuline, cette activité tyrosine-kinase est nécessaire dans les réponses physiologiques et biochimiques initiées par l'EGF et l'insuline (Chen et al. 1987, Chou et al. 1987, Ebina et al. 1987, Honegger et al. 1987, Moolenaar et al. 1988).

D'autres protéines kinases sont activées par des seconds messagers telle la PKA activée par l' AMPc : ce second messenger, synthétisé en réponse à certains stimuli (hormones,

neuromédiateurs), se fixe à la sous-unité régulatrice de la PKA libérant ainsi la sous-unité catalytique qui peut alors phosphoryler des protéines (revue de Edelman et al. 1987). De même, la PKC est stimulée par le diacylglycérol produit par l'hydrolyse des phosphoinositides en réponse à certains facteurs de croissance ou à certaines hormones (Nishizuka 1984).

Il existe également des protéines kinases activées par des ions, tels les ions Ca^{++} par l'intermédiaire de la calmoduline (revue de Edelman et al. 1987).

2) Régulation par phosphorylation

Outre la régulation par fixation d'un ligand, les protéines kinases peuvent également être régulées positivement ou négativement par des réactions de phosphorylation. Ces réactions peuvent être catalysées par les protéines kinases elles-mêmes (autophosphorylation) ou par d'autres protéines kinases.

Ce type de régulation a été décrit pour certains récepteurs membranaires tels les récepteurs de l'insuline et de l'EGF (revue de Sibley et al 1987). Après fixation de leurs ligands respectifs, ces récepteurs sont phosphorylés sur des résidus tyrosine *in vivo* et peuvent également s'autophosphoryler sur les mêmes résidus tyrosine *in vitro*. Pour le récepteur de l'insuline, cette autophosphorylation augmente son activité tyrosine-kinase *in vitro* (Rosen et al 1983) et les effets biochimiques en réponse à l'insuline *in vivo* (Ellis et al 1986). Quant au récepteur de l'EGF, la signification de cette autophosphorylation est moins claire. Certains auteurs ont montré que l'autophosphorylation de ce récepteur augmente son activité kinase *in vitro* (Bertics et Gill 1985), alors que d'autres auteurs ont montré que cette autophosphorylation n'a aucune influence sur l'activité kinase du récepteur (Downward et al. 1985, Gullick et al. 1985, revue de Carpenter 1987).

Si ces récepteurs semblent capables de "s'auto-réguler", ils peuvent également être régulés par d'autres protéines kinases. En effet, en réponse à la fixation de leurs ligands, ces récepteurs sont phosphorylés sur des résidus sérine et thréonine. Ces phosphorylations, qui pourraient être catalysées par la PKC, décroissent ou inhibent l'activité tyrosine-kinase de ces récepteurs et réduisent leur capacité à fixer leurs ligands (revues de Carpenter 1987, Sibley et al. 1987).

Il en est de même des protéines tyrosine-kinases oncogènes qui s'autophosphorylent *in vitro* et sont phosphorylées sur les mêmes résidus tyrosine *in vivo* (revue de Hunter et Cooper 1985).

Pour certaines de ces protéines, comme par exemple les protéines v-src, gag-v-yes, gag-v-fps, gag-v-fes et gag-v-abl, le site majeur de phosphorylation est localisé dans le domaine catalytique et à une position équivalente (Neil et al. 1981, Patschinsky et al. 1982, revue de Hunter et Cooper 1985). La phosphorylation de ces résidus tyrosine pourrait moduler l'activité kinase et transformante de ces protéines oncogènes. Pour la protéine gag-v-fps notamment, il a été montré d'une part, que la mutation de la tyrosine site majeur d'autophosphorylation (Tyr 1073) réduit son activité tyrosine-kinase et son activité transformante *in vitro* (Weinmaster et al. 1984), et d'autre

part, que la phosphorylation de cette tyrosine est en corrélation avec une augmentation de l'activité kinase de la protéine gag-v-fps *in vitro* (Meckling-Hansen et al. 1987). Quant à la protéine v-src, si la mutation du site majeur d'autophosphorylation (Tyr 416) ne réduit pas son activité kinase et transformante *in vitro* (Snyder et al. 1983) on observe cependant une réduction du potentiel oncogène *in vivo* (Snyder et Bishop 1984) ; de plus, l'augmentation de la phosphorylation de cette protéine sur les résidus tyrosine s'accompagne d'une augmentation de son activité kinase (Patschinsky et al. 1986a).

Des mécanismes de phosphorylation régulent également la protéine c-src (homologue cellulaire de la protéine v-src), puisque l'activité kinase de cette protéine est considérablement réduite par phosphorylation d'un résidu tyrosine (Tyr 527) absent dans la protéine v-src (Courtneidge 1985, Cooper et King 1986). La phosphorylation de cette tyrosine qui régulerait donc négativement l'activité kinase de la protéine c-src, ne résulterait pas d'une autophosphorylation mais serait catalysée par une protéine tyrosine-kinase cellulaire non identifiée (Jove et al. 1987).

Certaines de ces protéines, comme par exemple les protéines v/c-src et v/c-abl, sont également phosphorylées *in vivo* sur des résidus sérine (Collet et al. 1979, Gould et al. 1985, Pendergast et al. 1987). Cependant la signification de ces phosphorylations, catalysées par la PKC et/ou la PKA, demeure encore inconnue.

En ce qui concerne la protéine v-src, Cross et Hanafusa (1983) ont montré que la délétion de la région contenant la sérine site majeur de phosphorylation (Ser 17) ne modifie pas l'activité kinase et transformante *in vitro* ; dans un autre système cellulaire, Roth et al. (1983) ont décrit que l'activation de la PKA augmente la phosphorylation de la protéine v-src et accroît son activité kinase *in vitro*. Ces résultats suggèrent que la phosphorylation des résidus sérine pourrait moduler l'activité de la protéine v-src dans certains types cellulaires.

III) Mécanismes "d'activation"

L'activation d'une protéine kinase, c'est à dire sa conversion en protéine kinase oncogène, peut s'effectuer par divers types d'altérations. La comparaison de la structure et de l'expression d'un v-onc ou d'un c-onc avec celles de son proto-oncogène a permis d'identifier plusieurs mécanismes d'activation possibles (non mutuellement exclusifs). L'activation peut s'effectuer :

- par modification de la séquence nucléotidique de ce gène, par exemple par mutation ponctuelle, par délétion de séquences, par amputation et/ou fusion du gène avec des séquences exogènes ou d'autres séquences cellulaires ;
- par l'intermédiaire d'une surexpression du produit de ce gène.

Les rétrovirus combinent les deux modes d'activation, aboutissant à la surexpression d'un produit modifié.

1) Activation par modification de la séquence nucléotidique du gène

- activation par mutation ponctuelle

Certains gènes peuvent être activés par mutation ponctuelle. Par exemple, le gène c-neu/erbB2, qui code pour une protéine tyrosine-kinase (Stern et al. 1986) présentant des homologies structurales avec un récepteur membranaire (et notamment avec le récepteur de l'EGF) (Bargmann et al. 1986a, Yamamoto et al. 1986), peut être activé par mutation ponctuelle affectant la région transmembranaire de la protéine (Bargmann et al. 1986b). Cette mutation pourrait stabiliser la protéine dans une configuration obtenue normalement après fixation du ligand.

Il en est de même du gène c-src. Ce gène, qui code pour une protéine tyrosine-kinase dont l'activité kinase est faible (Iba et al. 1985, Coussens et al. 1985), n'est pas transformant lorsqu'il est surexprimé (sous contrôle d'un promoteur viral) (Iba et al. 1984, Parker et al. 1984, Shalloway et al. 1984). Cependant, ce gène surexprimé peut devenir transformant par mutation ponctuelle affectant la région amino-terminale ou le domaine kinase de la protéine (Kato et al. 1986, Levy et al. 1986), ainsi que par mutation de la tyrosine 527 site majeur de phosphorylation *in vivo* et régulateur négatif de la protéine (Cartwright et al. 1987, Kmiecik et Shalloway 1987, Piwnica-Worms et al. 1987, Reynolds et al. 1987) (Figure 5). Ces mutations provoquent une augmentation de l'activité tyrosine-kinase de la protéine c-src qui est alors comparable à celle de la protéine v-src.

Ce mécanisme d'activation par mutation du site majeur de phosphorylation *in vivo*, se retrouve également chez d'autres membres de la famille src tel le gène c-lck, qui code pour une protéine tyrosine-kinase spécifique des cellules lymphoïdes (Marth et al. 1988)

- activation par altération de séquence

Le gène c-src peut également être activé par altération de l'extrémité carboxy-terminale de la protéine aboutissant à la délétion ou à la substitution de la tyrosine site majeur de phosphorylation *in vivo* (Ikawa et al. 1986, Reynolds et al. 1987). L'oncogène v-src du virus RSV a combiné à la fois des mutations ponctuelles et l'altération de l'extrémité carboxy-terminale.

Il semble qu'un événement clé dans l'activation du gène c-fms, qui code pour le récepteur du CSF-1 (Sherr et al. 1985), soit également une altération de son extrémité carboxy-terminale (Figure 5). En effet, cette portion du gène est absente dans l'oncogène v-fms (Coussens et al. 1986b) et la restauration de cette portion au gène v-fms réduit considérablement son activité transformante (Roussel et al. 1987). L'extrémité carboxy-terminale du gène c-fms contient la tyrosine 969 dont la phosphorylation régulerait négativement l'activité tyrosine-kinase du récepteur. Cependant, la mutation de cette tyrosine n'est pas suffisante à elle seule pour "activer" le gène c-fms (Roussel et al. 1987) ; d'autres mutations (comme celles présentes dans v-fms) doivent vraisemblablement intervenir pour que ce gène devienne transformant et que son produit possède une activité tyrosine-kinase constitutive en absence de CSF-1, comme cela est le cas pour v-fms (Sacca et al. 1986, Wheeler et al. 1986).

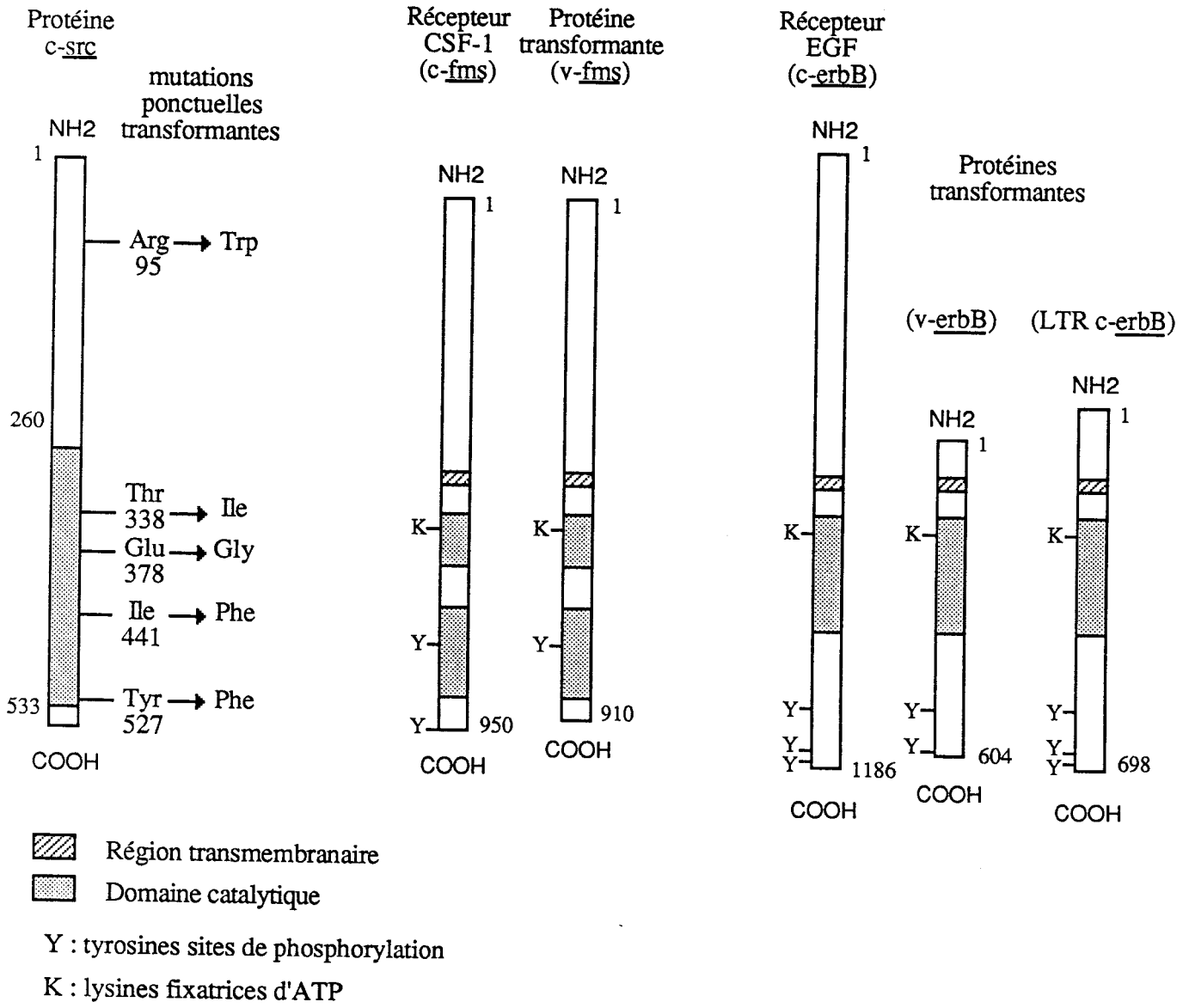


Figure 5 : Exemples d'activation des protéines kinases

- activation par amputation de séquence

D'autres gènes peuvent être activés par amputation de leur séquence. Ainsi par exemple c-erbB, qui code pour le récepteur de l'EGF (Downward et al. 1984b, Ullrich et al. 1984), peut être activé par amputation de la portion amino-terminale de son produit, correspondant à la région de la protéine fixant l'EGF. Cette amputation se retrouve en effet dans toutes les versions transformantes de ce gène (v-erbB et LTR c-erbB) (Yamamoto et al. 1983, Henry et al. 1985, Nilsen et al. 1985) (Figure 5). L'amputation de la portion amino-terminale de ce récepteur aboutirait à un récepteur tronqué possédant une activité tyrosine-kinase constitutive et ainsi capable de délivrer son signal mitogène en absence d'EGF (Gilmore et al. 1985, Kris et al. 1985).

Outre cette amputation amino-terminale, une amputation de son extrémité carboxy-terminale (comme celle présente dans l'oncogène v-erbB du virus AEV) peut également conférer à ce récepteur une activité transformante stimulée en présence d'EGF (Riedel et al. 1987). Cette région de la protéine c-erbB contient le site majeur de phosphorylation *in vivo* (Tyr 1173) qui est donc absent dans la protéine virale (Downward et al. 1984a). Une double amputation élargirait le spectre oncogénique de la protéine. En effet, le potentiel transformant du gène erbB tronqué dans sa portion amino-terminale est limité aux cellules hématopoïétiques de la lignée érythroïde, alors qu'une seconde amputation de son extrémité carboxy-terminale rend ce gène capable de transformer les fibroblastes (Beug et al. 1986, Gamett et al. 1986).

Un mécanisme similaire semble responsable de l'activation du gène c-kit, qui code lui aussi pour une protéine tyrosine-kinase présentant des homologues structurales avec un récepteur transmembranaire, mais dont le ligand n'a pas encore été identifié (Yarden et al. 1987, Qiu et al. 1988). La version oncogénique de ce gène (v-kit, du virus sarcomatogène félin HZ4) est en effet délétée de son domaine extracellulaire (contenant la région putative de fixation du ligand) et de sa portion carboxy-terminale (Besmer et al. 1986). Il est intéressant de constater que cette portion carboxy-terminale contient elle aussi une tyrosine (Tyr 936) qui constitue un site de phosphorylation potentiel.

- activation par fusion avec des séquences "exogènes"

L'activation de certains proto-oncogènes codant pour des protéines kinases peut également résulter de la fusion de ces gènes avec d'autres gènes cellulaires ou avec des gènes de structure rétroviraux. Cette fusion aboutit à la synthèse d'une protéine kinase hybride.

Ainsi par exemple le gène c-fps peut être activé par fusion avec les séquences rétrovirales gag. En effet, alors que l'insertion du gène c-fps sous un promoteur viral (LTR) aboutit à la synthèse d'une protéine c-fps dépourvue d'activité transformante, la substitution du gène v-fps par le gène c-fps au sein du virus aviaire Fujinami (où il code pour une protéine de fusion gag-v-fps) aboutit à la synthèse d'une protéine de fusion gag-c-fps transformante (Foster et al. 1985).

Le gène c-met, qui code pour une protéine tyrosine-kinase de structure homologue à un récepteur transmembranaire (Park et al. 1987, Gonzatti-Haces et al. 1988), peut être activé par fusion avec d'autres séquences cellulaires. En effet, l'oncogène met résulte de la fusion des séquences du chromosome 1 (séquences TPR) avec le domaine kinase des séquences met du chromosome 7 (Park et al. 1986, Chan et al. 1987), ce qui aboutit à la synthèse d'une protéine hybride TPR-met possédant une activité tyrosine-kinase (Gonzatti-Haces et al. 1988).

De même, l'oncogène trk, isolé d'un carcinome du colon ascendant (Pulciani et al. 1982) code pour une protéine tyrosine-kinase hybride (Mitra et al. 1987) associant des séquences de la tropomyosine non musculaire avec les domaines transmembranaire et cytoplasmique (catalytique) d'une protéine présentant des homologues structurales avec une protéine kinase transmembranaire (Martin-Zanca et al. 1986). L'activation de ce récepteur putatif peut également s'effectuer par recombinaison au même site avec des séquences cellulaires autre que la tropomyosine (Kozma et al. 1988).

Il semble que des séquences exogènes jouent également un rôle important dans l'activation du potentiel oncogène du gène c-abl. Ceci est suggéré par deux observations. D'une part, l'oncogène v-abl qui résulte de la transduction du gène c-abl, est exprimé au sein du virus leucémogène murin A-MuLV sous forme d'une protéine de fusion gag-abl. Mais, alors que cette protéine transforme les fibroblastes et les cellules lymphoïdes *in vitro*, la délétion des séquences gag abolit la transformation des cellules lymphoïdes (Prywes et al. 1983). Les séquences gag se révèlent donc nécessaires pour la transformation des cellules lymphoïdes par le virus A-MuLV ; elles interviennent notamment dans la stabilisation de la protéine de fusion gag-abl (Prywes et al. 1985b). D'autre part, dans la plupart des leucémies myéloïdes chroniques (CML) chez l'homme, le gène c-abl est transloqué du chromosome 9 au chromosome 22 (Heisterkamp et al. 1983, Groffen et al. 1984). Cette translocation, qui fusionne des séquences bcr du chromosome 22 aux séquences c-abl du chromosome 9 (Ben-Neriah et al. 1986), aboutit à la synthèse d'une protéine de fusion bcr-abl qui se révèle transformante sur les cellules hématopoïétiques immatures (McLaughlin et al. 1987). Lors de la transduction comme lors de la translocation, l'extrémité amino-terminale de la protéine c-abl a été substituée respectivement par les séquences gag et bcr. Les protéines de fusion gag-abl et bcr-abl manifestent une activité tyrosine-kinase élevée *in vitro* et sont également phosphorylées sur des résidus tyrosine *in vivo* (Witte et al. 1980, Sefton et al. 1981, Konopka et al. 1984, Davis et al. 1985), alors que, dans les mêmes conditions, l'activité tyrosine-kinase de la protéine c-abl n'est pas détectable *in vitro* et cette protéine n'est pas phosphorylée sur des résidus tyrosine *in vivo* (Ponticelli et al. 1982, Konopka et al. 1984).

Les diverses altérations évoquées ci-dessus peuvent déréguler l'activité enzymatique de la protéine kinase en lui permettant par exemple de fonctionner indépendamment de son ligand ou en supprimant des régions de régulation négative ; elles pourraient également modifier la localisation sub-cellulaire de la protéine ou lui permettre d'interagir avec des substrats particuliers dont la phosphorylation imprévue peut perturber les fonctions cellulaires normales.

2) Activation par surexpression du produit du gène.

Les gènes codant pour des protéines kinases ne sont pas seulement activés par modification de leur séquence, mais peuvent acquérir des propriétés oncogènes lorsqu'ils sont surexprimés.

Ainsi par exemple, le gène humain c-erbB2/neu se révèle transformant sur les cellules NIH3T3 lorsqu'il est placé sous contrôle d'un promoteur fort (LTR) (Di Fiore et al. 1987b). Les gènes c-erbB et c-fms possèdent également des propriétés transformantes lorsqu'ils sont surexprimés, cependant, leur pouvoir transformant nécessite la présence de leur ligand (EGF et CSF-1) (Di Fiore et al. 1987a, Roussel et al. 1987, Velu et al. 1987).

Ces résultats suggèrent que la surexpression des gènes c-erbB et c-erbB2/neu observée dans certains cancers humains, contribue à la croissance néoplasique (Liebermann et al. 1985, Semba et al. 1985, Kraus et al. 1987, Varley et al. 1987).

Les PKC (PKC β et PKC-I) s'avèrent également capables de perturber la croissance des cellules NIH3T3 lorsqu'elles sont surexprimées (sous contrôle d'un LTR), mimant ainsi l'effet des promoteurs tumoraux (Housey et al. 1988, Persons et al. 1988).

Il est intéressant de constater que la majeure partie des protéines kinases oncogènes isolées jusqu'à présent sont des protéines tyrosine-kinases. On peut imaginer diverses hypothèses pour expliquer ce fait. Par exemple que les protéines tyrosine-kinases occupent au sein de la cellule des "postes clés", non remplaçables et inévitables ; toute altération de ces protéines aurait donc un effet drastique sur la croissance cellulaire (transformation...). A l'inverse, les protéines sérine/thréonine-kinases occuperaient des "postes accessoires" pouvant être éventuellement contournés ; une altération de ces protéines aurait alors un effet plus subtil pouvant même passer inaperçu si d'autres protéines sérine/thréonine-kinases exercent un effet compensatoire. On peut effectivement signaler en exemple que tous les récepteurs membranaires kinases isolés sont des tyrosine-kinases et occupent un poste fondamental dans la transduction des stimuli externes. On peut aussi imaginer que les protéines sérine/thréonine-kinases possèdent une régulation complexe et nécessitent donc pour leur activation des événements successifs et complexes ou encore que leur dérégulation soit difficile.

D - L'ONCOGENE mil/raf

I) LES VIRUS AYANT TRANSDUIT L'ONCOGENE mil/raf

Quelques 25 oncogènes viraux ont été isolés jusqu'à présent. Parmi ceux-ci, les gènes v-mil et v-raf correspondent en fait au même oncogène trouvé dans deux isolats distincts (Kan et al. 1984a, Suttrave et al. 1984a) :

- le gène v-mil (homologue aviaire de v-raf) isolé à partir du virus leucémogène aviaire MH2 (Mill-Hill 2) (Coll et al. 1983, Jansen et al. 1983, Kan et al. 1983) ;
- le gène v-raf (homologue murin de v-mil) isolé à partir du virus sarcomatogène murin 3611 MSV (Rapp et al. 1983a).

Ces deux virus, qui appartiennent au groupe des rétrovirus défectifs, ont transduit le même gène cellulaire commun aux deux espèces (Jansen et al. 1984a, Kan et al. 1984a). Ce gène sera par la suite appelé mil/raf.

A Pathologie des virus 3611 MSV et MH2

1) Le virus 3611 MSV

Le virus 3611 MSV a été isolé par induction à la iododéoxyuridine de cellules de souris transformées par le méthylcholanthrène (Rapp et al. 1983b). Ce virus transforme les fibroblastes et les cellules épithéliales murines en culture et induit chez les souris des fibrosarcomes et des leucémies érythroïdes avec une période de latence de 4 à 8 semaines (Keski-Oja et al. 1982, Rapp et al. 1983a,b).

2) Le virus MH2

Ce virus a été isolé à partir d'une tumeur ovarienne spontanée de poulet (Begg 1927). *In vitro* MH2 transforme les fibroblastes, les macrophages, les chondroblastes et les cellules de neurorétine aviaires (Beug et al. 1979, Gazzolo et al. 1979, Alema et al. 1985, Béchade et al. 1985). *In vivo* MH2 induit des carcinomes du foie et du rein, des leucémies myéloïdes, des sarcomes et des endothéliomes (Graf et Beug 1978, Alexander et al. 1979, Beard et al. 1980).

B Structure et mode d'expression des virus 3611 MSV et MH2

1) Le virus 3611 MSV

3611 MSV est le résultat d'une recombinaison entre un virus murin compétent (MuLV) et le gène cellulaire c-mil/raf de souris (c-raf) (Rapp et al. 1983a). L'insertion de l'oncogène v-raf (1159 nucléotides) a abouti à une amputation partielle des gènes gag et pol, mais a laissé intact le gène env (Rapp et al. 1983a, Mark et al. 1984). La structure du génome (Figure 6) est donc :

5' Δgag (p15 p12 Δp30)-v-raf-Δpol-env 3'

Les homologies de séquence observées entre le gène c-raf et le virus leucémogène murin souche Moloney (Mo-MuLV) au point de recombinaison, suggèrent que l'acquisition de l'oncogène v-raf résulte d'une recombinaison homologue (Bonner et al. 1985).

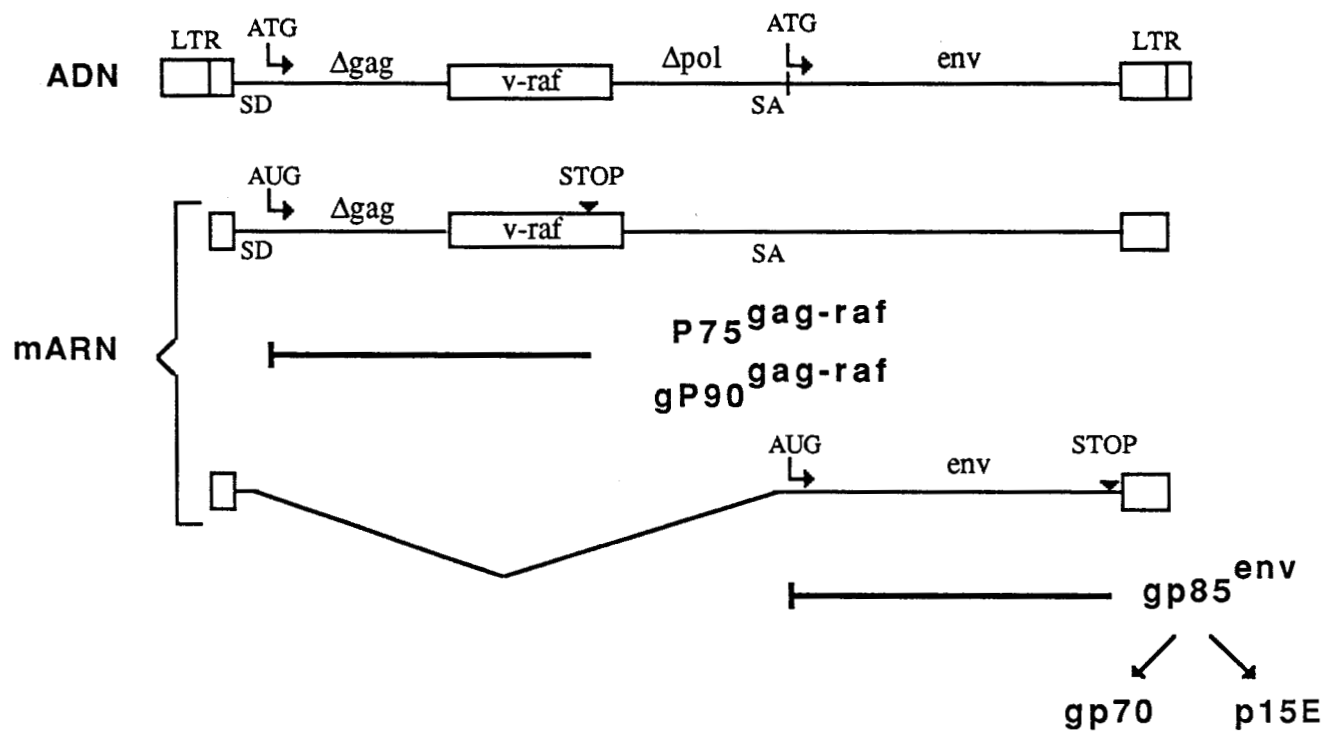
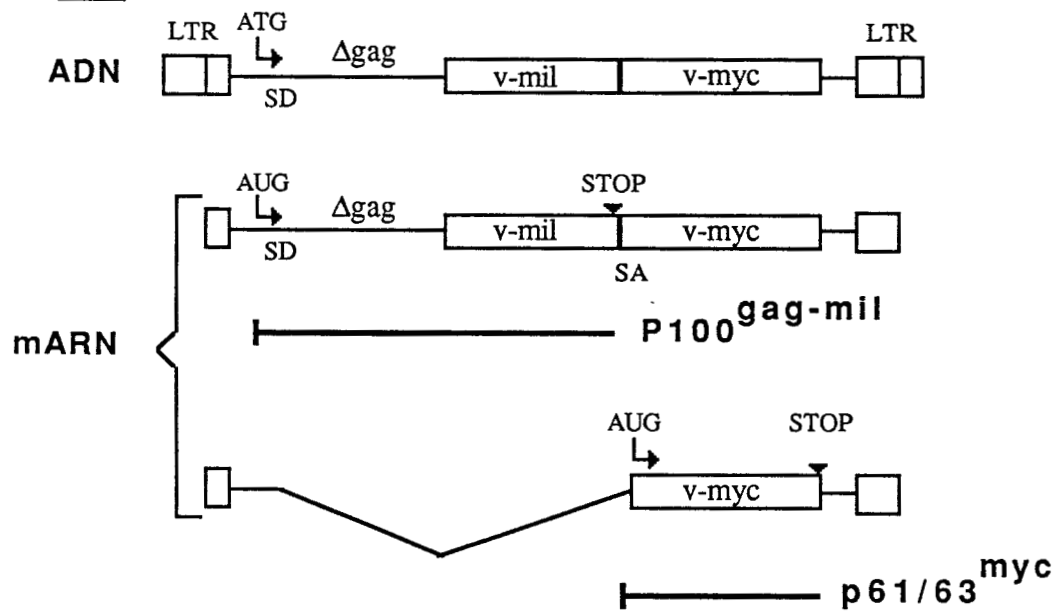
3611 MSV**MH2**

Figure 6 : Structure et mode d'expression des virus 3611 MSV et MH2

Le produit de l'oncogène v-raf est traduit à partir d'un ARN génomique de 6.9 Kb sous forme de deux protéines de fusion Δ gag-raf de 90 Kd et 75 Kd (gP90gag-raf et P75gag-raf) (Rapp et al. 1983b). Les protéines d'enveloppe (gp85^{env}, gp70 et p15E) sont traduites à partir d'un ARN sous-génomique env de 3 Kb, résultant d'un mécanisme d'épissage de l'ARN viral (RNA Tumor Viruses 1982).

2) Le virus aviaire MH2

Le virus MH2 a transduit au sein de son génome deux séquences distinctes d'origine cellulaire, v-mil et v-myc (Coll et al. 1983, Jansen et al. 1983, Kan et al. 1983). L'acquisition des séquences v-mil (1154 nucléotides) et v-myc (1310 nucléotides) s'est effectuée au détriment des gènes pol et env et d'une partie du gène gag (Galibert et al. 1984, Kan et al. 1984b, Sutrave et al. 1984a). La structure du génome du virus MH2 (Figure 6) est donc :

5' Δ gag (p19 p10 p27 Δ p12)-v-mil-v-myc-"c" 3'

"c" représente des séquences non codantes situées en amont du LTR 3' (Sutrave et al. 1984b) qui contiennent probablement des signaux d'encapsidation (Sorge et al. 1983).

L'oncogène v-mil code pour une partie de la protéine de fusion Δ gag-mil de 100 Kd (P100gag-mil) traduite à partir de l'ARN génomique de 5.5 Kb (Hu et al. 1978).

L'oncogène v-myc code pour une protéine de 61/63 Kd (p61/63^{v-myc}) traduite à partir d'un ARN sous génomique de 2.8 Kb provenant de l'épissage de l'ARN génomique (Pachl et al. 1983, Saule et al. 1983). Cet oncogène est présent également dans les virus aviaires MC29, OK10 et CMII (Roussel et al. 1979).

II) LE LOCUS c-mil/raf

Les oncogènes v-mil et v-raf ont été transduits par les virus MH2 et 3611 MSV à partir d'un proto-oncogène homologue : le gène cellulaire mil/raf de poulet (c-mil) pour v-mil et le gène cellulaire mil/raf de souris (c-raf) pour v-raf. Le gène mil/raf, phylogénétiquement stable, possède une structure similaire chez l'homme (c-raf1), la souris et le poulet. Chez l'homme, il existe en plus du gène fonctionnel c-raf1 un pseudogène c-raf2.

A Localisation chromosomique

Chez l'homme, le gène c-raf1 a été localisé sur le chromosome 3 dans la bande p25 (Bonner et al. 1984). Cette région chromosomique 3p est altérée dans plusieurs types de tumeurs tels que des carcinomes du poumon à petites cellules (délétion interstitielle 3p14-3pter), des tumeurs des glandes parotides mixtes (translocation t(3;8)(p25;q21)), dans des carcinomes ovariens (inversion 3p13p25) et dans des carcinomes rénaux (t(3,8)(p14.2,q24.1) (Bonner et al. 1984, Drabkin et al. 1985). Dans certains cas de carcinomes rénaux notamment, une délétion interstitielle 3p14 ou p21 délocalise le gène c-raf1 de 3p25 en 3p14 ou p21 (Teysier et al. 1986).

Le pseudogène c-raf2 est localisé sur le chromosome 4 en position q27 (Yunis et al. 1987).

Le gène c-raf a été localisé sur le chromosome 6 chez la souris (Kozak et al. 1984) et sur le chromosome X chez la drosophile (Mark et al. 1987). Chez le poulet, il est difficile de localiser précisément un gène ; en effet, le caryotype classe les chromosomes en deux populations : une population restreinte constituée des chromosomes de grande taille et une population importante de chromosomes de petite taille indistinguables entre eux (microchromosomes). Le gène c-mil est présent dans la population de microchromosomes (Symonds et al. 1986).

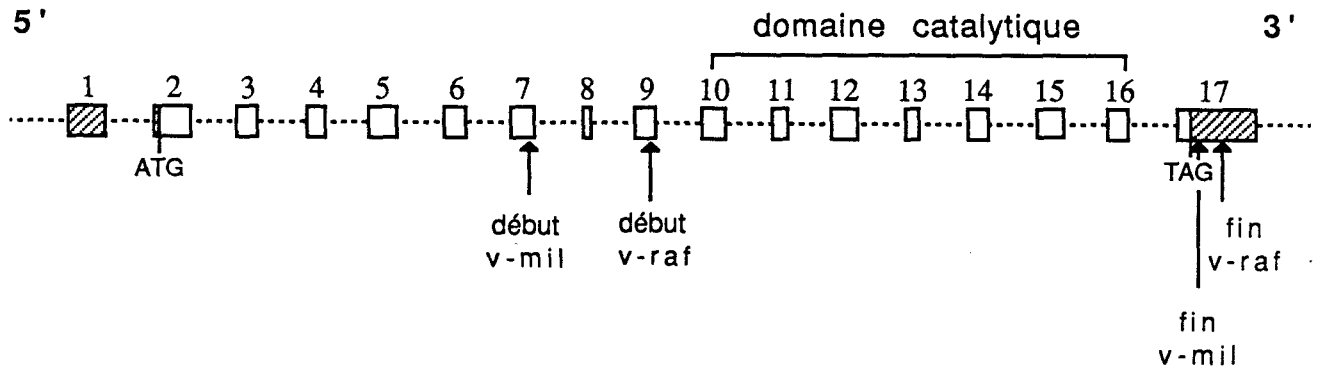
B Structure du gène c-mil/raf

Le gène c-raf, dont la structure est très semblable chez l'homme et le rat, est constitué de 17 exons dont 16 codants (Mölders et al. 1985, Bonner et al. 1986) (Figure 7). Les ADNc correspondants ont été isolés et leurs séquences révèlent un cadre de lecture ouvert qui s'étend sur 648 acides aminés avec 98 % des résidus conservés entre le rat et l'homme (chez le rat, 11 acides aminés diffèrent par rapport à l'humain) (Bonner et al. 1986, Ishikawa et al. 1987a) (Figure 8). L'homologie avec v-mil et v-raf débute respectivement à la fin de l'exon 7 et 9 et se termine dans l'exon 17, en aval du codon de terminaison de la protéine cellulaire (Figure 7). Ainsi v-raf résulte de la transduction de la portion carboxy-terminale du gène c-raf (les 8 derniers exons). La comparaison des séquences v-raf et c-raf homologues révèle 7 acides aminés de différence dans ces régions (Ishikawa et al. 1987a) (Figure 8).

En plus du gène fonctionnel c-raf1, il existe chez l'homme un pseudogène c-raf2 non exprimé dans les cellules humaines. Ce pseudogène, dépourvu d'intron et dont les trois cadres de lecture sont fermés, présente, dans la partie homologue à v-mil (seule partie séquencée), 80 % d'homologie avec le gène c-raf1 au niveau de sa séquence nucléotidique (Bonner et al. 1985).

Chez le poulet une partie du gène c-mil, celle homologue à v-mil, a été clonée (Jansen et al. 1984b, Flordellis et al. 1985). Cette partie du gène, qui s'étend sur plus de 14 Kbp d'ADN génomique, contient 11 exons homologues à v-mil dont la séquence révèle une forte homologie avec les exons 7 à 17 du gène c-raf1 humain (Jansen et Bister 1985). Les séquences v-mil et c-mil homologues diffèrent par 5 acides aminés (Galibert et al. 1984, Jansen et Bister 1985) (Figure 8). Un ADNc du gène c-mil a été isolé et séquencé (Koenen et al. 1988). Cet ADNc peut coder pour une protéine de 647 acides aminés, dont 95% des résidus sont conservés par rapport à l'homme (35 acides aminés de différence) (Figure 8). La structure du locus c-mil sera détaillée dans les résultats.

Un gène homologue au gène c-raf1 a également été identifié dans le génome de la drosophile (Draf1), des nématodes et des levures (Ishikawa et al. 1987b, Mark et al. 1987). Chez la drosophile, ce gène est organisé en trois exons, et sa séquence prédit une protéine de 666 acides aminés dont la partie carboxy-terminale présente 65 % d'homologie avec le domaine kinase de la protéine c-raf1 (Mark et al. 1987, Nishida et al. 1988).



- exons codants
- ▨ exons non codants
- introns

Figure 7 : Structure du gène c-mil/raf

C Expression du gène c-mil/raf

Les gènes c-mil/raf sont exprimés sous forme d'ARN à 3.6 Kb chez l'homme, à 3.5 Kb chez la souris et à 4.0 Kb chez le poulet (Coll et al. 1983, Mölders et al. 1985)(voir résultats).

Chez la souris le gène c-raf est exprimé à un taux élevé dans le coeur, le poumon, l'épididyme, le cerveau et l'intestin et à un taux plus faible dans la rate, le foie et le placenta. L'étude de l'expression du gène c-raf lors du développement embryonnaire montre que ce gène est exprimé à un taux élevé dans l'embryon de 14 jours et à un taux plus faible dans l'embryon de 18 jours (Huleihel et al. 1986).

c-raf semble également participer aux événements précoces du développement chez la drosophile. En effet, les transcrits Draf1 (3.2 Kb) prédominent durant le développement embryonnaire précoce : l'accumulation d'ARN Draf1 est 10 fois plus élevée dans le stade préblastoderme (ARN maternel) que dans les stades blastoderme et larvaire (Mark et al. 1987, Nishida et al. 1988). L'analyse de mutants défectifs dans le gène Draf1 révèle également une possible implication de ce gène dans la prolifération cellulaire (Nishida et al. 1988).

Le gène c-raf1 chez l'homme est exprimé dans les cellules hématopoïétiques et la plupart des tissus. Une expression accrue de ce gène est également observée dans des carcinomes du poumon à petite cellule (Graziano et al. 1987, Sariban et al. 1987).

Ainsi, l'expression du gène c-raf dans la plupart des tissus suggère que ce gène pourrait assumer des fonctions importantes et nécessaires à la plupart des cellules.

III) LES PROTEINES mil/raf (virales et cellulaires)

L'oncogène v-raf s'exprime sous forme de deux protéines de fusion Δ gag-raf de 75 et 90 Kd : P75gag-raf et gP90gag-raf (Rapp et al. 1983a). Ces deux formes sont dues à des modifications post-traductionnelles (Schultz et al. 1985a) similaires à celles observées pour les protéines gag P65 et gP80 du virus leucémogène murin MuLV où gP80^{gag} correspond à une forme glycosylée de P65^{gag} (Edwards et Fan 1980, Schultz et al. 1981).

En effet, comme gP80^{gag}, gP90^{gag-raf} est une glycoprotéine qui posséderait deux sites de glycosylation : l'un dans le gène gag (p15), l'autre dans v-raf (résidu 294) (Mark et Rapp 1984). Dans des cellules transformées par le virus 3611 MSV, l'expression de gP90^{gag-raf} est perdue au cours des cultures. Cette protéine ne serait donc pas nécessaire au maintien du phénotype transformé en culture (Schultz et al. 1985a).

De même, comme la P65^{gag} de MuLV (Schultz et Oroszlan 1983), P75gag-raf est myristilée dans sa portion amino-terminale (Schultz et al. 1985a). Cette modification post-traductionnelle, qui porte sur le résidu glycolle N terminal du gène gag, existe également dans la protéine p60^{v-src} (Schultz et al. 1985b) et lui permet de s'associer à la membrane plasmique, cette association étant indispensable à la transformation cellulaire (Cross et al. 1984). Cependant, puisque le gène c-raf de souris LTR activé transforme les NIH3T3 bien qu'il code pour une protéine dépourvue des séquences gag et non myristilée (Mölders et al. 1985, Schultz et al. 1988), il est vraisemblable que les séquences gag et la myristilation ne soient pas importantes pour l'activité transformante du gène v-raf. La P75gag-raf est également phosphorylée *in vivo* sur

des résidus sérine et thréonine (Rapp et al. 1983b).

Le gène v-mil, qui présente 94 % d'homologie avec v-raf dans sa séquence en acides aminés, code quant à lui pour les 379 acides aminés carboxy-terminaux de la protéine de fusion P100gag-mil (Galibert et al. 1984, Kan et al. 1984b, Sutrave et al. 1984a). Cette protéine, phosphorylée sur des résidus sérine et thréonine *in vivo* (Denhez et al. 1988), est localisée dans le cytoplasme des cellules infectées par MH2 (Bunte et al. 1983).

Les protéines virales P100gag-mil et P75gag-raf sont capables de s'autophosphoryler sur des résidus sérine et thréonine, dans un test kinase *in vitro* (Moelling et al. 1984, Denhez et al. 1988).

Les produits des gènes c-mil/raf ont été identifiés comme étant des phosphoprotéines de 71/73 Kd chez l'homme (p71/73c-raf1) et chez le poulet (p71/73c-mil) et de 74 Kd chez le rat et la souris (p74c-raf) (Patchinsky et al. 1986b, Schultz et al. 1988). Leurs séquences, déduites des séquences nucléotidiques des ADNc, révèlent que ces protéines sont très homologues entre elles et sont vraisemblablement des protéines solubles cytoplasmiques (Bonner et al. 1986, Ishikawa et al. 1987a, Koenen et al. 1988) (Figure 8). Chez le rat, p74 c-raf a été localisée dans la fraction cytoplasmique des cellules (Mölders et al. 1985).

Qu'elles soient d'origine virale ou cellulaire, les protéines mil/raf possèdent des caractéristiques communes dans leur portion carboxy-terminale. En effet, elles possèdent de fortes homologies de séquence avec le domaine catalytique des protéines possédant une activité kinase (Hunter 1987) (Figures 3 et 8). On retrouve notamment la séquence GlyXGlyXXGlyX₁₃Lys où la lysine est impliquée dans la fixation de l'ATP (Denhez et al. 1988). En effet, lorsque cette lysine est mutée en méthionine dans la P100gag-mil, l'autophosphorylation de cette protéine *in vitro* est abolie. On retrouve également d'autres séquences très conservées notamment les séquences DFG (Asp-Phe-Gly), APE (Ala-Pro-Glu) et HRD-X₄-N (His-Arg-Asp-X₄-Asn) où l'asparagine, présente dans toutes les protéines kinases isolées, semble jouer un rôle important dans l'activité kinase de la P100gag-mil puisque lorsque cette asparagine est mutée en sérine, l'autophosphorylation de cette protéine *in vitro* est considérablement réduite (Denhez et al. soumis).

Par ces homologies de séquence, les portions carboxy-terminales des protéines mil/raf sont donc définies comme le domaine kinase de ces protéines (Figure 9).

Les portions amino-terminales des protéines cellulaires mil/raf contiennent une séquence riche en cystéine dont la structure Cys-X₂-Cys-X₉-Cys-X₂-Cys-X₇-Cys-X₇-Cys (Figure 8) est analogue aux deux séquences Cys-X₂-Cys-X₁₃-Cys-X₂-Cys-X₇-Cys-X₇-Cys trouvées dans les régions amino-terminales (domaine régulateur) des PKC (Coussens et al. 1986a, Knopf et al. 1986, Parker et al. 1986). Des régions riches en cystéine et de structure apparentée sont également présentes dans certains facteurs de transcription (Miller et al. 1985), ainsi que dans certaines protéines possédant la capacité de se lier à l'ADN (Berg 1986). Ces séquences formeraient une

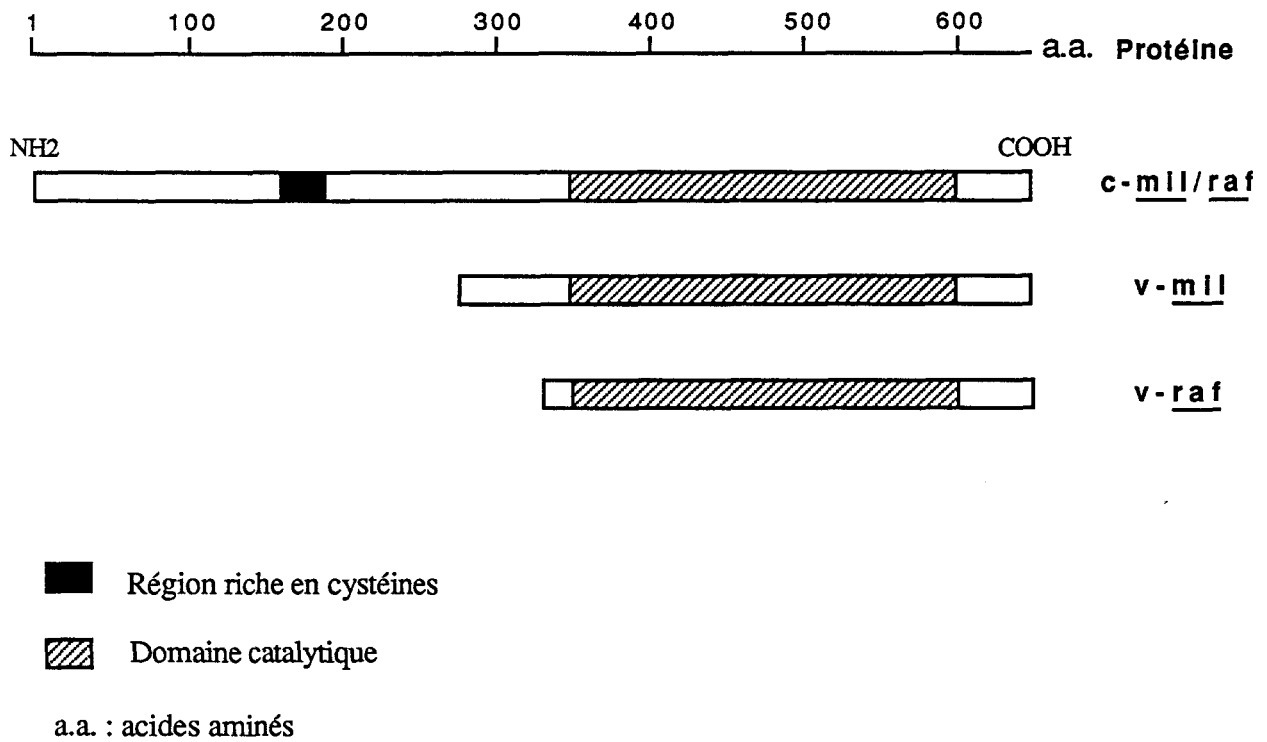


Figure 9 : topographie des protéines mil/raf

structure en "doigt" impliquée dans la chélation d'ions métalliques et permettant la fixation de la protéine sur l'ADN (revue de Evans et Hollenberg 1987).

IV) LE GENE *mil/raf* ET LA TRANSFORMATION CELLULAIRE

Le pouvoir transformant d'un gène présent au sein d'un rétrovirus peut être détecté *in vivo* par la formation de tumeurs après inoculation de ce virus chez l'animal, ou *in vitro* sur des cellules en culture. Dans ce cas la transformation des cellules est détectée par des modifications dans leur morphologie, leur croissance, leur métabolisme.

A Rôle de v-*mil* sur les cellules aviaires

1) Les fibroblastes

Le virus MH2 transforme les fibroblastes embryonnaires de poulet (CEF) et de caille (QEF) en culture. La transformation de ces cellules est caractérisée par un changement morphologique des cellules, des perturbations du cytosquelette (telles que la désorganisation des câbles d'actine, la réduction de la fibronectine), l'excrétion de protéases (tel l'activateur du plasminogène), un taux de croissance plus élevé, et par la capacité de croître en milieu semi-solide (agar ou méthylcellulose) (Palmieri et al. 1983).

Des mutants de MH2, spontanés ou fabriqués *in vitro*, délétés dans l'un ou l'autre des gènes v-*mil* et v-*myc* (Béchade et al. 1985, Jansen et al 1985, Zhou et al. 1985) montrent que, selon les critères d'apparition de foyers de cellules transformées ayant la capacité de croître en agar, le gène v-*myc* (mutants *mil*-*myc*⁺) transforme les fibroblastes aviaires, alors que le gène v-*mil* (mutants *mil*⁺*myc*⁻) ne transforme pas ces cellules. La morphologie des QEF transformés par les mutants *mil*-*myc*⁺ diffère cependant de celle des cellules transformées par MH2, et ressemble à la morphologie des cellules transformées par des virus ne possédant que le gène v-*myc* (type MC29) (Jansen et al. 1985, Zhou et al. 1985).

Le gène v-*mil* n'apparaît donc pas nécessaire dans le pouvoir transformant du virus MH2 *in vitro*, ceci expliquerait la fréquente délétion de ce gène observée dans des mutants MH2, obtenus lors de la propagation du virus MH2 sur QEF (Biegelke et Linial 1987, Martin et al. 1986b).

Si, selon certains critères, le gène v-*mil* ne semble pas transformant sur fibroblastes aviaires, il est toutefois capable de conférer à ces cellules un phénotype transformé partiel (Palmieri et Vögel 1987, Béchade et al. 1988). En effet, des CEF infectés par un mutant spontané *mil*⁺*myc*⁻ (MH2- PA200) (Martin et al. 1986a) manifestent des caractères de cellules transformées tels que la désorganisation des câbles d'actine, la réduction de la quantité de fibronectine, l'excrétion de la protéase activateur du plasminogène, et une exigence en sérum réduite pour la multiplication des cellules. De plus, ces cellules sont sarcomatogènes chez le poussin et provoquent au site d'injection des tumeurs conduisant à la mort de l'animal. Ainsi, v-*mil* est capable d'induire sur les CEF des modifications morphologiques, structurales et métaboliques, similaires à celles induites par les autres rétrovirus aviaires transformants (Royer-Pokora et al. 1978, Palmieri et al. 1983).

Dans certains systèmes cellulaires (décrits ci-dessous), v-mil coopère avec v-myc dans l'effet biologique observé en réponse à l'infection par le virus MH2.

3) Les cellules hématopoïétiques

MH2 ainsi que les virus MC29, OK10 et CMII (ne contenant que l'oncogène v-myc) transforment les cellules hématopoïétiques de moelle osseuse ou de sac vitellin de poulet *in vitro*. Les cellules transformées appartiennent à la lignée myéloïde et manifestent des caractéristiques de macrophages : elles possèdent des récepteurs pour la partie Fc des immunoglobulines G et pour la protéine C3 du complément, des antigènes de surface spécifiques des macrophages, et sont capables de phagocytose immunitaire (Beug et al. 1979, Gazzolo et al. 1979).

Cependant, comme les macrophages normaux, les macrophages transformés par les rétrovirus ne possédant que l'oncogène v-myc nécessitent pour leur prolifération *in vitro* la présence dans le milieu de culture d'un facteur de croissance spécifique des cellules myéloïdes : le cMGF (chicken myelomonocytic growth factor) (Adkins et al. 1984, Leutz et al. 1984) ; alors que les macrophages transformés par MH2 prolifèrent en absence de cMGF (Graf et al. 1986).

L'analyse de mutants MH2 délétés dans les gènes v-mil ou v-myc montrent que v-mil ne transforme pas les macrophages mais induit la production d'un facteur de croissance de type cMGF par les macrophages transformés par v-myc ; ce qui permet leur croissance autocrine (Graf et al. 1986). En effet, le milieu conditionné par ces macrophages contient une activité de stimulation de croissance similaire au cMGF et cette activité est inhibée quand le milieu conditionné est additionné d'un sérum anti cMGF (Graf et al. 1986).

Ainsi, dans ce système cellulaire un effet coopératif des oncogènes v-mil et v-myc aboutit à un système de croissance autocrine dans lequel v-myc transforme les macrophages et v-mil induit la production de cMGF.

L'induction de la production de cMGF nécessite l'expression continue d'un produit v-mil fonctionnel comme l'indique les expériences réalisées avec un mutant MH2 portant une mutation thermosensible dans v-mil : à température non permissive (42°C) les macrophages transformés par ce mutant deviennent dépendants de cMGF pour leur croissance (Von Weizsacker et al. 1986).

L'effet biologique de v-mil dans ce système nécessite également l'intégrité du site de fixation de l'ATP et semble donc être sous le contrôle de son activité kinase. En effet, les macrophages transformés par un mutant MH2 dont la P100gag-mil a été rendue incapable de fixer l'ATP, requièrent l'apport de cMGF pour leur prolifération (Denhez et al. 1988). D'autres oncogènes de la famille src tels que v-fps, v-erbB et v-yes, sont également capables d'abolir l'exigence en cMGF des macrophages transformés par v-myc (Adkins et al. 1984).

3) Les cellules de neurorétine

Un effet propre au gène v-mil a également pu être mis en évidence sur les cellules de neurorétine aviaires (NR). Ces cellules sont obtenues par la dissociation des neurorétines d'embryon de poulet (CNR) ou de caille (QNR) de 7 jours et sont constituées de cellules neuronales, de cellules gliales, et des précurseurs de celles-ci (Okada et al. 1979, Crisanti-Combes

et al. 1982, Lemon 1985). Après leur mise en culture, les NR n'effectuent qu'un ou deux cycles de division cellulaire avant de cesser de proliférer. Les NR quiescentes peuvent être maintenues en culture pendant plusieurs semaines (Pessac et Calothy 1974).

Le virus MH2 est capable de faire proliférer et de transformer les CNR en culture alors que les virus ne contenant que l'oncogène *v-myc* (type MC29) modifient la morphologie de ces cellules sans induire leur prolifération (Coll et al. soumis, voir article 3). Des mutants de MH2 dépourvus du gène *v-mil* ou du gène *v-myc* montrent que *v-mil* induit la prolifération des CNR mais ces cellules n'apparaissent que partiellement transformées, alors que *v-myc* est sans effet sur la croissance de ces cellules (Bechade et al. 1985, 1988). Ainsi la prolifération et la transformation des CNR par le virus MH2 nécessite la coopération des deux oncogènes *v-mil* et *v-myc*.

Des résultats apparemment contradictoires ont été obtenus par l'équipe de Tato qui a montré que le gène *v-myc* est capable de faire proliférer et de transformer les CNR en culture. Cette contradiction est due au fait que les conditions de culture sont différentes : milieu riche en sérum, culture des cellules sur support de collagène, ce qui permettrait de suppléer *v-mil*. Dans ces conditions, des CNR normales peuvent même effectuer jusqu'à 15 à 20 cycles de division cellulaire (Casalbore et al. 1987).

Les résultats obtenus avec le gène *v-myc* sont également différents selon l'espèce considérée. En effet, contrairement à l'effet obtenu sur CNR, le gène *v-myc* est capable de faire proliférer et de transformer les QNR et ce, indépendamment des conditions de culture. Dans ce système cellulaire, l'effet biologique du gène *v-mil* est identique à celui observé sur CNR (Béchade et al. 1985, Martin et al. 1986a).

L'effet mitogène du produit du gène *v-mil* sur les cellules de neurorétine aviaires nécessite l'intégrité du site de fixation de l'ATP et ainsi semble sous le contrôle de son activité kinase. En effet, un mutant MH2 dont le produit du gène *v-mil* ne peut plus s'autophosphoryler *in vitro* (par mutation du site de fixation de l'ATP) n'induit plus la prolifération des CNR (Denhez et al. 1988).

La nature de la cellule cible touchée par le produit du gène *v-mil* n'est pas décelable morphologiquement, cependant, environ 25% des cellules de neurorétine induites à proliférer par *v-mil* synthétisent des neurofilaments (spécifiques des cellules neuronales) alors que ce nombre est quasiment nul dans une culture normale (P. Amouyel, en préparation). L'effet particulier du gène *v-mil* sur la croissance des cellules de neurorétine n'est pas restreint à ce seul tissu mais semble s'exercer sur d'autres types de cellules nerveuses telles que les cellules de crête et de tube neural d'embryon de poulet de 48 heures (S. Saule, communication personnelle).

Dans ce système cellulaire, on constate que *v-mil* induit la prolifération des CNR mais que le même effet est obtenu par *v-myc* lorsque ces cellules sont placées dans un milieu de culture riche. Il semblerait donc que ces cellules exigent un ou des facteurs de croissance qui font défaut dans nos conditions de culture mais que *v-mil* pourrait suppléer. Le produit de l'oncogène *v-mil* pourrait : soit induire les cellules de neurorétine à sécréter leur propre facteur de croissance comme cela est observé dans le système hématopoïétique ; soit relever ces cellules de leur dépendance vis à vis de ce facteur en mimant son effet biochimique. Mais ils se pourrait également que *v-mil* induise

la prolifération et la différenciation d'un type cellulaire peu exigeant en facteur de croissance.

4) Les chondroblastes

Lors du développement des chondroblastes normaux, prolifération et différenciation sont liées ; les cellules qui se différencient synthétisent des produits spécifiques tels que le collagène de type II et le protéoglycane sulfaté de type IV (considérés comme des marqueurs de différenciation terminale). La synthèse de ces produits cellulaires n'est pas incompatible avec la prolifération, bien que celle-ci décroisse lorsque la matrice extra cellulaire collagène - protéoglycane s'accumule.

La transformation des chondroblastes affecte la prolifération et la différenciation cellulaire : cela se traduit par une augmentation du taux de prolifération cellulaire ainsi que par une suppression de la synthèse du glycogène de type II et du protéoglycane sulfaté de type IV (Pacifi et al. 1977). Certains oncogènes n'agissent que sur l'un des deux paramètres, ainsi *v-src* inhibe le processus de différenciation (Adams et al. 1982, Gionti et al. 1983) alors que *v-myc* (MC29) augmente la prolifération cellulaire sans affecter la différenciation des chondroblastes (Alema et al. 1985). Cependant, contrairement à MC29, MH2 augmente la prolifération cellulaire et inhibe la synthèse des marqueurs de différenciation terminale (Alema al.1985). Ainsi *v-myc*, agirait sur la prolifération cellulaire alors que *v-mil* agirait comme *v-src* sur la différenciation cellulaire. On observerait donc également dans ce modèle une coopération des gènes *v-mil* et *v-myc*.

B Rôle de *v-mil* dans la tumorigénicité du virus MH2 *in vivo*

In vivo les rétrovirus MH2 et MC29 présentent des différences dans leur pouvoir tumorigène chez la caille : 75% des animaux inoculés avec le virus MH2 développent des tumeurs conduisant à la mort de l'animal après un délai de 2 semaines, alors que le virus MC29 induit des tumeurs chez 7% des animaux inoculés (Linial et al. 1982). Cette observation laissait supposer un rôle du gène *v-mil* dans l'oncogénicité du virus MH2.

Cette hypothèse a été étayée par l'étude de la tumorigénicité du virus MH2 et des mutants *mil-myc*⁺ et *mil*⁺*myc*⁻ chez des poulets d'une semaine. Alors que les mutants *mil*⁺*myc*⁻ n'induisent ni tumeurs ni leucémies, les mutants *mil*⁻*myc*⁺ induisent des leucémies monocytaires et des tumeurs du foie avec, cependant, une efficacité considérablement réduite comparée au virus sauvage MH2 (Graf et al. 1986). Ceci signifie que le gène *v-mil* augmente la capacité de *v-myc* d'induire ces néoplasmes *in vivo*.

De plus, des jeunes cailles injectées avec un stock viral de mutant MH2*mil*⁻ contaminé par moins de 10 % de virus sauvage MH2, développent des tumeurs dont la plupart contiennent le provirus MH2. Ainsi, contrairement aux observations effectuées *in vitro*, le gène *v-mil* semble conférer un avantage sélectif au virus MH2 *in vivo* (Biegelke et Linial 1987). Récemment, d'autres auteurs ont montré qu'un virus ne possédant que le gène *v-mil* (virus MH2-PA200) induit des fibrosarcomes chez des poussins d'un jour et ce, chez 60 % des animaux injectés (Béchade et al. 1988).

Ces observations convergent vers la conclusion que les oncogènes v-mil et v-myc coopèrent *in vivo* dans l'oncogénicité du virus MH2.

C Transformation des cellules murines par le gène v-raf

1) Les fibroblastes

L'oncogène v-raf transforme les fibroblastes murins en culture (Rapp et al. 1983b). Les fibroblastes transformés libèrent des peptides associés à la transformation : les TGF α et β (transforming growth factor). Le TGF α , un peptide apparenté à l'EGF et utilisant le même récepteur que l'EGF est également produit par les fibroblastes murins transformés par les oncogènes de la famille src tels que v-fes, v-abl, v-mos (De Larco et Todaro 1978, Twardzik et al. 1982, 1983) ainsi que par l'oncogène v-ki ras (Ozanne et al. 1980).

Contrairement aux oncogènes v-src, v-fms et v-fes, la transformation des fibroblastes de souris NIH3T3 par l'oncogène v-raf est indépendante de la présence de protéines ras actives comme l'indiquent les expériences de Smith et al. (1986). En effet, l'injection d'anticorps neutralisant les protéines ras dans des cellules NIH3T3 transformées par les oncogènes v-src, v-fms et v-fes, codant tous trois pour des protéines tyrosine-kinases membranaires, fait réverter le phénotype transformé de ces cellules et inhibe l'initiation de la phase S. Par contre, les cellules NIH3T3 transformées par les oncogènes v-raf et v-mos codant pour des protéines cytosoliques maintiennent leur phénotype transformé après injection d'anticorps anti-ras.

Ces résultats pourraient être expliqués par le fait que les protéines membranaires v-src, v-fms et v-fes interviendraient en amont des protéines ras dans la transmission du signal mitotique, signal qui serait propagé par cette protéine, alors que les protéines virales raf et mos cytosoliques agiraient en aval des protéines ras et seraient donc indépendantes de celles-ci dans la propagation du signal mitotique. Une autre explication serait que la protéine raf propage son signal par une voie métabolique différente de celle utilisée par les protéines ras.

2) Les cellules hématopoïétiques

v-raf transforme les cellules hématopoïétiques (de moelle osseuse) *in vivo* et *in vitro*. Cependant, les cellules transformées sont dépendantes, pour leur prolifération, d'un facteur de croissance synthétisé par les lymphocytes : l'interleukine 3 (IL3) (Blasi et al. 1985, Rapp et al. 1985b).

Un effet synergique entre les oncogènes v-raf et v-myc a été mis en évidence dans la transformation de ces cellules. En effet, les cellules hématopoïétiques transformées par un virus possédant les oncogènes v-raf et v-myc croissent indépendamment d'IL3. Cette indépendance n'est cependant pas due à une production autocrine d'IL3 (Rapp et al. 1985a, Cleveland et al. 1986).

D Activation du gène c-mil/raf

Deux types de mécanisme conférant un pouvoir transformant au gène c-raf ont été décrits :

- la "LTR activation"
- l'activation par réarrangements génomiques

1) "LTR activation" du gène c-raf

Mölders et al. (1985) ont reporté que le gène c-raf de souris pouvait être "activé" par insertion d'un promoteur viral (LTR) en amont de l'exon 6 (Figure 10).

Cette insertion résulte en l'expression élevée d'un ARN c-raf altéré, initié à partir du promoteur viral. Le taux de transcription du gène c-raf altéré est alors 20 à 30 fois supérieur à celui observé dans des cellules de souris contrôles. Cet ARN c-raf code pour une protéine de 48 Kd (p48^{c-raf}) tronquée dans sa partie amino terminale (Mölders et al. 1985, Schultz et al. 1988).

2) Activation du gène c-raf par réarrangements génomiques

Des versions transformantes du gène c-raf humain et murin ont été décrites après transfection d'ADN tumoral sur les cellules NIH3T3 (Fukui et al. 1985, Shimizu et al. 1985, Ishikawa et al. 1986, Kasid et al. 1987, Stanton et Cooper 1987, Tahira et al. 1987). Dans cette méthode le gène transformant est détecté par la formation de foyers de cellules NIH3T3 morphologiquement transformées (Shih et al. 1979). Le gène transformant est ensuite isolé à partir de l'ADN des cellules NIH3T3 transformées, et caractérisé.

La caractérisation des gènes c-raf activés montre dans tous les cas un réarrangement du gène c-raf se produisant dans la région intronique située entre les exons 7 et 8 (Fukui et al. 1987, Ishikawa et al. 1987a, Stanton et Cooper 1987, Tahira et al. 1987) (Figure 10). Ce réarrangement résulte en une délétion des séquences amino-terminales du gène c-raf (contenant les exons 1 à 7) et une fusion des séquences carboxy-terminales restantes (exons 8 à 17) avec des séquences génomiques étrangères au gène c-raf. Le gène c-raf activé pourrait ainsi être transcrit à partir d'un promoteur de transcription potentiel apporté par ces séquences. Dans un cas de réarrangement (Fukui et al. 1987), ces séquences génomiques se révèlent appartenir au gène codant pour la lipocortine II. Cependant, ces altérations du gène c-raf ne sont pas détectées dans l'ADN tumoral de départ. Il est donc fort probable que l'activation du gène c-raf se soit produit durant la transfection sur les cellules NIH3T3 comme cela est également le cas pour les gènes transformants ret (Takahashi et al. 1985), mas (Young et al. 1986) et ros (Birchmeier et al. 1986).

Des structures secondaires pourraient jouer quelque rôle dans le mécanisme de recombinaison. En effet, dans certain cas de réarrangement, la séquence révèle des répétitions inversées au voisinage du site de recombinaison (Ishikawa et al. 1987a, Tahira et al. 1987).

Il est frappant de constater que les deux mécanismes d'activation décrits ci-dessus s'accompagnent d'une délétion des séquences amino-terminales du gène c-raf mais laissent intact les séquences carboxy-terminales contenant le domaine kinase.

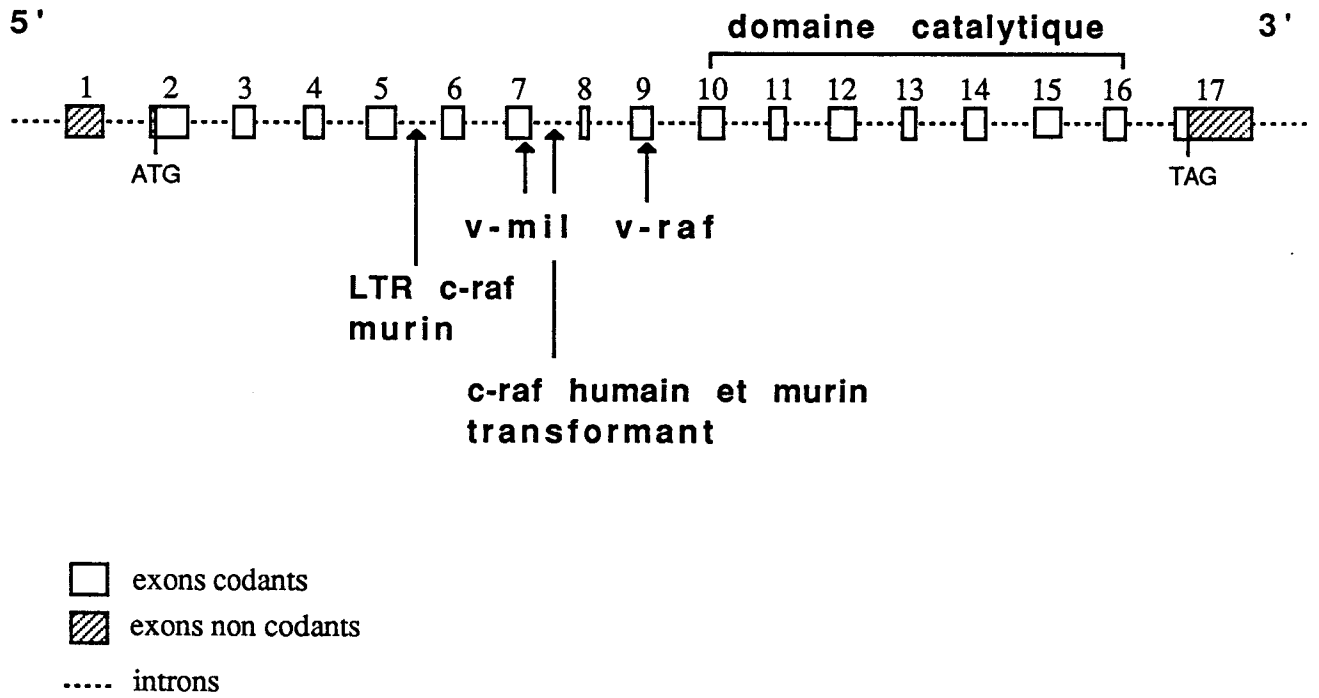


Figure 10 : Activation du gène c-mil/raf

V) LE GÈNE c-mil/raf APPARTIENT A UNE FAMILLE DE GENES

Le gène c-mil/raf appartient à une famille de gènes cellulaires contenant au moins deux membres caractérisés : le gène c-mil/raf et le gène A-raf (appelé pks par certains auteurs), qui contrairement au gène c-mil/raf ne possède pas d'équivalent viral connu.

Chez la souris, le gène Araf (mAraf) est situé sur le chromosome X (Huebner et al. 1986). Chez l'homme, deux gènes Araf ont été identifiés : hAraf1 localisé sur le chromosome Xp21→Xq11 et hAraf2 localisé sur le chromosome 7 p11.4 → 7q21 (Huebner et al. 1986, Mark et al. 1986). Comme le gène c-mil/raf, le gène Araf est conservé au cours de l'évolution puisque des gènes homologues ont été détectés chez la drosophile, les nématodes ainsi que chez la levure (Ishikawa et al. 1987b).

Les gènes mAraf et hAraf1 sont transcrits en ARN messagers de 2.5 kb et 2.7 kb respectivement, que l'on détecte, à la fois chez l'homme et la souris, dans les cellules myéloïdes et les cellules de type T (Huebner et al. 1986, Mark et al. 1986). Le gène mAraf est exprimé différenciellement selon les tissus, à un taux très élevé dans l'épididyme, à un taux plus faible dans le foie et l'intestin (Huleihel et al. 1986). Aucun transcrite correspondant au gène hAraf2 n'a pu être détecté dans les cellules testées (Huebner et al. 1986).

Les ADNc des gènes Araf de rat et hAraf1 ont été isolés et leur séquence nucléotidique déterminée (Ishikawa et al. 1987b, Beck et al. 1987). Les séquences des protéines Araf déduites, (606 acides aminés chez l'homme et 504 acides aminés chez le rat) présentent 80 % d'homologie avec les protéines c-raf humaine et murine, avec l'homologie la plus élevée observée dans le domaine carboxy-terminal de ces protéines. Les protéines Araf présentent notamment dans cette région des séquences déjà rencontrées pour les protéines mil/raf : la séquence consensus du site de fixation d'ATP : GlyXGlyXXGlyX₁₃ Lys (Kamps et al. 1984) ainsi que les séquences caractéristiques du domaine catalytique des protéines kinases (revue de Hunter 1987) (Figure 3). Ces homologies de séquence suggèrent que les protéines Araf possèdent une activité kinase.

Le domaine amino-terminal des protéines Araf se révèle moins homologue aux protéines c-mil/raf. On trouve cependant, comme dans les protéines c-mil/raf, la région riche en cystéine de structure Cys-X₂-Cys-X₉-Cys-X₂-Cys-X₇-Cys-X₇-Cys. Les séquences conservées dans le domaine amino-terminal des protéines mil/raf pourraient constituer des séquences de régulation.

Les régions carboxy-terminales (équivalent v-mil) des gènes mAraf et hAraf1 ont été insérées dans un virus leucémogène murin. Les recombinants Araf MSV ainsi construits, qui codent pour une protéine de fusion Δ gag-Araf, transforment les cellules NIH3T3 avec une efficacité comparable à celle du virus 3611 MSV (Huleihel et al. 1986, Beck et al. 1987). Comme pour le gène v-raf (Smith et al. 1986), la transformation des cellules NIH3T3 par les gènes Araf est indépendante de la présence de protéines ras actives (Huleihel et al. 1986, Beck et al. 1987). Ceci suggère que les protéines Araf agissent en aval des protéines ras dans la transduction du signal mitotique, ou que les protéines Araf agissent par une voie différente des protéines ras. Les recombinants ArafMSV sont également capables d'induire des néoplasmes chez les souris, comparables à ceux induits par le virus 3611 MSV. Les gènes c-mil/raf appartiennent donc à une famille d'oncogènes potentiels.

**RESULTATS
DISCUSSIONS**

I) CARACTERISATION DE L'HOMOLOGUE CELLULAIRE POULET DE v-mil

Une sonde correspondant à l'ensemble du gène v-mil (fragment 1.2 Kbp BamHI-HpaI) détecte dans l'ADN de fibroblastes de poulet, digéré par l'enzyme de restriction EcoRI, 4 fragments de taille respective : 13, 4.3, 2.2 et 0.9 Kbp (Coll et al. 1983). Afin de déterminer l'organisation de ces séquences cellulaires, nous avons entrepris leur clonage moléculaire.

1) Isolement des séquences cellulaires homologues à v-mil

Le criblage d'une banque d'ADN d'érythrocytes de poulet avec la sonde v-mil a permis l'isolement de 5 phages recombinants (L1 à L5). L'ADN de ces phages a été digéré par l'enzyme de restriction EcoRI et les fragments ainsi obtenus ont été séparés selon leur taille par électrophorèse en gel d'agarose. Après transfert sur nitrocellulose selon la technique de Southern (1975), les fragments ont été hybridés soit avec la sonde v-mil totale, soit avec des sondes représentant l'extrémité 5' de v-mil (fragment BamHI-SphI) ou 3' de v-mil (fragment SphI-HpaI) (Figure 11) ou encore avec les fragments EcoRI de bordure obtenus à partir des phages isolés (résultats non présentés). Ceci nous a permis d'orienter nos phages les uns par rapport aux autres, et également de les orienter par rapport à la séquence v-mil (Figure 11). Les 5 phages possèdent des insertions cellulaires chevauchantes qui s'étendent sur environ 30 Kbp d'ADN génomique et contiennent les 4 fragments EcoRI détectés dans l'ADN de poulet. Ce résultat, combiné avec le fait que lors du criblage de la banque de gènes en conditions strictes aucun phage de structure différente de celle des phages déjà isolés n'a pu être trouvé, est en faveur de l'existence d'un locus c-mil unique dans l'ADN de poulet.

2) Localisations des exons

Les fragments EcoRI ont été sous-clonés dans le plasmide pKH47, digérés par des enzymes de restriction, et les fragments obtenus, soumis au même traitement que précédemment, ont été hybridés avec la sonde v-mil. Ceci nous a permis d'une part d'établir la carte physique des séquences cellulaires clonées (Figure 12), d'autre part de définir des régions exoniques et introniques (par référence au gène viral).

Les régions homologues à v-mil ont été localisées plus précisément par la technique d'hétéroduplex, réalisée entre le phage λ MH2Q1 contenant le provirus MH2 cloné (Coll et al. 1983) et les phages L2 et L3 contenant la totalité des séquences cellulaires homologues à v-mil (résultats non présentés). Cette technique nous a permis d'identifier 9 régions homologues à v-mil (exons, Figure 12). La première région d'homologie entre v-mil et c-mil, localisée précédemment par hybridation dans un fragment BglII de 650 bp n'est pas détectée par hétéroduplex et représente l'extrémité 5' des séquences cellulaires homologues à v-mil. La seconde région d'homologie entre le gène cellulaire et le gène viral est en fait composée de deux exons mis en évidence par la séquence du gène c-mil réalisée par Jansen et Bister (1985). Ces exons de 28 bp et 128 bp séparés seulement par 90 bp de séquence intronique ne peuvent être résolus par la technique d'hétéroduplex. L'équivalent cellulaire du gène v-mil est donc constitué de 11 exons répartis sur 14

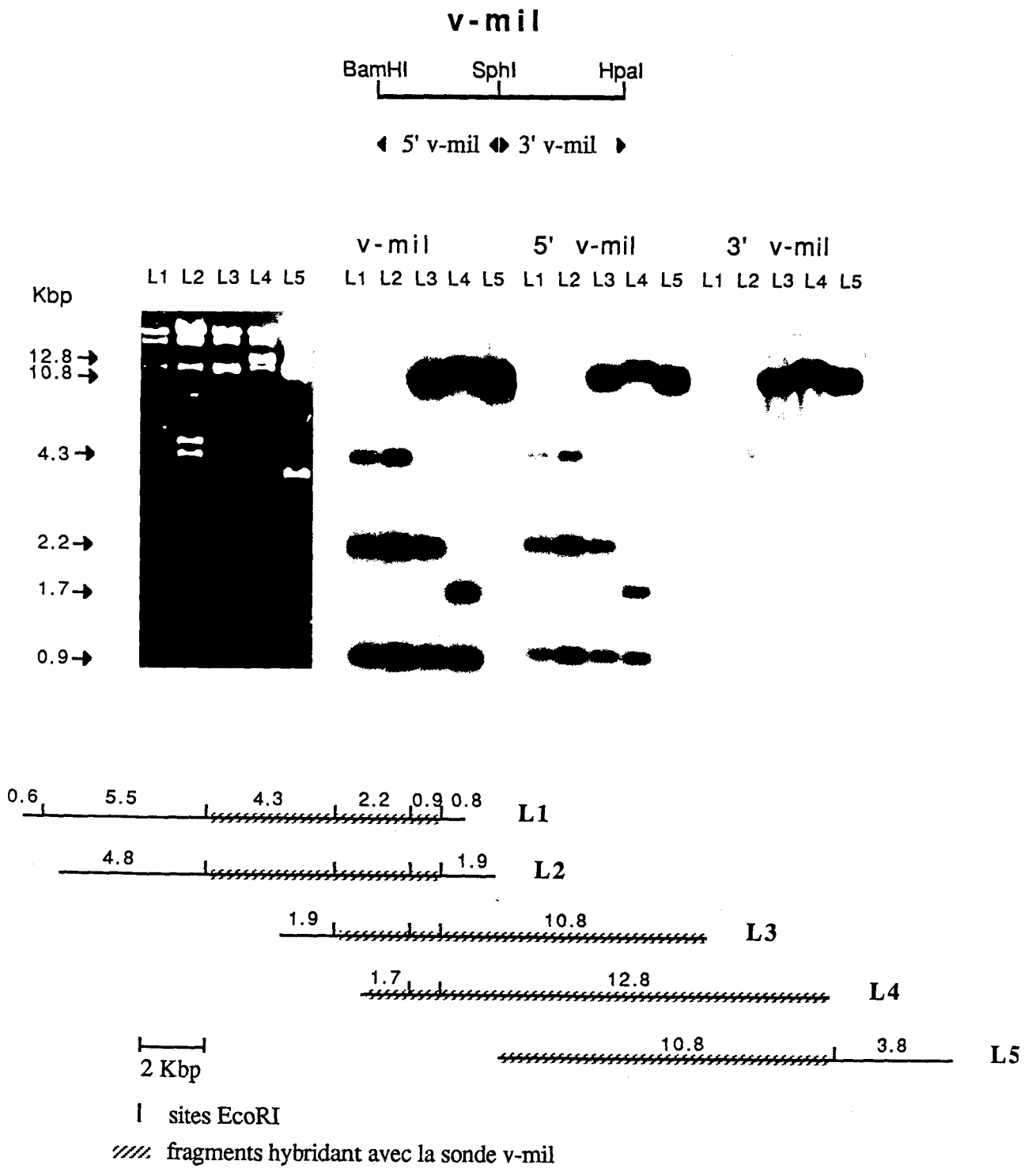


Figure 11 : organisation des séquences cellulaires homologues à v-mil

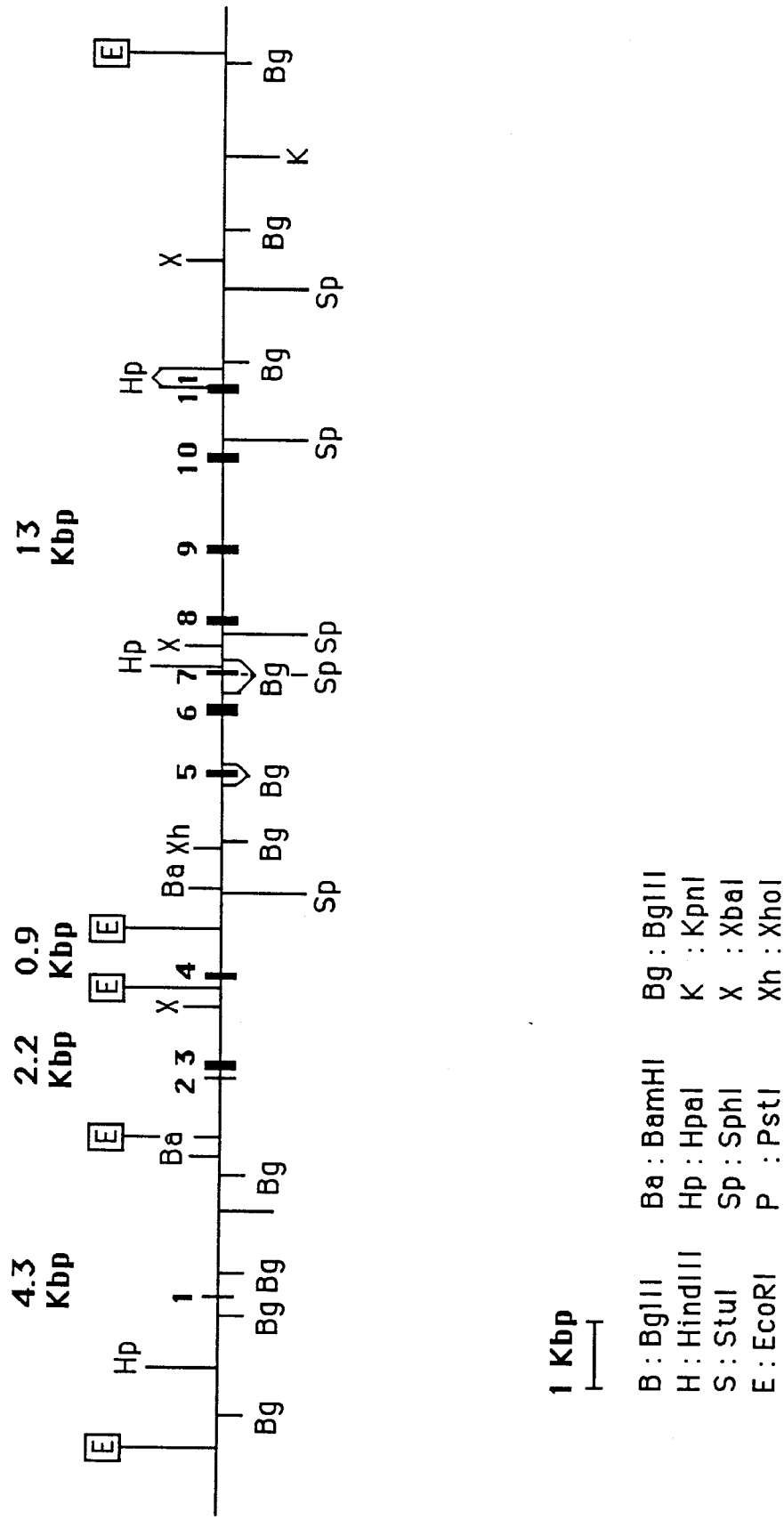


Figure 12 : localisation des régions homologues à v-mil

Kbp d'ADN génomique (Figure 12).

3) Séquences des sites de recombinaison

Dans le but de déterminer le mécanisme de transduction de c-mil ayant abouti à la formation de v-mil, nous avons entrepris la séquence des sites de recombinaison entre le gène c-mil et le virus MH2. Pour cela, les régions cellulaires contenant les exons 1 et 11 ont été sous-clonées dans le phage M13 et séquencées (en collaboration avec M. Coquillaud et B. Debuire de l'unité INSERM 124) par la méthode de SANGER (1977) (Figure 13).

La séquence de l'extrémité 5' de l'homologue cellulaire du gène v-mil ainsi obtenue a été comparée avec la séquence de la jonction Δ gag/v-mil de MH2 (Galibert et al. 1984) et la séquence du gène gag (p12) de RSV (Schwartz et al. 1983) (Figure 13A). Au niveau du gène c-mil, l'homologie avec le gène v-mil s'étend sur 32 nucléotides et se termine en 3' par un site donneur d'épissure (SD) GAG.GTAAT (Mount 1982). Cependant, cette homologie ne commence pas sur un site accepteur d'épissure et en amont du site de recombinaison le gène cellulaire présente un cadre de lecture ouvert, en phase avec celui du gène v-mil. Ceci suggère que le virus a recombiné au sein d'un exon cellulaire. La séquence nucléotidique de la totalité de l'exon 1 (Jansen et Bister 1985) confirme cette hypothèse. Au site de recombinaison nous ne détectons aucune homologie significative entre le gène cellulaire et le gène viral gag de RSV qui permettrait d'impliquer une recombinaison légitime.

La séquence de l'extrémité 3' de l'homologue cellulaire du gène v-mil réalisée a été comparée avec la séquence de la jonction v-mil/v-myc de MH2 (Galibert et al. 1984) et avec la séquence c-myc de poulet (Shih et al. 1984) (Figure 13B). Au niveau du gène c-mil, l'homologie avec le gène v-mil débute par un site accepteur d'épissure TCAG.A (Mount 1982), s'étend sur 154 nucléotides et se termine 12 nucléotides en aval du codon de terminaison de la protéine P100gag-mil. Ce codon de terminaison provient donc du gène cellulaire et correspond également au terminateur de la protéine c-mil (Koenen et al. 1988). Le virus a donc recombiné dans une partie non traduite d'un exon cellulaire. Comme dans le cas de la jonction 5' gag/v-mil, aucune homologie significative n'est observée entre les gènes c-mil et c-myc au site de recombinaison.

Ainsi la transduction de c-mil au sein du virus aviaire MH2 ne semble pas impliquer un mécanisme de recombinaison homologue. Cependant, nous remarquons que les motifs TTGT et TCCC, localisés dans le gène c-mil près du site de recombinaison 3', sont également présents dans le gène gag de MH2 près du site de recombinaison 5'. Nous observons également dans le gène c-mil une séquence répétée de façon inversée, située près des sites de recombinaison 5' (ACAAT) et 3' (ATTGT). Ces motifs d'homologies pourraient avoir contribué à la transduction du gène c-mil au sein d'un rétrovirus aviaire en permettant par exemple la formation et la stabilisation d'hybrides entre le génome viral et le gène c-mil.

A

site de
recombinaison 5'
↓

c-mil CCAAGACAGCGATCTACATCCACACCAAATGGTCACATGGTTAGCACTACAAT
 Δgag/v-mil GGGTCGGGTG.TCG.G.CC[GAGGG].TCTGCTACAC[TTGT].GA[TC.C].
 Gag p12 CCGGGACA

exon 1 ^{SD} intron
 ↓

c-mil GCCAGTAGACAGCCGGATAATTGAGGTAATATTGGT[GAGG]ATGGATCACCAT
 v-mil ATGC.A.TCGA.ACCATAG.G.ATCA
 Gag p12 TTATCAG.CGCAGT.CCCG.AAA.ACGBAAGTCAGGAAACAGCCGTGAGCGA

B

intron ^{SA} exon 11
 ↓

c-mil TCTTTTCATTTCTTTGTGCCTTTTCCTCAGATACTGTCTTCCATTGAATTGCTGCAA
 v-mil G..AGGG.AGAAAGACCCTTG.....G..A.....

c-mil CATTCTTTACCCAAAATCAACCGGAGTGCTTCCGAACCATCTCTGCACCGCGCATCC
 v-mil

c-mil CATAcAGAGGACATAAATTCTTGCACGTTAACATCCACAAGACTGCCTGTTTTTTAG ***
 v-mil

site de
recombinaison 3'
↓

c-mil GA[TTGT]GCT[CCCT]T[CCCT]TTAATCTCTCGAGTGATGGGAAAGGAACAGAAGTAAGAG
 v-mil/v-myc TCCCTATTATTAGTTTGTATATATATATATAA.TCAATCTGACGG
 c-myc TTA.T.TA.TAT.....T.AATCAATCTGAC

☐ motifs d'homologies

— séquence répétée inversée

*** codon de terminaison des protéines virale et cellulaire

Figure 13 : séquences des sites de recombinaison 5' et 3'

CONCLUSION ET DISCUSSION

Nos résultats présentent le clonage moléculaire et l'organisation des séquences cellulaires homologues au gène v-mil. Ces séquences présentent une structure exon-intron caractéristique des gènes eucaryotes et représentent un locus unique dans l'ADN de poulet. L'existence d'un locus unique c-mil n'est pas commune à toutes les espèces, puisque chez l'homme il existe deux loci c-mil/raf : un gène fonctionnel c-raf1 localisé sur le chromosome 3 en p25 et dont la structure éclatée ressemble fortement à celle du gène c-mil de poulet et un pseudogène c-raf2 dépourvu d'intron et localisé sur le chromosome 4 (Bonner et al. 1984, 1985).

Ce travail est venu confirmer les résultats d'un autre groupe de chercheurs qui ont également cloné des séquences cellulaires ayant une structure identique (Jansen et al. 1984b). Ces auteurs ont exploré plus en détail la structure de l'équivalent cellulaire de v-mil en réalisant sa séquence nucléotidique (Jansen et Bister 1985).

Les séquences cellulaires homologues à v-mil sont organisées en 11 régions réparties sur 14 Kbp d'ADN génomique : 9 d'entre elles ont d'ailleurs pu être identifiées par nos expériences d'hétéroduplex. Les régions 2 à 10 représentent de vrais exons du gène cellulaire c-mil, raboutés par épissure correcte des séquences introniques : en effet, immédiatement en 5' et 3' de ces séquences colinéaires au gène viral se trouvent les signaux canoniques d'épissure dans la cellule eucaryote (Mount 1982), et notamment les dinucléotides AG en 5' et GT en 3' (Jansen et Bister 1985). En revanche les régions 1 et 11 représentent des exons cellulaires tronqués.

La séquence nucléotidique de v-mil (Galibert et al. 1984) ne diffère que par 5 nucléotides de celle de son homologue cellulaire (Jansen et Bister 1985) et le cadre de lecture ouvert utilisé pour la synthèse de la protéine virale P100gag-mil est identique à celui du gène cellulaire (Koenen et al. 1988) (Figure 8). Il en résulte que le codon de fin de lecture de la protéine virale, que nous avons montré être d'origine cellulaire, correspond également au codon terminateur de la protéine cellulaire.

La séquence du gène c-mil au site de recombinaison suggère que le virus MH2 n'a transduit qu'une partie seulement de ce gène. La séquence nucléotidique totale de l'équivalent cellulaire de v-mil (Jansen et Bister 1985) ainsi que de l'ADNc du gène c-mil (Koenen et al. 1988) confirme que v-mil est une version tronquée et mutée du gène c-mil et code pour la partie carboxy-terminale (42 Kd) d'une protéine cellulaire (voir seconde partie des résultats).

Comment c-mil a-t-il été transduit au sein du virus MH2 ? La séquence des sites de recombinaison entre le gène c-mil et le virus MH2 ne révèle aucune homologie significative permettant d'envisager un mécanisme de recombinaison homologue, comme c'est le cas pour le gène c-raf et le virus murin MuLV (Bonner et al. 1985, Ishikawa et al. 1987a) ou le gène c-fos et le virus murin FBJ-MuLV (Van Beveren et al. 1983). On peut penser que les répétitions inversées du gène c-mil localisées au voisinage des sites de jonction 5' et 3', ainsi que les motifs d'homologies entre le gène gag et le gène c-mil aient joué un rôle dans la transduction de ce gène. La séquence révèle également la présence du motif GAGG (ou CTCC) à la fois dans le gène gag en amont du

point de recombinaison 5' et dans le gène c-mil en aval de ce point de recombinaison ; or, cette séquence se retrouve fréquemment près des sites de recombinaison gag/oncogène (Besmer et al. 1986), ainsi qu'au point de recombinaison du gène c-myc avec les gènes d'immunoglobulines dans les plasmocytomes murins (Piccoli et al. 1984), ce qui suggère quelque lien avec les mécanismes de recombinaison. Le rôle exact de ce motif n'est pas connu, mais il pourrait participer à une séquence reconnue par des enzymes cellulaires impliqués dans les remaniements de l'ADN. Ces séquences constitueraient ainsi des régions préférentielles de recombinaison.

Cependant cela n'explique pas la genèse du virus MH2 et comment ce virus a transduit dans son génome deux gènes cellulaires non apparentés. Diverses hypothèses peuvent être émises :

1) la capture de ces gènes résulte de deux événements de recombinaison successifs (v-mil avant v-myc ou v-myc avant v-mil). On peut supposer par exemple que le premier événement dans la formation du virus MH2 fut la transduction du gène c-myc. Cette supposition paraît concevable dans la mesure où il existe des rétrovirus aviaires ne possédant que le gène c-myc (MC29, OK10, CMII). Cette recombinaison aurait eu lieu au stade ADN comme nous le laisse supposer la présence de séquences introniques en 5' du gène v-myc (Galibert et al. 1984) et pourrait être par exemple le résultat de l'insertion d'un virus ALV en amont de ce proto-oncogène. Un tel mécanisme permet notamment la transduction du gène c-erbB (Beug et al. 1986). Le virus obtenu aurait ensuite recombiné avec le gène c-mil pour former le virus MH2. Cette recombinaison aurait pu avoir lieu au stade ADN ou ARN. Dans ce dernier cas, au cours de la conversion de l'ARN viral en ADN proviral, la rétropolymérase d'un virus "helper" pourrait se déplacer de la matrice virale sur l'ARN du gène cellulaire ; les motifs d'homologies existant entre le gène cellulaire et le génome viral permettant la formation et la stabilisation d'hybrides. Un tel mécanisme serait intervenu dans la transduction du gène c-fps au sein du virus aviaire PRCII (Huang et al. 1986).

2) le virus a acquis les deux gènes en même temps à partir d'une cellule ayant réuni ces gènes au cours d'une translocation chromosomique ; une telle translocation aurait rabouté les séquences 3' non traduites du gène c-mil aux séquences introniques 5' du gène c-myc.

3) MH2 résulte de la recombinaison entre deux virus aviaires possédant chacun l'un ou l'autre des deux oncogènes.

II) CARACTERISATION ET EXPRESSION DU GENE c-mil DE POULET

Les résultats présentés dans la première partie indiquent que v-mil représente une version tronquée du gène c-mil de poulet. Dans le but de construire des expériences permettant d'accéder à la fonction de ce gène dans la cellule normale, il est indispensable de disposer du gène cellulaire complet. Pour pallier au problème que nous pose la taille de ce gène (qui s'étend sur plus de 30 Kbp d'ADN génomique), nous avons eu recours à la version ADNc de ce gène. Nous avons donc entrepris le clonage moléculaire et la caractérisation d'ADNc du gène c-mil de poulet (article 1).

1) Isolement et caractérisation de deux ADNc différents

En criblant une banque d'ADNc de cellules embryonnaires de poulet avec la sonde v-mil et une sonde d'ADNc humain contenant le codon initiateur de la protéine humaine (fragment PvuII de 300 bp, Bonner et al. 1986), nous avons isolé deux clones d'ADNc de 3.1 Kbp (clones p1A et p6C), susceptibles de contenir toute l'information codante du gène c-mil.

L'analyse précise des ADNc p1A et p6C par des enzymes de restriction (Figure 14A) ainsi que par hybridation avec les clones génomiques L2 et L3 contenant l'ensemble des séquences cellulaires homologues à v-mil (Figure 14B), nous a permis de mettre en évidence une différence entre ces deux ADNc. Les résultats d'hybridation notamment nous suggèrent l'existence dans les séquences cellulaires situées entre les deux premiers exons homologues à v-mil (fragment de 1.9 Kbp), d'un ou plusieurs exons cellulaires non transuits par le virus MH2 et non présents dans le clone p6C. Cette séquence exonique, localisée plus précisément dans un fragment génomique AluI-CfoI de 280 bp (Figure 15A), n'est pas spécifique de l'ADN de poulet puisque nous la détectons également dans l'ADN de caille, de rat et d'homme (Figure 15B).

Nous avons caractérisé plus précisément la variation observée entre les deux ADNc en séquençant les régions des clones p1A et p6C contenant les premiers exons homologues à v-mil (Figure 16). Alors que la séquence de l'ADNc p6C est colinéaire à la séquence du gène v-mil, la séquence de l'ADNc p1A révèle une insertion de 60 bp située à la jonction des exons 1 et 2 homologues à v-mil ; ces 60 bp peuvent coder pour 20 acides aminés en phase avec le cadre de lecture de la protéine v-mil.

Ces résultats suggèrent que nous avons isolé deux ADNc représentatifs de deux espèces d'ARN messagers transcrits à partir du gène c-mil par un mécanisme d'épissage alterné. Cet épissage ne modifie pas le cadre de lecture correspondant à la protéine v-mil.

Une cartographie plus précise du clone p1A comparativement à v-mil suggère que l'ADNc p1A ne diffère de v-mil que par cet exon (résultats non présentés).

2) Détection et expression des ARN messagers c-mil

Jusqu'à présent, avec une sonde v-mil, nous ne détectons qu'un transcrit c-mil d'environ 4.0 Kb chez le poulet (Coll et al. 1983). Puisque les ADNc p1A et p6C sont issus d'une banque d'ADNc réalisée à partir de cellules embryonnaires de poulet, nous avons cherché à détecter les deux ARN messagers correspondants dans des fibroblastes embryonnaires de poulet. L'hybridation des

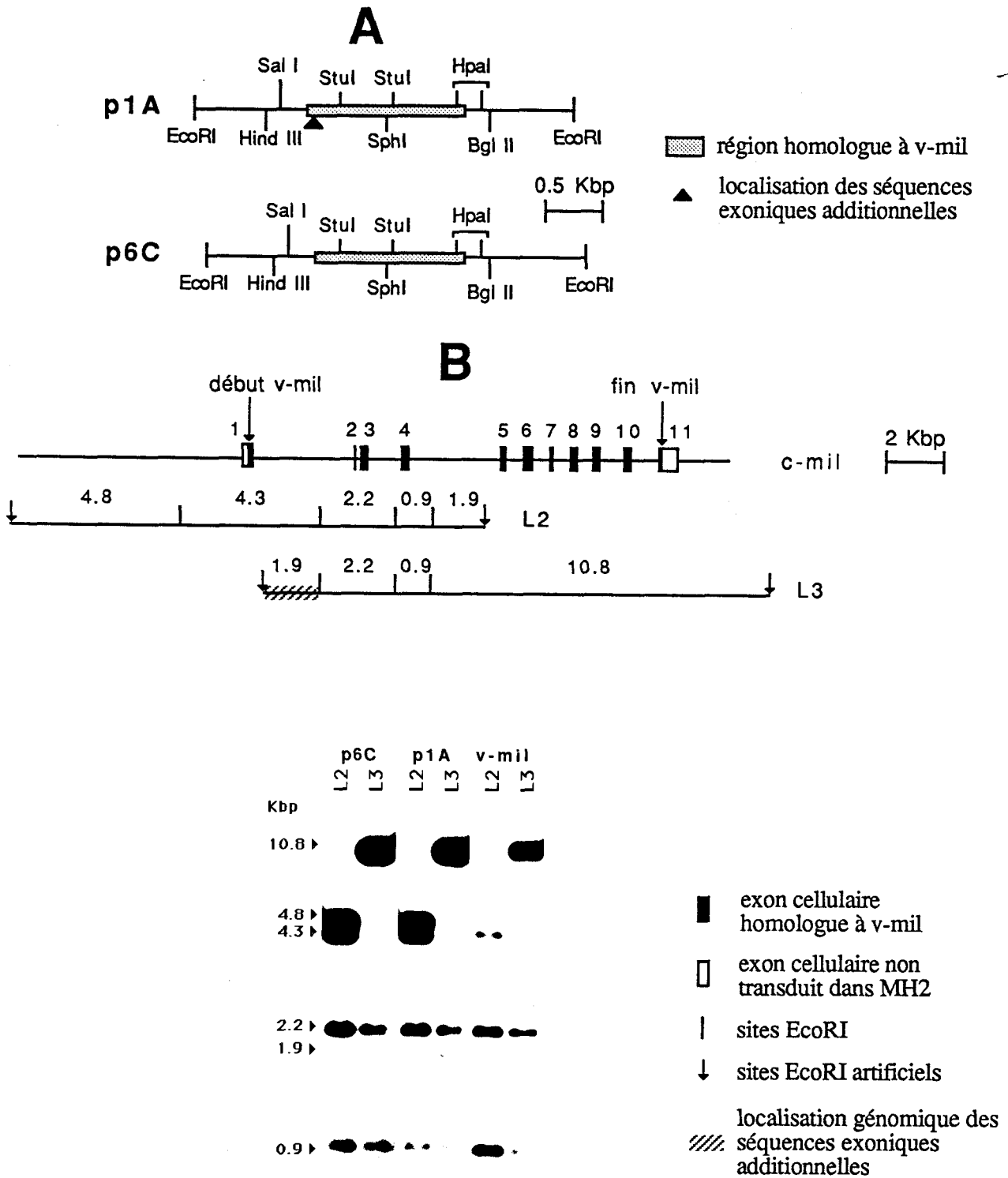
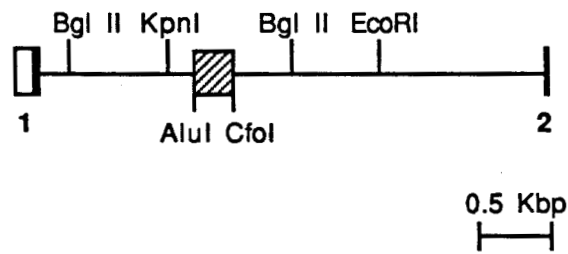
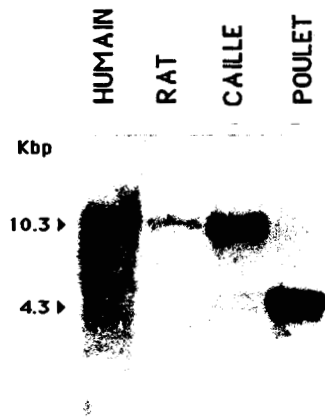


Figure 14 : caractérisation des ADNc p1A et p6C

A**B**

- exon cellulaire homologue à v-mil
- exon cellulaire non transduit dans MH2
- ▨ localisation génomique des séquences exoniques supplémentaires

Figure 15 : conservation phylogénétique des séquences exoniques supplémentaires

ARN polyadénylés extraits de ces cellules avec, d'une part la sonde spécifique du clone p1A (sonde génomique AluI-CfoI), d'autre part la sonde p6C, nous révèle que les deux ARN messagers ont une taille similaire (4.0 Kb) et ne sont pas séparables dans les conditions d'électrophorèse réalisées (Figure 17A).

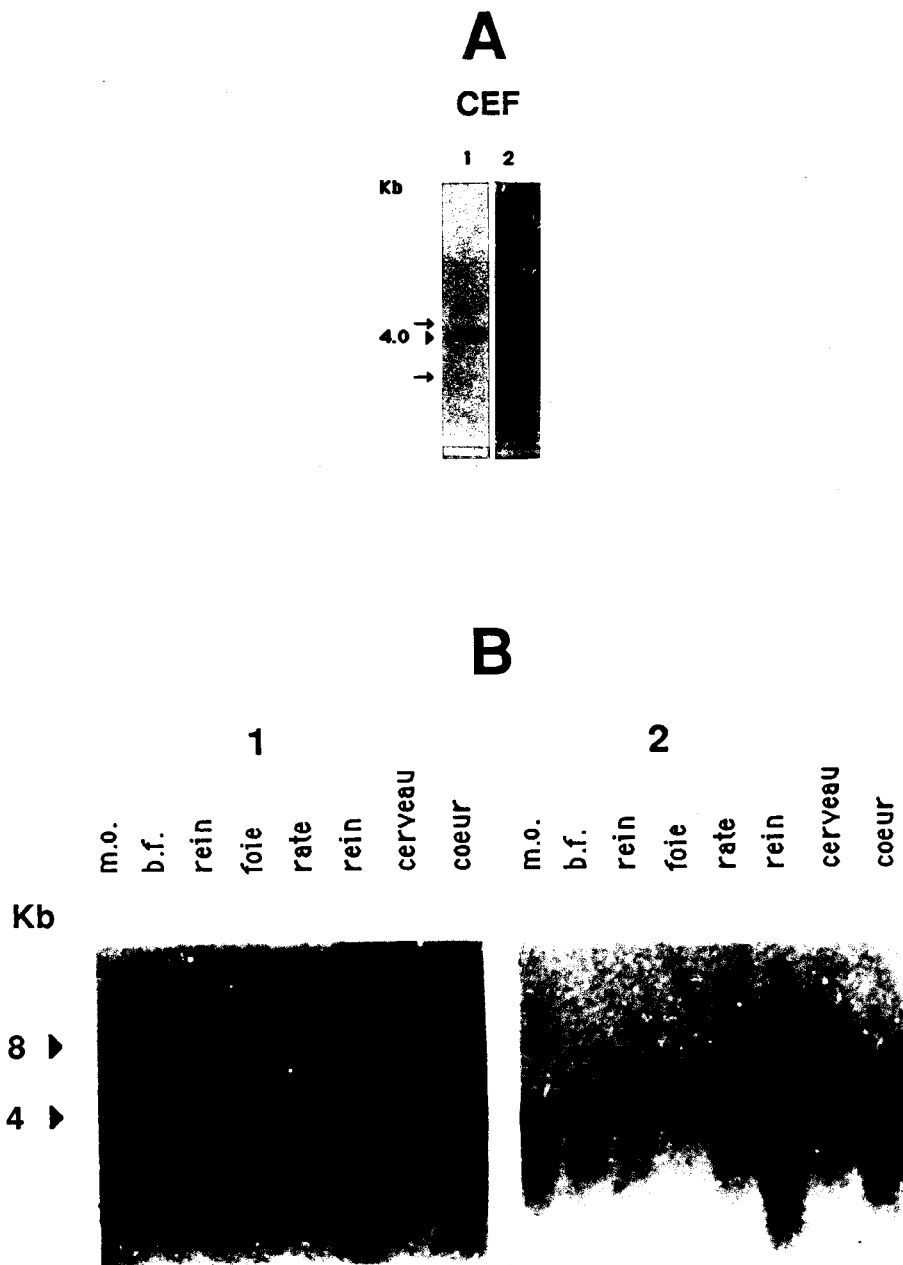
Ces résultats confirment l'existence d'un mécanisme d'épissage alterné se produisant lors de la transcription du gène c-mil.

Nous avons essayé de définir dans quels tissus le gène c-mil est exprimé en étudiant l'expression de ce gène dans l'ARN total extrait de différents tissus de poulet : cerveau, moelle osseuse, bourse de fabricius, rein, foie, rate, et coeur (Figure 17B). Cette étude est rendue difficile par le fait que les deux ARN messagers co-migrent en électrophorèse en gel d'agarose et que nous ne disposons de sonde spécifique que pour l'ADNc p1A ; cependant, nous pouvons remarquer que l'ARN messenger "type p1A" s'exprime dans tous les tissus testés. Nos résultats mettent également en évidence une expression différentielle de ces ARN messagers selon les tissus. Ceci pourrait rendre compte d'un rôle spécifique de l'un ou l'autre de ces messagers au sein des différents tissus.

Dans le cerveau, un ARN messenger supplémentaire d'environ 8 Kb est détecté spécifiquement avec la sonde AluI-CfoI. Cet ARN pourrait correspondre soit à un troisième transcrit c-mil exprimé uniquement dans le cerveau et produit par un mécanisme d'épissage alterné, soit à un produit de transcription d'un gène présentant une homologie significative avec l'exon alterné. Cette dernière hypothèse est plausible dans la mesure où la sonde AluI-CfoI détecte faiblement dans l'ADN de poulet des séquences n'appartenant pas au gène c-mil (Figure 15B). Dans l'état actuel de nos travaux, nous ne pouvons trancher entre ces deux hypothèses.

3) Produits de traduction de ces ARN messagers

Pour identifier les protéines codées par les ARN messagers correspondants aux ADNc p1A et p6C, nous avons cloné ces ADNc dans le vecteur d'expression pKCR3, sous contrôle d'un promoteur fort (promoteur de SV40). Les constructions pKCR3-1A et pKCR3-6C ainsi obtenues ont été transfectées, par la méthode au sulfate de dextran, dans les cellules COS-1 (Gluzman et al. 1981). Ces cellules expriment de façon constitutive la protéine largeT de SV40, activatrice de son propre promoteur. 72 heures après la transfection, les cellules ont été marquées à la méthionine ³⁵S puis lysées. Les expériences d'immunoprécipitation réalisées sur les lysats avec un sérum anti-v-mil révèlent que les cellules transfectées par le vecteur pKCR3-1A synthétisent une protéine de 73 Kd alors que les cellules transfectées par le vecteur pKCR3-6C synthétisent une protéine de 71 Kd (Figure 18B). La taille des protéines obtenues concorde avec celle des protéines c-mil (71/73 Kd) observées *in vivo* par d'autres auteurs (Patchinsky et al. 1986b). Cependant ces auteurs attribuaient l'existence du doublet 71/73 Kd à des formes phosphorylées différentes de la protéine c-mil. Sans exclure le fait que ces protéines puissent être phosphorylées, nos résultats suggèrent que ce doublet correspond à deux protéines distinctes produites par épissage alterné.



1 : sonde génomique AluI-CfoI

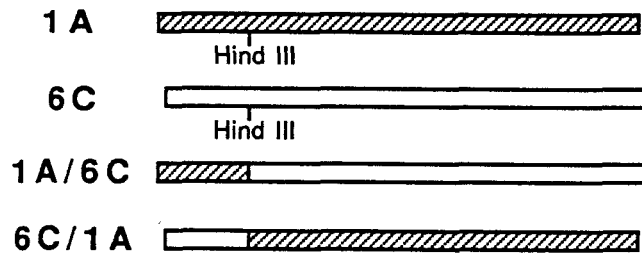
2 : sonde p6C

→ ARN ribosomiaux 28S et 18S

m.o. : moelle osseuse

b.f. : bourse de fabricius

Figure 17 : détection et expression des ARN messagers c-mil

A

construction des hybrides 1A/6C et 6C/1A

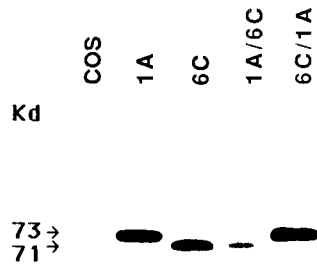
B

Figure 18 : produits de traduction des ARN messagers c-mil

Pour déterminer si des variations autres que celle identifiée dans la région où commence l'homologie avec v-mil peuvent être mises en évidence entre les ADNc p1A et p6C, nous avons construit des hybrides pKCR3-1A/6C et pKCR3-6C/1A (Figure 18A). Les protéines synthétisées par les cellules COS-1 transfectées par ces hybrides, suggèrent que le même ATG est utilisé dans les cDNAs p1A et p6C pour synthétiser les protéines de 73 et 71 Kd observées (Figure 18B).

CONCLUSION ET DISCUSSION

Nous avons montré que le gène c-mil exprime par un mécanisme d'épissage alterné au moins deux ARN messagers distincts. Ces ARN, similaires en taille, sont exprimés de façon différentielle dans les tissus et coderaient pour deux protéines distinctes de 71 et 73 Kd.

Récemment un ADNc du gène c-mil a été isolé et séquencé (Koenen et al. 1988) ; cet ADNc, qui peut coder pour une protéine de 647 acides aminés, est colinéaire au gène v-mil dans sa partie carboxy-terminale et correspond vraisemblablement à l'ADNc p6C. La séquence complète du clone p1A devrait nous permettre de caractériser plus précisément le mécanisme d'épissage alterné et de déterminer la structure de la protéine codée par cette espèce d'ARN messager.

Un seul type d'ADNc raf, colinéaire à v-mil et probablement représenté dans le poulet par le clone p6C, a été décrit chez l'humain (Bonner et al. 1986) et le rat (Ishikawa et al. 1987a). Des séquences homologues à l'exon alterné sont cependant détectées dans l'ADN humain et l'ADN de rat, or, les introns ne sont pas phylogénétiquement conservés ; ceci suggère qu'un mécanisme d'épissage alterné du gène c-raf aboutissant à la formation d'ARN messagers "type 1A" pourrait également exister chez ces deux espèces.

Récemment, chez l'homme, Tahira et al. (1987), en isolant des ADNc provenant d'un gène c-raf1 réarrangé (dont la partie 5' a été remplacée par d'autres séquences), a obtenu un clone résultant probablement d'un mécanisme d'épissage alterné. En effet, cet ADNc possède une séquence de 113 bp insérée à la jonction des exons 10 et 11, et la séquence génomique correspondante est bordée en 5' et 3' des signaux canoniques d'épissage (Mount et al. 1982). Cette séquence additionnelle contient deux stops codons en phase avec la séquence du gène c-raf1 ; la protéine codée par cet ADNc serait donc dépourvue du domaine kinase. Cependant, aucun ARN messager correspondant à cet ADNc n'a pu être détecté par ces auteurs. Ce type d'épissage alterné serait donc un événement rare et pourrait être le résultat du réarrangement 5' du gène c-raf1.

En effet, il semblerait que les événements d'épissage soient gouvernés par d'autres facteurs que la séquence seule et, bien que le mécanisme ne soit pas encore déterminé, certains auteurs proposent que les structures secondaires dans les ARN pré-messagers joueraient un rôle crucial dans l'épissage (Solnick 1985, revue de Breitbart et al. 1987).

Le mécanisme d'épissage alterné est décrit chez un nombre de plus en plus important de gènes eucaryotes (revue de Leff 1986) et a déjà été mis en évidence pour de nombreux proto-oncogènes dont les gènes c-Kiras2 (Schimizu et al. 1983), c-abl (Ben Neriah et al. 1986, Shtivelman et al. 1986), c-src (Martinez et al. 1987, Wang et al. 1987), c-ets (Duterque-Coquillaud et al. sous-*presse*) et le gène codant pour la p53 (Arai et al. 1986, Matlashewski et al. 1987).

Dans le cas du gène c-mil, l'épissage alterné aboutit à la synthèse de deux protéines dont les fonctions ne sont pas encore connues. Les deux protéines c-mil peuvent avoir des cibles moléculaires, des localisations sub-cellulaires, ou même des fonctions distinctes. Puisque nous disposons des deux ADNc clonés, des expériences ultérieures pourront être réalisées en vue de répondre à ces questions. Nous pourrions également tester l'activité biologique des deux protéines dans les systèmes biologiques définis pour le gène v-mil.

III) ACTIVATION DU GENE c-mil - DOMAINE FONCTIONNEL DE LA P100gag-mil

L'analyse de v-mil dans le virus MH2 et de v-raf dans le virus 3611 MSV, montre que les régions 3' des gènes cellulaires c-mil et c-raf ont été transduites dans les deux cas. Ces régions codent pour des polypeptides de 35 Kd (v-raf) à 42 Kd (v-mil) représentant la portion carboxy-terminale de la protéine cellulaire ; portion contenant le domaine kinase (défini comme tel par homologies de séquence avec les protéines kinases). Cette observation, ainsi que l'identification de versions transformantes du gène c-raf (humain et murin) qui présentent dans tous les cas une délétion des séquences cellulaires amino-terminales, suggèrent d'une part que la portion carboxy-terminale des gènes c-mil/raf est importante dans l'activité transformante de ces gènes, d'autre part qu'une délétion des séquences amino-terminales est nécessaire pour acquérir le potentiel transformant.

Cependant, puisque les gènes v-mil et v-raf présentent de nombreuses mutations comparés à leurs homologues cellulaires (Jansen et Bister 1985, Ishikawa et al. 1987a) (Figure 8), on peut également penser que les gènes c-mil/raf sont activés par introduction de mutations ponctuelles dans leurs séquences codantes, comme dans le cas des gènes c-ras (revue de Gibbs et al. 1985) et c-src (Kato et al., Levy et al. 1986).

Ainsi, l'activation des gènes c-mil/raf pourrait s'effectuer soit par délétion des séquences amino-terminales, soit par mutations somatiques survenues dans leurs séquences codantes.

Pour tenter de développer un modèle rendant compte du mécanisme d'activation du gène c-mil, nous avons testé l'activité de la portion carboxy-terminale du gène c-mil dans un système biologique où un effet propre au gène v-mil a pu être mis en évidence : il s'agit de la croissance des cellules de neurorétine aviaires (NR) (article 2). Les NR sont obtenues par la dissociation des cellules qui forment la neurorétine d'embryon de poulet (CNR) ou de caille (QNR) de 7 jours et se composent de neurones et de cellules gliales. Après leur mise en culture, les NR n'effectuent que quelques cycles de division mais peuvent être maintenues à l'état quiescent pendant plusieurs semaines. Ces NR quiescentes peuvent être induites à proliférer sous l'action du gène v-mil (P100gag-mil) (Béchade et al. 1985). La prolifération des NR est mise en évidence par l'augmentation du nombre de cellules en fonction du temps de culture et peut être représentée par des courbes de croissance.

1) Activité biologique de la portion carboxy-terminale du gène c-mil sur NR

Le mutant PvS (mil⁺myc⁻), utilisé comme contrôle positif, est construit à partir du provirus MH2 cloné (pMH2-Hd) par délétion des séquences v-myc (fragment PvuII-SalI) aboutissant à la synthèse d'un produit v-myc inactif (Figure 19).

Pour tester l'activité biologique de la portion carboxy-terminale du gène c-mil, nous avons construit un recombinant SmXHc-mil en substituant les séquences virales gag-mil du PvS par des séquences c-mil contenant les huit derniers exons homologues à v-mil (exons 4 à 11) (Figure 19). Dans ce recombinant, l'ATG et le site donneur d'épissage du gène gag sont présents ; l'épissure entre ce site donneur et le site accepteur d'épissage de l'exon 4 permet la conservation du cadre de

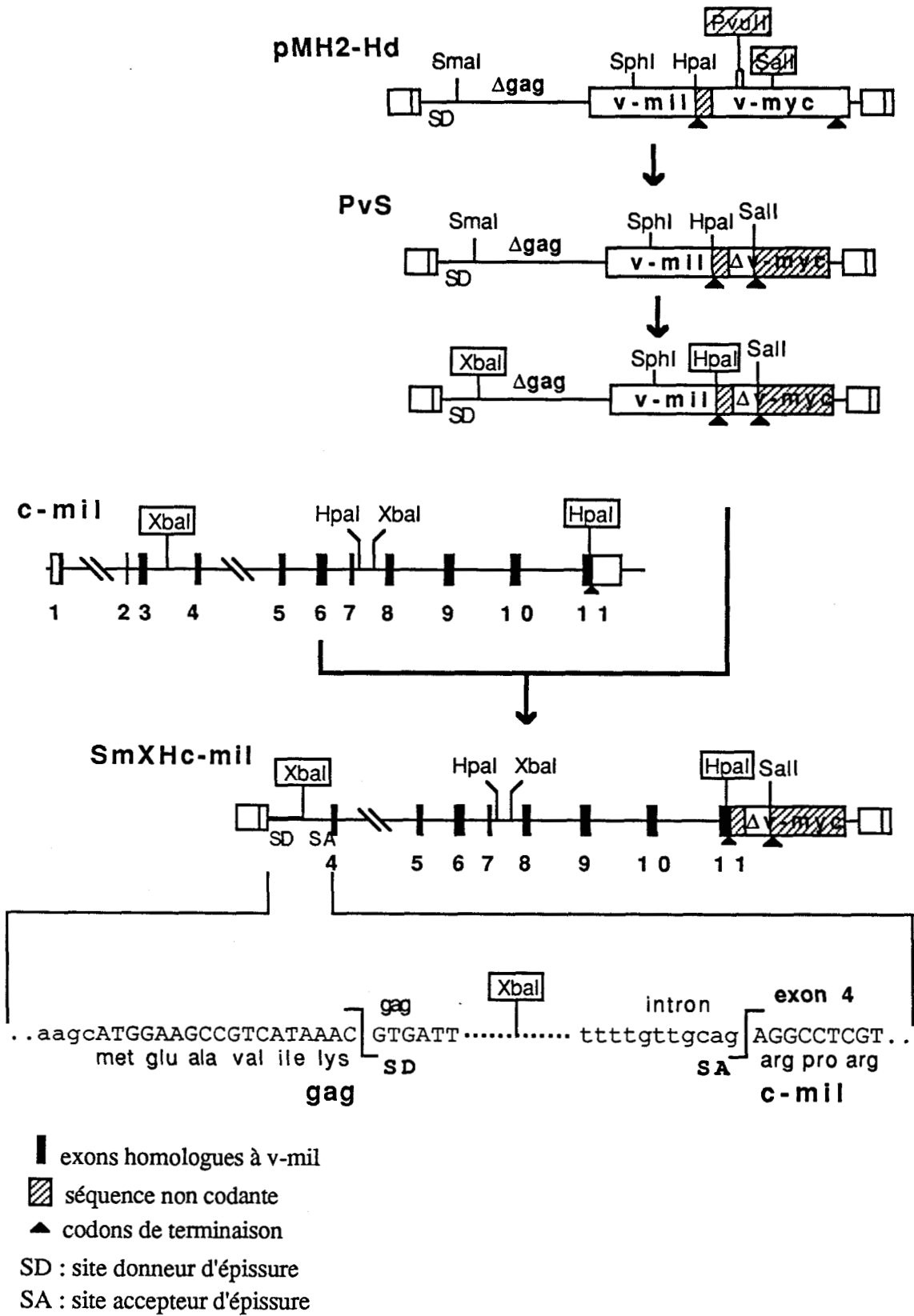


Figure 19 : construction du recombinant SmXHc-mil

lecture entre la séquence codante gag et celle de c-mil. Les séquences cellulaires insérées s'expriment par l'intermédiaire d'un ARN sous-génomique qui code pour les 35 Kd carboxy-terminaux (contenant le domaine kinase) du produit c-mil (p35^{Δc-mil}).

L'ADN du SmHXc-mil a été co-transfecté avec de l'ADN d'un provirus compétent pour la réplication (RAV-1) sur des CNR et des QNR. Le recombinant SmXHc-mil induit la prolifération des NR mais l'activité mitogène obtenue est inférieure à celle du contrôle positif PvS (Figure 20).

2) Analyse de la protéine synthétisée par le recombinant SmXH c-mil

L'activité mitogène réduite observée avec le recombinant SmXHc-mil pourrait être due à une instabilité de la protéine synthétisée par ce recombinant. Cette instabilité peut en effet se concevoir par le fait que, dans cette construction, les séquences gag sont délétées (mis à part les 18 premiers nucléotides avant le site donneur d'épissage) ; or nous savons que la protéine oncogène de fusion gag-v-abl, est instable dans les cellules lymphoïdes lorsque certains déterminants gag sont délétés (Prywes et al. 1985b). Nous avons donc analysé la protéine synthétisée à partir du recombinant SmXHc-mil.

Les NR transfectées par ce recombinant synthétisent une protéine de 35 Kd (poids moléculaire attendu), à un taux similaire à celui de la protéine P100gag-mil synthétisée par les NR transfectées par le PvS (Figure 21A). Un immunotransfert réalisé sur ces cellules, permettant de visualiser l'accumulation de la protéine dans la cellule (Figure 21B), nous permet d'exclure cette hypothèse.

3) Influence des mutations entre le gène viral et le gène cellulaire

Une autre hypothèse pour expliquer l'activité biologique réduite du gène c-mil serait l'absence dans ce gène des mutations présentes dans le gène viral. Ceci a notamment été montré pour les gènes ras : les gènes v-ras possèdent deux mutations par rapport aux gènes c-ras, l'une portant sur le codon 12, l'autre sur le codon 59 (revue de Gibbs et al. 1985) ; une surexpression du produit du gène c-Ha-ras normal dans des cellules de souris NIH3T3 est suffisante pour transformer ces cellules mais l'efficacité transformante de cette construction est réduite comparée à celle d'une construction similaire contenant le gène v-Ha ras (Chang et al. 1982). De même, les mutations acquises par le gène v-myc peuvent augmenter l'activité transformante du gène c-myc sur les fibroblastes embryonnaires de poulet (FEP) (Frykberg et al. 1987).

Dans le but de tester si la prolifération réduite observée avec le recombinant SmXHc-mil peut donc être attribuée à l'absence des mutations présentes dans le gène viral, nous avons construit deux recombinants (Figure 22). Le recombinant SGRL (article 3) a été construit à partir du SmXHc-mil en substituant les séquences cellulaires insérées par les séquences virales homologues, de manière à exprimer le gène viral par l'intermédiaire d'un ARN sous-génomique codant pour les 35 Kd carboxy-terminaux de la protéine virale (p35^{Δv-mil}). Dans le recombinant SpHc mil-RAF1 (article 2) nous avons introduit 10 mutations dans la protéine virale P100gag-mil en substituant la portion 3' du gène v-mil (fragment SphI-HpaI) par son homologue cellulaire humain (fragment

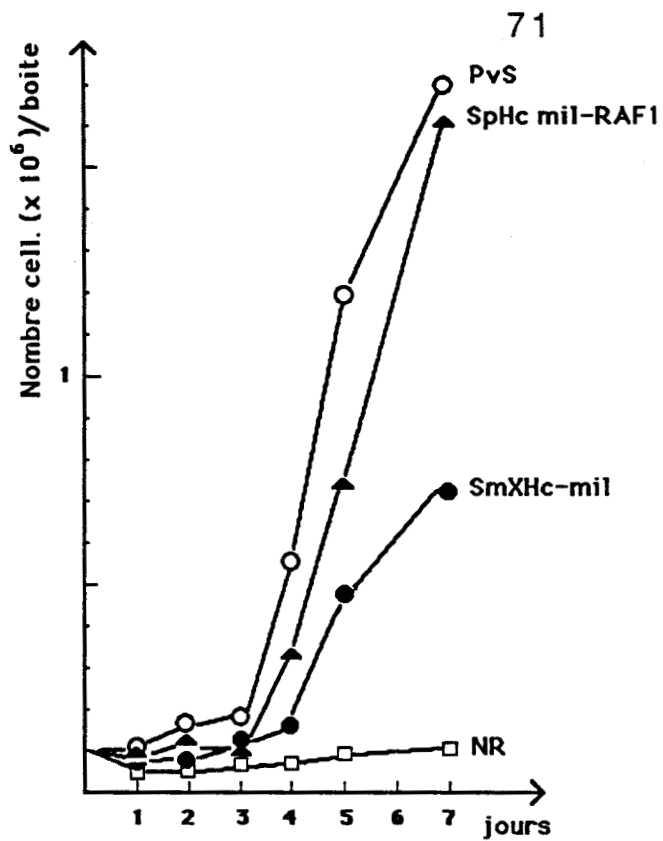


Figure 20 : activité biologique des recombinants SmXHc-mil et SpHcmil-RAF1 sur NR

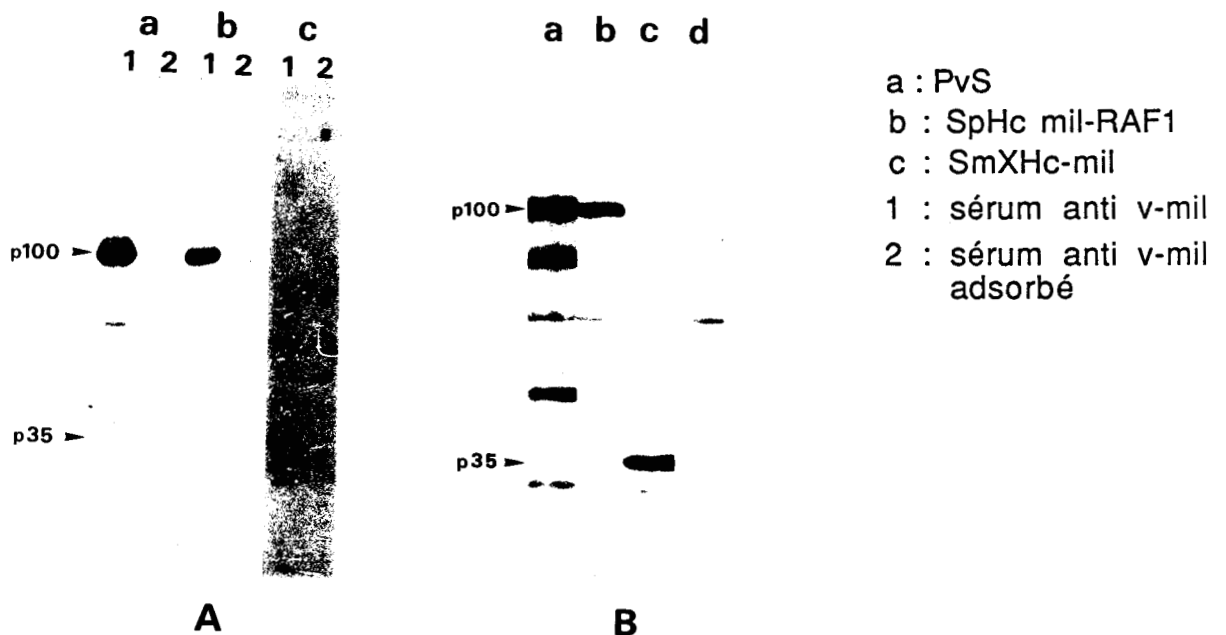
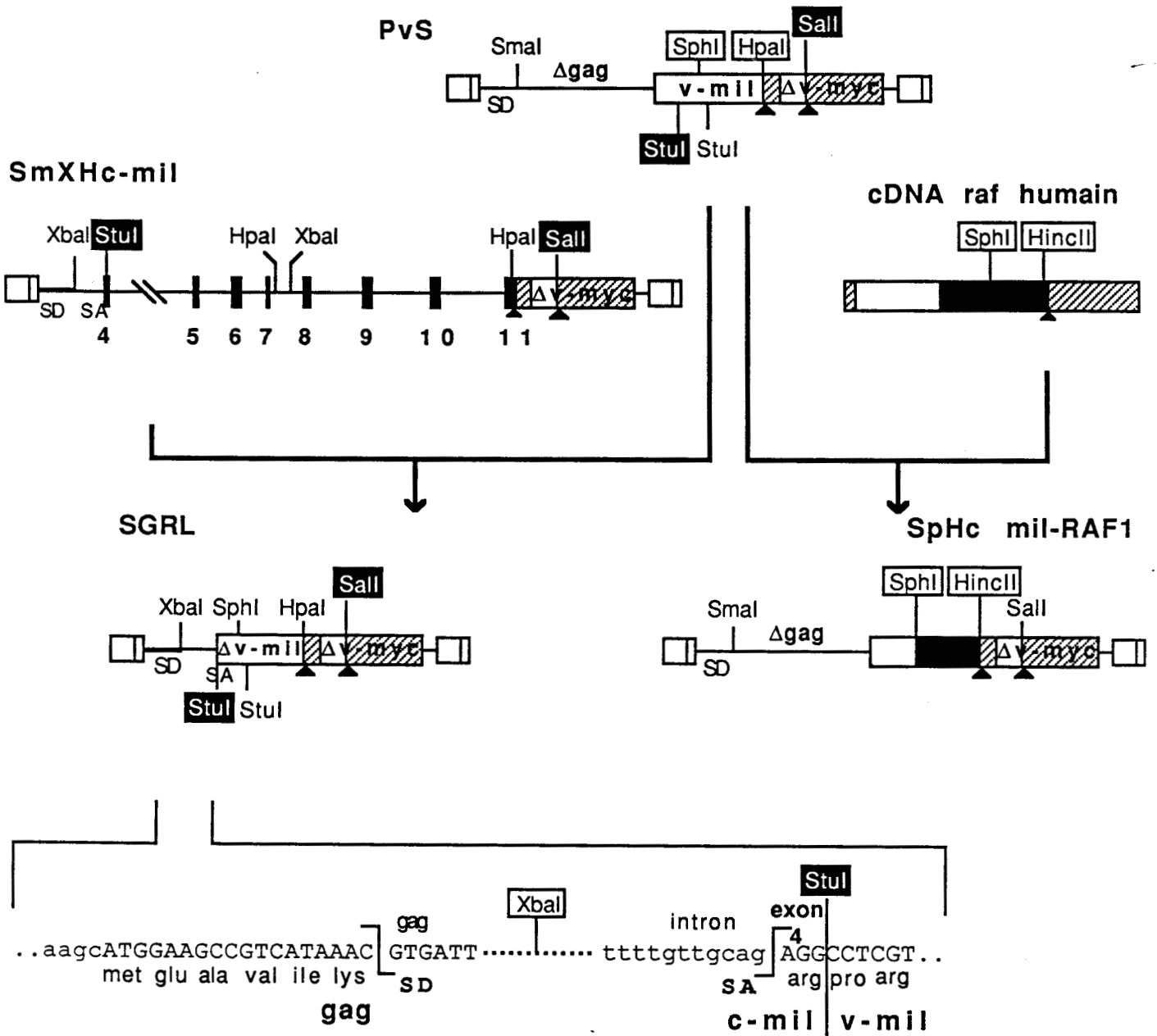


Figure 21 : analyse de la protéine synthétisée par le recombinant SmXHc-mil



■ séquence homologue à v-mil

▨ séquence non codante

▲ codons de terminaison

SD : site donneur d'épissage

SA : site accepteur d'épissage

Figure 22 : construction des recombinants SGRL et SpHc mil-RAF1

SphI-HincII d'un ADNc humain).

Ces recombinants induisent la prolifération des NR (Figures 20 et 24) avec cependant, pour le recombinant SGRL, une efficacité réduite comparable à celle obtenue avec le gène cellulaire surexprimé (Figure 24). Puisque les parties carboxy-terminales des gènes v-mil et c-mil ont un comportement analogue sur NR, ceci signifie que les mutations entre le gène viral et le gène cellulaire ne sont pas responsables du comportement "hypomitogène" du recombinant SmXHc-mil.

4) Influence des séquences délétées

D'autres hypothèses doivent être envisagées pour expliquer l'efficacité réduite des p35^{Δc}-mil et p35^{Δv}-mil sur les NR :

- la délétion des séquences gag (acides aminés 7 à 514).
- la délétion des séquences 5' de v-mil (acides aminés 514 à 573, ces séquences correspondent aux trois premiers exons cellulaires homologues à v-mil, non transduits dans v-raf).
- la délétion combinée de ces deux séquences.

Ces séquences, sans être essentielles à l'activité mitogène de la P100gag-mil, pourraient cependant moduler cette activité.

Pour essayer de trancher entre l'une ou l'autre de ces hypothèses nous avons construit le mutant GRL (article 3) délété dans les séquences 5' de v-mil (acides aminés 514 à 578) mais possédant les séquences gag présentes dans la P100gag-mil (Figure 23). Ce mutant induit la prolifération des cellules de neurorétine avec une efficacité comparable au PvS (Figure 24). Ainsi, la restauration des séquences gag au SGRL suffit à conférer à la protéine résultante une activité mitogène identique à la P100gag-mil. L'activité mitogène réduite de ce mutant est donc due à la délétion des séquences gag (acides aminés 7 à 514). La délétion des 64 premiers acides aminés codés par le gène v-mil n'a aucun effet sur l'activité mitogène de ce gène.

5) Importance du domaine kinase (article 3)

Afin de localiser plus précisément le domaine fonctionnel de la P100gag-mil, nous avons construit, à partir du provirus MH2 cloné, différents mutants délétés dans la partie carboxy-terminale de la protéine virale (Figure 23) :

- des mutants délétés dans le domaine kinase : BgX, XSK, BalSp, HSK et RsH, et dont le gène v-myc est encore fonctionnel ;
- un mutant délété en 3' du domaine kinase : HPv

Les mutants délétés dans le domaine kinase (acides aminés 578 à 885) sont dépourvus d'activité mitogène sur les CNR (Figure 24). L'effet du gène v-myc est cependant perceptible sous forme de foyers de cellules visibles après coloration des boîtes de culture (voir article 3 Figure 3). Par contre, le mutant HPv délété dans l'extrême partie carboxy-terminale de v-mil, dans une région ne présentant pas d'homologie avec la famille des protéines kinases (acides aminés 885 à 894) induit la prolifération des CNR (Figure 24). Les protéines codées par ces divers mutants peuvent être mises en évidence dans les cultures de CNR (Figure 25).

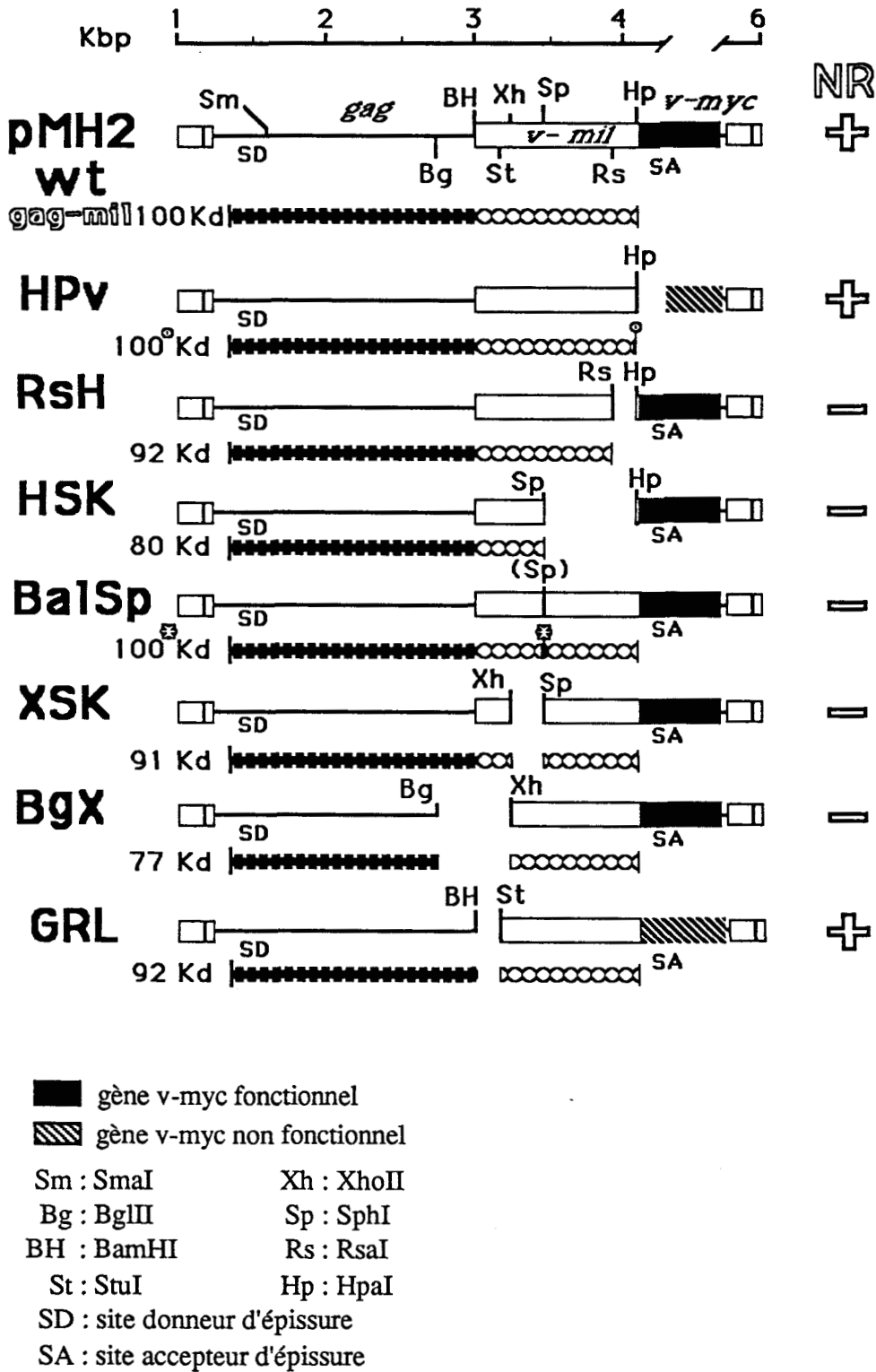


Figure 23 : Construction des mutants délétés dans différents domaines de la P100^{gag-mil}

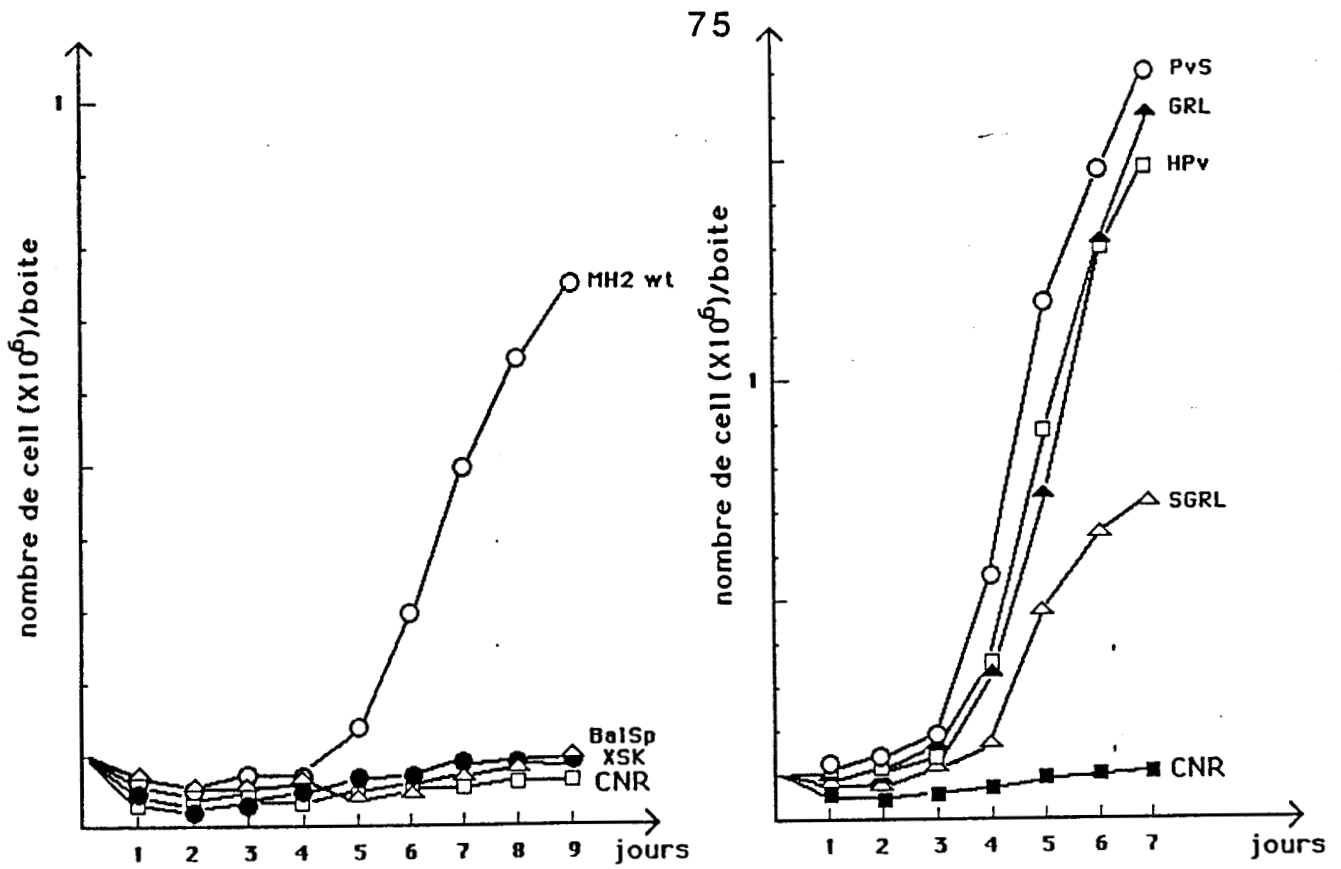


Figure 24 : activité biologique sur NR des mutants délétés dans la P100^{gag}-mil

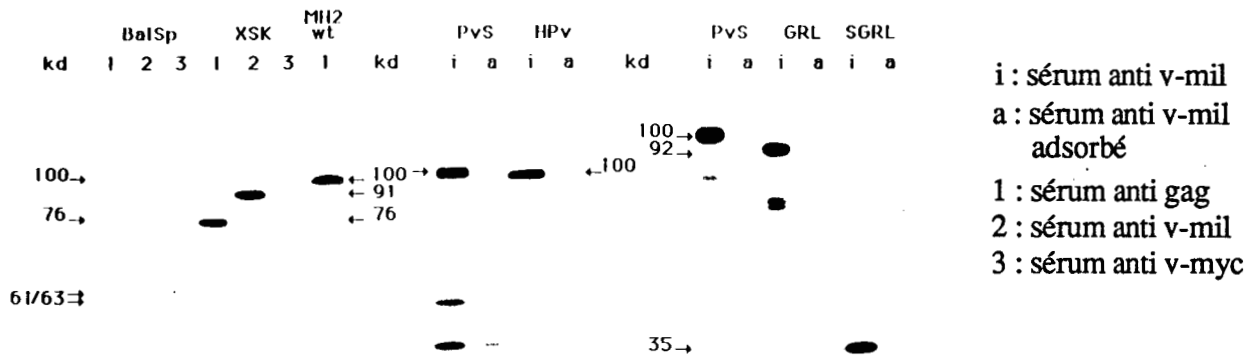
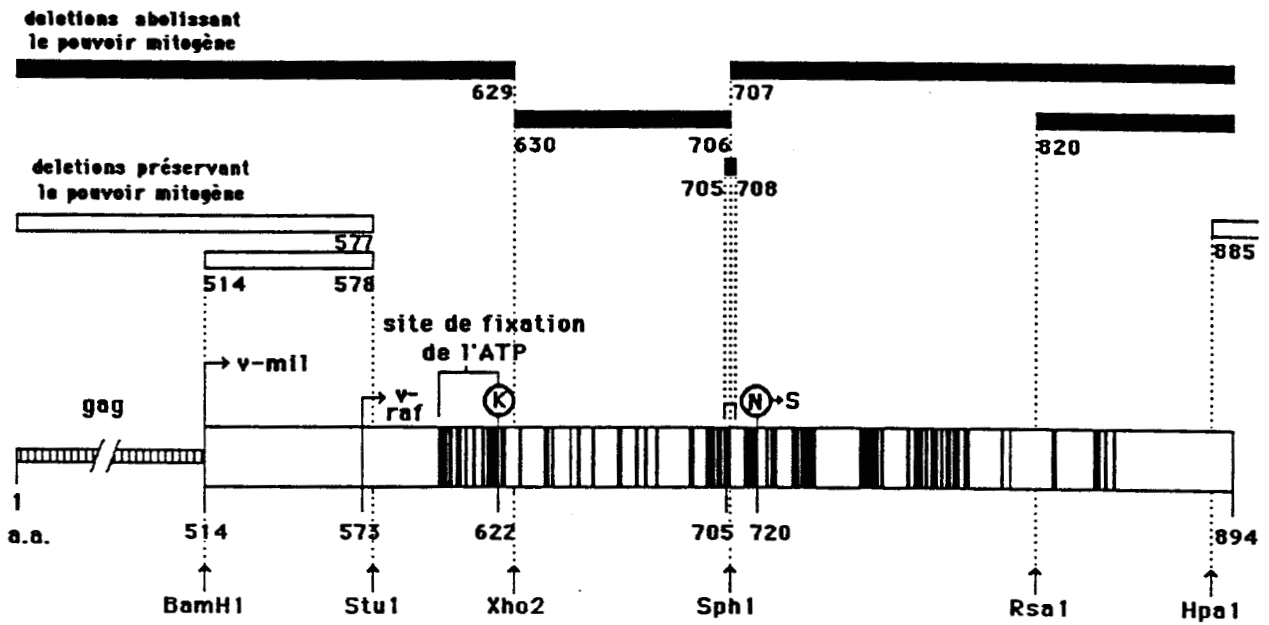


Figure 25 : analyse des protéines synthétisées dans les CNR par les mutants délétés dans la P100^{gag}-mil



homologie de séquence avec les protéines possédant une activité kinase selon les règles de conservation suivantes : G=A=V=L=I, E=D, K=R, Q=N, Y=T=S, Y=K

K : lysine impliquée dans la fixation de l'ATP

N → S correspond à la mutation ponctuelle existant dans le clone MH2-Hd

Figure 26 : Localisation des séquences v-mil essentielles pour l'activité mitogène de la P100^{gag-mil}

L'ensemble des résultats (résumés dans la Figure 26) montre que toute délétion réalisée dans le domaine kinase entre les acides aminés 578 à 885, abolit l'activité mitogène du gène v-mil sur les cellules de neurorétine.

CONCLUSION ET DISCUSSION

La partie carboxy-terminale du gène c-mil, surexprimée, est capable d'induire la prolifération des cellules de neurorétine. Cette observation concorde avec les résultats obtenus sur le gène c-raf de souris ; en effet la partie carboxy-terminale de ce gène, placée sous le contrôle d'un promoteur viral (LTR), transforme les fibroblastes murins (Mölders et al. 1985).

Les mutations acquises par le gène v-mil ne sont pas essentielles à son activité biologique, tout au moins dans le système des cellules de neurorétine aviaires. Des résultats similaires ont été obtenus avec le gène v-raf : une construction chimérique v-raf/c-raf1 transforme les cellules NIH 3T3 (Bonner et al. 1985). Ceci suggère que l'activation des gènes c-mil/raf n'est pas tributaire de mutation(s) introduite(s) dans leurs séquences codantes, contrairement à ce que l'on peut observer pour les gènes c-src (Kato et al. 1986, Levy et al. 1986) et c-neu (Bargmann et al. 1986b).

Les gènes v-mil et v-raf s'expriment tous deux sous forme de protéines de fusion P100gag-mil et P75gag-raf, ce qui pourrait suggérer un rôle joué par les séquences gag dans l'activation de ces gènes. Un tel rôle a notamment été mis en évidence dans l'activation du gène c-fps : la substitution du gène v-fps par le gène c-fps au sein du virus sarcomatogène aviaire de Fujinami (FSV), dépourvu de séquences gag, résulte en l'expression d'une protéine P98c-fps incapable de transformer les FEP ; la réinsertion des séquences gag au sein de ce virus inactif aboutit à l'expression d'une protéine de fusion P140gag-c-fps transformante sur FEP (Foster et al. 1985). Les gènes c-mil et v-mil, codant pour les protéines p35 Δ c-mil et p35 Δ v-mil induisent la prolifération des cellules de neurorétine malgré l'absence des séquences gag (mis à part les 6 premiers acides aminés du gène gag probablement présent dans les protéines p35 Δ c-mil et p35 Δ v-mil) ; ces séquences ne sont donc pas essentielles à l'activité mitogène du gène mil sur les cellules de neurorétine. Cependant, ces protéines possèdent une activité mitogène réduite, ce qui signifie que les séquences gag moduleraient l'activité mitogène de la P100gag-mil. La délétion des séquences gag pourrait entraîner des modifications dans la structure des protéines résultantes ; ces modifications structurales pourraient modifier soit l'interaction de la protéine mil avec sa (ou ses) cible(s) moléculaire(s) (modification de l'affinité par exemple), soit l'activité catalytique du gène mil (activité kinase).

L'analyse des mutants de délétion dans le gène v-mil nous révèle que les séquences 5' de v-mil, situées immédiatement en amont du domaine kinase, n'interviennent pas dans l'effet biologique induit par v-mil. Ceci n'est pas général aux oncogènes de la famille des kinases puisque, dans le cas de l'oncogène v-fps, la délétion des séquences localisées en 5' du domaine

kinase réduit l'activité transformante de ce gène sur FEP (Ariizumi et al. 1985).

Par contre, l'intégrité du domaine kinase du gène *v-mil* est requise pour la conservation de l'activité biologique sur les cellules de neurorétine. Il semble donc que l'activité sérine/thréonine-kinase de la protéine P100gag-*mil* détectée *in vitro* soit essentielle pour permettre la prolifération des cellules de neurorétine. Cette hypothèse a été étayée dans notre laboratoire par les travaux de F. Denhez qui a montré qu'un mutant de *v-mil* codant pour une P100gag-*mil* dont l'activité kinase détectée *in vitro* est abolie (par mutation ponctuelle du site de fixation de l'ATP), ne peut plus induire la prolifération des cellules de neurorétine (Denhez et al. 1988). L'intégrité structurale du domaine kinase est également essentielle pour l'activité transformante des gènes *v-erbB* (NG et al. 1986), *v-abl* (Prywes et al. 1985a) et *v-fps* (Stone et al. 1984) qui codent tous trois pour une protéine possédant une activité tyrosine-kinase.

Ainsi ce n'est pas le fruit du hasard si les virus MH2 et 3611 MSV ont transduit dans leur génome la même portion des gènes *c-mil* et *c-raf* : la portion carboxy-terminale possédant le domaine kinase.

De plus, toutes les versions transformantes des gènes *c-raf* humain et murin isolées jusqu'à présent par transfection sur NIH3T3, présentent un réarrangement de ce gène. Ce réarrangement, qui consiste en une amputation des séquences amino-terminales (remplacées par d'autres séquences), laisse intact le domaine kinase. Ces délétions semblent importantes pour obtenir l'activité transformante des gènes *mil/raf* puisque la surexpression du gène *c-raf* murin réarrangé dans sa portion amino-terminale (substituée par un autre gène cellulaire) transforme les cellules NIH3T3, alors que le gène *c-raf* normal surexprimé ne transforme pas ces cellules (Ishikawa et al. 1987a). D'autre part, des résultats préliminaires suggèrent que l'introduction dans les cellules de neurorétine de la totalité de la séquence codante de *c-mil* sous le contrôle d'un promoteur viral (LTR) est sans effet sur la prolifération de ces cellules.

L'ensemble de ces résultats permet de dégager un schéma général d'activation du gène *c-mil/raf* qui suppose une amputation de sa portion amino-terminale plutôt que l'accumulation de mutation ponctuelle. Cette portion du gène code pour une région riche en cystéine, homologue à une séquence rencontrée dans les PKC. Or, dans les PKC, cette région est localisée dans le domaine régulateur. La portion amino-terminale du gène *c-mil/raf* pourrait donc constituer un domaine de régulation, et exercer un rôle régulateur négatif sur la fonction des protéines *c-mil/raf*. L'activation de la fonction kinase de ces protéines pourrait être réalisée par la fixation de molécules effectrices sur ce domaine régulateur comme dans le cas par exemple de la PKC où la fixation de diacylglycérol (en présence de Ca^{++} et de phospholipides) sur le domaine régulateur active le domaine kinase de cette protéine (revue de Bell 1986), ou de la protéine kinase GMPc dépendante où la fixation de GMPc au domaine régulateur N terminal entraîne un changement conformationnel qui active le domaine kinase C terminal (Takio et al. 1984).

Mais l'activité kinase de la PKC et de la protéine kinase GMPc dépendante peut être également activée *in vitro* par une protéolyse séparant le domaine régulateur du domaine kinase

(Inoue et al. 1977, Takio et al. 1984). Or, la délétion des séquences amino-terminales lors de la transduction du gène c-mil/raf ou lors des réarrangements de ce gène, laisse intact le domaine kinase mais ôte ou change (dans le cas de fusion avec des séquences "exogènes") "le domaine régulateur". Ceci pourrait donc aboutir à une activité sérine/thréonine-kinase constitutive des protéines c-mil/raf tronquées. La possibilité que l'amputation N terminale de ces protéines influencent leur activité kinase concorde avec les travaux récents et préliminaires de Schultz et al. (1988) qui semblent montrer que la p48^{c-raf}, codée par le gène c-raf de souris LTR activé (Mölders et al. 1985), est plus phosphorylée *in vitro* que la protéine p74^{c-raf} codée par le gène entier. Ces résultats nécessitent cependant d'être confirmés, car on peut aussi envisager la possibilité que la délétion ou le changement des séquences amino-terminales modifient la localisation et la (ou les) cible(s) moléculaire(s) des protéines c-mil/raf. La vérification de cette hypothèse nécessite l'identification des substrats des protéines mil/raf normales et activées.

CONCLUSION

Dans ce travail, nous avons isolé et caractérisé l'homologue cellulaire du gène v-mil chez le poulet. Les résultats obtenus, confirmés par d'autres auteurs, indiquent que v-mil représente une version tronquée du gène c-mil de poulet. v-mil résulte notamment de la transduction de la portion carboxy-terminale de ce gène et présente des mutations comparé à son homologue cellulaire.

On pouvait donc concevoir deux mécanismes d'activation de ce gène :

- l'activation par amputation des séquences amino-terminales,
- l'activation par introduction de mutations ponctuelles.

Pour tenter de développer un modèle rendant compte du mécanisme d'activation du gène c-mil, nous avons étudié l'activité de la portion carboxy-terminale du gène c-mil dans un système biologique où un effet propre au gène v-mil a pu être mis en évidence : il s'agit des cellules de neurorétine aviaire.

Les résultats obtenus nous ont permis de proposer un modèle d'activation du gène c-mil par amputation de son extrémité amino-terminale, plutôt que par l'accumulation de mutations ponctuelles.

La portion carboxy-terminale du gène c-mil qui se révèle suffisante pour induire la prolifération des cellules de neurorétine, comprend le domaine kinase. En construisant des mutants de délétion dans différentes régions de la protéine v-mil (P100gag-mil), nous avons montré que la portion de cette protéine qui correspond strictement au domaine kinase de v-mil est essentielle et suffisante pour l'activité mitogène sur les cellules de neurorétine.

En isolant des ADNc c-mil, nous avons également montré que le gène c-mil peut coder, par l'intermédiaire d'un mécanisme d'épissage alterné, pour au moins deux protéines distinctes. Bien que leurs fonctions ne soient pas encore connues, ces protéines pourraient, comme la protéine v-mil et ainsi que le suggèrent les homologies de séquence avec le domaine catalytique des protéines kinases, posséder une activité sérine/thréonine kinase. Diverses questions se posent alors: Quelle est (ou sont) leur(s) cible(s) ? Comment sont-elles régulées ? Diverses hypothèses peuvent être envisagées. On peut supposer :

- que ces protéines kinases possèdent une (ou des) cible(s) commune(s), mais sont stimulées par des effecteurs distincts.
- que ces protéines vont être stimulées par le(s) même(s) effecteur(s), mais qu'elles agissent sur des cibles distinctes.
- que les protéines c-mil répondent à des stimuli distincts et possèdent des cibles différentes.

Dans tous les cas, on peut de plus imaginer :

- que les protéines co-existent dans la cellule, ce qui permettrait à la cellule soit de répondre à deux stimuli différents pour le même effet (dans le cas de la première hypothèse), soit d'élargir la cascade d'événements déclenchée par un seul stimulus (dans le cas de la seconde hypothèse).
- que les effecteurs ou les cibles soient spécifiques selon les cellules, ce qui serait en corrélation avec la présence d'une seule espèce de protéine dans ces cellules. On peut à ce propos rappeler que l'on observe une expression différentielle des ARN messagers codant pour ces protéines dans les tissus.

Quoiqu'il en soit, le mécanisme d'épissage alterné apparaît comme un excellent mécanisme de diversification des protéines. Ce mécanisme s'étend également à d'autres gènes codant pour des protéines kinases, tel le gène codant pour les PKC, le gène c-*abl* ainsi que le gène c-*src*. Pour le gène c-*src* notamment, le mécanisme d'épissage se révèle avoir une spécificité tissulaire.

La conservation de séquence, observée dans le domaine catalytique des protéines kinases, a permis la recherche et l'isolement de nouveaux membres. Les protéines kinases ont ainsi été groupées en sous-familles comprenant des membres très apparentés. Il existe ainsi la famille *src* (comprenant les protéines *src*, *yes*, *lck*, *fgr*, *hck*, *fyn*, *lyn*), la famille *abl* (protéines *abl* et *arg*), la famille *fps* (protéines *fps*, NCP94, TKR11 et TKR16), la famille des récepteurs apparentés à l'EGF (récepteur de l'EGF, protéine *neu/erbB2*), à l'insuline (récepteur de l'insuline, récepteur de l'IGF-1, protéine *ros*, *met*, *trk*), ou au PDGF (récepteur du PDGF, récepteur du CSF-1, protéine *kit*) (Hunter et al. 1987). Le gène c-*mil/raf* fait également partie d'une famille de gènes comprenant au moins deux membres caractérisés, le gène c-*mil/raf* et le gène A-*raf* (ou *pks*). Il est vraisemblable que cette famille comporte d'autres membres puisque nous avons isolé au laboratoire de nouveaux gènes homologues à v-*mil*, localisés chez l'homme sur le chromosome 4 et les chromosomes 6 et 17. Etant donné les homologies existantes entre le gène c-*mil/raf* et le gène A-*raf* dans la région amino-terminale, qui pourrait constituer un domaine régulateur, on peut concevoir que ces gènes sont soumis à des mécanismes de régulation analogues et sont ainsi susceptibles d'être activés par un mécanisme similaire à celui du gène c-*mil/raf*. Un tel mécanisme d'activation semble en effet s'appliquer au gène A-*raf* et on peut penser qu'il pourrait aussi s'appliquer aux nouveaux membres isolés.

Il est probable que le produit du gène v-*mil* agisse sur les cellules de neurorétine et les macrophages par l'intermédiaire de son activité kinase. Cependant sa cible moléculaire n'est pas encore identifiée. Il est possible que les protéines virales possèdent la même cible que les protéines cellulaires mais que leur régulation soit perturbée. C'est à dire que, contrairement aux protéines cellulaires, les protéines v-*mil* agiraient d'une manière constitutive, indépendamment de la stimulation par un effecteur, d'une façon analogue à la protéine v-*erbB* ou v-*fms*. Cependant, on peut aussi envisager que les protéines virales et cellulaires possèdent des cibles distinctes. La phosphorylation imprévue d'une protéine cellulaire par la protéine kinase v-*mil* serait alors à l'origine des effets biologiques observés tels que l'induction de la prolifération des cellules de neurorétine ou la sécrétion de cMGF par les macrophages.

L'identification des cibles moléculaires des protéines virales et cellulaires ainsi que de leurs effecteurs devraient nous permettre de répondre aux questions posées.

BIBLIOGRAPHIE

- ADAMS,S.B., D.BOETTIGER, R.J.FOCHT, H.HOLTZER and M.PACIFI. 1982. Regulation of the synthesis of extracellular matrix components in chondroblasts transformed by a temperature-sensitive mutant of Rous sarcoma virus.
Cell **30** : 373-384.
- ADKINS,B., A.LEUTZ and T.GRAF. 1984. Autocrine growth induced by src-related oncogenes in transformed chicken myeloid cells.
Cell **39** : 439-445.
- ALEMA,S., F.TATO and D.BOETTIGER. 1985. myc and src oncogenes have complementary effects on cell proliferation and expression of specific extracellular matrix components in definitive chondroblasts.
Mol. Cell. Biol. **5** : 538-544.
- ALEXANDER,R.W., C.MOSCOVICI and P.K.VOGT. 1979. Avian oncovirus Mill Hill N°2 : pathogenicity in chickens.
J. Natl. Canc. Inst. **62** : 359-365.
- ANDREWS,G.K., M.A.HARDING, J.P.CALVET and E.D.ADAMSON. 1987. The heat shock response in HeLa cells is accompanied by elevated expression of the c-fos proto-oncogene.
Mol. Cell. Biol. **7** : 3452-3458.
- ARAI,N., D.NOMURA, K.YOKOTA, D.WOLF, E.BRILL, O.SHOHAT and V.ROTTER. 1986. Immunologically distinct p53 molecules generated by alternative splicing.
Mol. Cell. Biol. **6** : 3232-3239.
- ARIIZUMI,K. and M.SHIBUYA. 1985. Construction and biological analysis of deletion mutants of Fujinami sarcoma virus : 5'-fps sequence has a role in the transforming activity.
J. Virol. **55** : 660-669.
- BALTIMORE,D. 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumor viruses.
Nature **226** : 1209-1211.
- BARBACID,M. 1987. ras genes.
Ann. Rev. Biochem. **56** : 779-827.
- BARGMANN,C.I., M.C.HUNG and R.A.WEINBERG. 1986a. The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein.
Nature **319** : 226-230.
- BARGMANN,C.I., M.C.HUNG and R.A.WEINBERG. 1986b. Multiple independent activations of the neu oncogene by a point mutation altering the transmembrane domain of p185.
Cell **45** : 649-657.
- BEARD,J.W. 1980. Biology of avian oncornaviruses.
In : G.Klein (ed.), Viral oncology. Raven Press, New York, p 842.
- 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.
- BECHADE,C., G.DAMBRINE, T.DAVID-PFEUTY, E.ESNAULT and G.CALOTHY. 1988. Transformed and tumorigenic phenotypes induced by avian retroviruses containing the v-mil oncogene.
J. Virol. **62** : 1211-1218.

- BECK, T.W., M.HULEIHEL, M.GUNNELL, T.I.BONNER and U.R.RAPP. 1987. The complete coding sequence of the human A-raf-1 oncogene and transforming activity of a human A-raf carrying retrovirus. Nucleic Acids Res. **15** : 595-609.
- BEGG, A.M. 1927. A filtrable endothelioma of the fowl. Lancet **2** : 912-915.
- BELL, R.M. 1986. Protein kinase C activation by diacylglycerol second messengers. Cell **45** : 631-632.
- BEN-NERIAH, Y., G.Q.DALEY, A.M.MES-MASSON, O.N.WITTE and D.BALTIMORE. 1986. The chronic myelogenous leukemia-specific p210 protein is the product of the bcr/abl hybrid gene. Science **233** : 212-214.
- BERG, J.M. 1986. Potential metal-binding domains in nucleic acid binding proteins. Science **232** : 485-486.
- BERTICS, P.J. and G.N.GILL. 1985. Self-phosphorylation enhances the protein-tyrosine kinase activity of the epidermal growth factor receptor. J. Biol. Chem. **260** : 14642-14647.
- BESMER, P., J.E.MURPHY, P.G.GEORGE, F.QIU, P.J.BERGOLD, L.LEDERMAN, H.W.SNYDER Jr, D.BRODEUR, E.E.ZUCKERMAN 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.DÖDERLEIN, 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., M.J.HAYMAN, M.B.RAINES, H.J.KUNG and B.VENNSTRÖM. 1986. Rous-associated virus 1-induced erythroleukemic cells exhibit a weakly transformed phenotype *in vitro* and release c-erbB-containing retroviruses unable to transform fibroblasts. J.Virol. **57** : 1127-1138.
- BIEGALKE, B. and M.LINIAL. 1987. Retention or loss of v-mil sequences after propagation of MH2 virus *in vivo* or *in vitro*. J. Virol. **61** : 1949-1956.
- 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 retroviruses. Ann. Rev. Biochem. **52** : 301-354.
- BLASI, E., B.J.MATHIESON, L.VAREGIO, J.L.CLEVELAND, P.A.BORCHERT and U.R.RAPP. 1985. Selective immortalization of murine macrophages from fresh bone marrow by a raf/myc recombinant murine retrovirus. Nature **318** : 667-671.
- BOHMANN, D., T.J.BOS, A.ADMON, T.NISHIMURA, P.K.VOGT and R.TJIAN. 1987. Human proto-oncogene c-jun encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1. Science **238** : 1386-1392.

- BONNER, T.I., S.O'BRIEN, W.NASH, U.R.RAPP, C.MORTON and P.LEDER. 1984. The human homologs of the raf (mil) oncogene are located on human chromosomes 3 and 4. *Science* **223** : 71-74.
- BONNER, T.I., S.B.KERBY, P.SUTRAVE, M.A.GUNNELL, G.MARK and U.R.RAPP. 1985. Structure and biological activity of human homologs of the raf/mil oncogene. *Mol. Cell. Biol.* **5** : 1400-1407.
- BONNER, T.I., H.OPPERMANN, P.SEEBURG, S.B.KERBY, M.A.GUNNELL, A.C.YOUNG and U.R.RAPP. 1986. The complete coding sequence of the human raf oncogene and the corresponding structure of the c-raf 1 gene. *Nucleic Acids Res.* **14** : 1009-1015.
- BREITBART, R.E., A.ANDREADIS and B.NADAL-GINARD. 1987. Alternative splicing : a ubiquitous mechanism for the generation of multiple protein isoforms from single genes. *Ann. Rev. Biochem.* **56** : 467-495.
- BRENNER, S. 1987. Phosphotransferase sequence homology. *Nature* **329** : 21.
- BRYANT, D.L. and J.T.PARSONS. 1984. Amino acid alterations within a highly conserved region of the Rous sarcoma virus src gene product pp60^{src} inactivate tyrosine protein kinase activity. *Mol. Cell. Biol.* **4** : 862-866.
- BUNTE, T., I.GREISER-WILKE and K.MOELLING. 1983. The transforming protein of the MC29-related virus CMII is a nuclear DNA-binding protein whereas MH2 codes for a cytoplasmic RNA-DNA binding polyprotein. *EMBO J.* **2** : 1087-1092.
- CARPENTER G. 1987. Receptors for epidermal growth factor and other polypeptide mitogens. *Ann. Rev. Biochem.* **56** : 881-914.
- CARTWRIGHT, C.A., W.ECKHART, S.SIMON and P.L.KAPLAN. 1987. Cell transformation by pp60^{c-src} mutated in the carboxy-terminal regulatory domain. *Cell* **49** : 83-91.
- CASALBORE, P., E.AGOSTINI, S.ALEMA., G.FALCONE and F.TATO. 1987. The v-myc oncogene is sufficient to induce growth transformation of chick neuroretina cells. *Nature* **326** : 188-190.
- CHAN, A., H.KING, P.TEMPEST, E.DEAKIN, C.COOPER and P.BROOKES. 1987. Primary structure of the met protein tyrosine kinase domain. *Oncogene* **1** : 229-233.
- CHANG, E.H., M.E.FURTH, E.M.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** : 479-483.
- CHEN, W.S., C.S.LAZAR, M.POENIE, R.Y.TSIEN, G.N.GILL and M.G.ROSENFELD. 1987. Requirement for intrinsic protein tyrosine kinase in the immediate and late actions of the EGF receptor. *Nature* **328** : 820-823.
- CHIU, I.M., E.P.REDDY, D.GIVOL, K.C.ROBBINS, S.R.TRONICK and S.A.AARONSON. 1984. Nucleotide sequence analysis identifies the human c-sis proto-oncogene as a structural gene for platelet-derived growth factor. *Cell* **37** : 123-129.

- CHOU,C.K., T.J.DULL, D.S.RUSSELL, R.GHERZI, D.LEBWOHL, A.ULLRICH and O.M.ROSEN. 1987. Human insulin receptors mutated at the ATP-binding site lack protein tyrosine kinase activity and fail to mediate postreceptor effects of insulin. *J. Biol. Chem.* **262** : 1842-1847.
- CLEVELAND,J.L., H.W.JANSEN, K.BISTER, T.N.FREDRICKSON, H.C.MORSE III, J.N.IHLE and U.R.RAPP. 1986. Interaction between raf and myc oncogenes in transformation *in vivo* and *in vitro*. *J. Cell. Biochem.* **30** : 195-218.
- 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.
- COLLET,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 src gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76** : 3159-3163.
- COOPER,J.A. and C.S.KING. 1986. Dephosphorylation or antibody binding to the carboxy terminus stimulates pp60^{c-src}. *Mol. Cell. Biol.* **6** : 4467-4477.
- COURTNEIDGE,S.A. 1985. Activation of the pp60^{c-src} kinase by middle T antigen binding or by dephosphorylation. *EMBO J.* **4** : 1471-1477.
- COUSSENS,P.M., J.A.COOPER, T.HUNTER and D.SHALLOWAY. 1985. Restriction of the *in vitro* and *in vivo* tyrosine protein kinase activities of pp60^{c-src} relative to pp60^{v-src}. *Mol. Cell. Biol.* **5** : 2753-2763.
- COUSSENS,L., P.J.PARKER, L.RHEE, T.L.YANG-FENG, E.CHEN, M.D. WATERFIELD, U.FRANCKE and A.ULLRICH. 1986a. Multiple, distinct forms of bovine and human protein kinase C suggest diversity in cellular signaling pathways. *Science* **233** : 859-866.
- COUSSENS,L., C.Van BEVEREN, D.SMITH, E.CHEN, R.L.MITCHELL, C.M.ISACKE, I.M.VERMA and A.ULLRICH. 1986b. Structural alteration of viral homologue of receptor proto-oncogene fms at carboxyl terminus. *Nature* **320** : 277-280.
- CRISANTI-COMBES,P., A.M.LORINET, A.GIRARD, B.PESSAC, M.WASSEFF and G.CALOTHY. 1982. Expression of neuronal markers in chick and quail embryo neuroretina cultures infected with Rous sarcoma virus. *Cell. Diff.* **11** : 45-54.
- CROSS,F.R. and H.HANAFUSA. 1983. Local mutagenesis of Rous sarcoma virus : the major sites of tyrosine and serine phosphorylation of p60^{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. and J.I.MORGAN. 1985. Superinduction of c-fos by nerve growth factor in the presence of peripherally active benzodiazepines. *Science* **229** : 1265-1268.

- DAVIS,R.L., J.B.KONOPKA and O.N.WITTE. 1985. Activation of the c-abl oncogene by viral transduction or chromosomal translocation generates altered c-abl proteins with similar *in vitro* kinase properties.
Mol. Cell. Biol. **5** : 204-213.
- DE LARCO, J.E. and G.J.TODARO. 1978. Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **75** : 4001-4005.
- DELLI BOVI,P., A.M.CURATOLA, F.G.KERN, A.GRECO, M.ITTSMANN and C.BASILICO. 1987. An oncogene isolated by transfection of Kaposi's sarcoma DNA encodes a growth factor that is a member of the FGF family.
Cell **50** : 729-737.
- DENHEZ.F., B.HEIMANN, L.D'AURIOL, T.GRAF, M.COQUILLAUD, J.COLL, F.GALIBERT, K.MOELLING, D.STEHELIN and J.GHYSDAEL. 1988. Replacement of lys 622 in the ATP binding domain of P100gag-mil abolishes the *in vitro* autophosphorylation of the protein and the biological properties of the v-mil oncogene of MH2 virus.
EMBO Journal **7** : 541-546.
- DI FIORE,P.P., J.H.PIERCE, T.P.FLEMING, R.HAZAN, A.ULLRICH, C.R.KING, J.SCHLESSINGER and S.A.AARONSON. 1987a. Overexpression of the human EGF receptor confers an EGF-dependent transformed phenotype to NIH 3T3 cells.
Cell **51** : 1063-1070.
- DI FIORE,P.P., J.H.PIERCE, M.H.KRAUS, O.SEGATTO, C.R.KING and S.A.AARONSON. 1987b. erbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells.
Science **237** : 178-182
- DISTEL,R.J., H.S.RO, B.S.ROSEN, D.L.GROVES and B.M.SPIEGELMAN. 1987. Nucleoprotein complexes that regulate gene expression in adipocyte differentiation : direct participation of c-fos.
Cell **49** : 835-844.
- DOWNWARD,J., P.PARKER and M.D.WATERFIELD. 1984a. Autophosphorylation sites on the epidermal growth factor receptor.
Nature **311** : 483-485
- DOWNWARD,J., Y.YARDEN, E.MAYES, G.SCRACE, N.TOTTY, P.STOCKWELL, A.ULLRICH, J.SCHLESSINGER and M.D.WATERFIELD. 1984b. Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erbB oncogene protein sequences.
Nature **307** : 521-527.
- DOWNWARD,J., M.D.WATERFIELD and P.J.PARKER. 1985. Autophosphorylation and protein kinase C phosphorylation of the epidermal growth factor receptor.
J. Biol. Chem. **260** : 14538-14546.
- 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. USA. **82** : 6980-6984.
- DUTERQUE-COQUILLAUD,M., D.LEPRINCE, A.FLOURENS, C.HENRY, J.GHYSDAEL, B.DEBUIRE and D.STEHELIN. 1988. Cloning and expression of chicken p54^{c-ets} cDNAs : the first p54^{c-ets} coding exon is located into the 40.0 Kbp genomic domain unrelated to v-ets.
Oncogene Res. (sous presse).

- EBINA, Y., E. ARAKI, M. TAIRA, F. SHIMADA, M. MORI, C. S. CRAIK, K. SIDDLER, S. B. PIERCE, R. A. ROTH and W. J. RUTTER. 1987. Replacement of lysine residue 1030 in the putative ATP-binding region of the insulin receptor abolishes insulin- and antibody-stimulated glucose uptake and receptor kinase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84** : 704-708.
- EDELMAN, A. M., D. K. BLUMENTHAL and E. G. KREBS. 1987. Protein serine/threonine kinases. *Ann. Rev. Biochem.* **56** : 567-613.
- EDWARDS, S. A. and H. FAN. 1980. Sequence relationship of glycosylated and unglycosylated gag polyproteins of Moloney murine leukemia virus. *J. Virol.* **35** : 41-51.
- ELLIS, L., E. CLAUSER, D. O. MORGAN, M. EDERY, R. A. ROTH and W. J. RUTTER. 1986. Replacement of insulin receptor tyrosine residues 1162 and 1163 compromises insulin-stimulated kinase activity and uptake of 2-deoxyglucose. *Cell* **45** : 721-732.
- EVANS, R. M. and S. M. HOLLENBERG. 1988. Zinc fingers : Gilt by association. *Cell* **52** : 1-3.
- FLORDELLIS, C. S., N. C. KAN, J. A. LAUTENBERGER, K. P. SAMUEL, C. F. GARON and T. S. PAPAS. 1985. Analysis of the cellular proto-oncogene mht/raf : relationship to the 5' sequences of v-mht in avian carcinoma virus MH2 and v-raf in murine sarcoma virus 3611. *Virology* **141** : 267-274.
- FOSTER, D. A., M. SHIBUYA and H. HANAFUSA. 1985. Activation of the transformation potential of the cellular fps gene. *Cell* **42** : 105-115.
- FOSTER, D. A., J. B. LEVY, G. Q. DALEY, M. C. SIMON and H. HANAFUSA. 1986. Isolation of chicken cellular DNA sequences with homology to the region of viral oncogenes that encodes the tyrosine kinase domain. *Mol. Cell. Biol.* **6** : 325-331.
- FRYKBERG, L., T. GRAF and B. VENNSTRÖM. 1987. The transforming activity of the chicken c-myc gene can be potentiated by mutations. *Oncogene* **1** : 415-421.
- FUKUI, M., T. YAMAMOTO, S. KAWAI, K. MARUO and K. TOYOSHIMA. 1985. Detection of a raf-related and two other transforming DNA sequences in human tumors maintained in nude mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82** : 5954-5958.
- FUKUI, M., T. YAMAMOTO, S. KAWAI, F. MITSUNOBU and K. TOYOSHIMA. 1987. Molecular cloning and characterization of an activated human c-raf-1 Gene. *Mol. Cell. Biol.* **7** : 1776-1781.
- GALIBERT, F., S. DUPONT de DINECHIN, M. RIGHI and D. STEHELIN. 1984. The second oncogene mil of avian retrovirus MH2 is related to the src gene family. *EMBO J.* **3** : 1333-1338.
- GAMETT, D. C., S. E. TRACY and H. L. ROBINSON. 1986. Differences in sequences encoding the carboxyl-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.

- GAZZOLO, L., C. MOSCOVICI, M. G. MOSCOVICI and J. SAMARUT. 1979. Response of hemopoietic cells to avian acute leukemia viruses : Effects on the differentiation of the target cells.
Cell 16 : 627-638.
- GIBBS, J. B., I. S. SIGAL and E. M. SCOLNICK. 1985. Biochemical properties of normal and oncogenic ras p21.
TIBS 350-353.
- GILMORE, T., J. E. DeCLUE 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.
- GIONTI, E., O. CAPASSO and R. CANCEDDA. 1983. The culture of chick embryo chondrocytes and the control of their differentiated functions *in vitro*.
J. Biol. Chem. 258 : 7190-7194.
- GLUZMAN, Y. 1981. SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants.
Cell 23 : 175-182.
- GONZATTI-HACES, M., A. SETH, M. PARK, T. COPELAND, S. OROSZLAN and G. G. VANDE WOUDE. 1988. Characterization of the TPR-MET oncogene p65 and the MET protooncogene p140 protein-tyrosine kinases.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 : 21-25.
- GOULD, K. L., J. R. WOODGETT, J. A. COOPER, J. E. BUSS, D. SHALLOWAY and T. HUNTER. 1985. Protein kinase C phosphorylates pp60^{SRC} at a novel site.
Cell 42 : 849-857.
- GOUSTIN, A. S., E. B. LEOF, G. D. SHIPLEY and H. L. MOSES. 1986. Growth factors and cancer.
Cancer Res. 46 : 1015-1029.
- GRAF, T. and H. BEUG. 1978. Avian leukemia viruses interaction with their target cells *in vivo* and *in vitro*.
Biochim. Biophys. Acta. 516 : 269-299.
- GRAF, T. and D. STEHELIN. 1982. Avian leukaemia viruses oncogenes and genome structure.
Biochim. Biophys. Acta 651 : 245-271.
- GRAF, T., F. VON WEIZSAECKER, S. GRIESER, J. COLL, D. STEHELIN, T. PATSCHINSKY, 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.
- GRAZIANO, S. L., B. Y. COWAN, D. N. CARNEY, C. R. BRYKE, N. S. MITTER, B. E. JOHNSON, G. E. MARK, A. T. PLANAS, J. J. CATINO, R. L. COMIS. 1987. Small cell lung cancer cell line derived from a primary tumor with a characteristic deletion of 3p.
Cancer Res. 47 : 2148-2155.
- 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, brc, on chromosome 22.
Cell 36 : 93-99.

- GULLICK, W.J., J.DOWNWARD and M.D.WATERFIELD. 1985. Antibodies to the autophosphorylation sites of the epidermal growth factor receptor protein-tyrosine kinase as probes of structure and function.
EMBO J. 4 : 2869-2877.
- HAGAG, N., S.HALEGOUA and M.VIOLA. 1986. Inhibition of growth factor-induced differentiation of PC12 cells by microinjection of antibody to ras p21.
Nature 319 : 680-682.
- HANNINK, M. and D.J.DONOGHUE. 1985. Lysine residue 121 in the proposed ATP-binding site of the v-mos protein is required for transformation.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 : 7894-7898.
- HEISTERKAMP, N., J.R.STEPHENSON, J.GROFFEN, P.F.HANSEN, A.de KLEIN, C.R.BARTRAM and G.GROSVELD. 1983. Localization of the c-abl oncogene adjacent to a translocation break point in chronic myelocytic leukaemia.
Nature 306 : 239-242.
- HENRY, C., M.COQUILLAUD, S.SAULE, D.STEHELIN and B.DEBUIRE. 1985. The four C-Terminal amino acids of the v-erbA polypeptide are encoded by an intronic sequence of the v-erbB oncogene.
Virology 140 : 179-182.
- HOLT, J.T., T.VENKAT GOPAL, A.D.MOULTON and A.W.NIENHUIS. 1986. Inducible production of c-fos antisense RNA inhibits 3T3 cell proliferation.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83 : 4794-4798.
- HONEGGER, A.M., D.SZAPARY, A.SCHMIDT, R.LYALL, E. VAN OBBERGHEN, T.J.DULL, A.ULLRICH and J.SCHLESSINGER. 1987. A mutant epidermal growth factor receptor with defective protein tyrosine kinase is unable to stimulate proto-oncogene expression and DNA synthesis.
Mol. Cell. Biol. 7 : 4568-4571.
- HOUSEY, G., M.JOHNSON, W.L.WENDY HSIO, C.O'BRIAN, J.MURPHY, P.KIRSCHMEIER and I.B.WEINSTEIN. 1988. Overproduction of protein kinase C causes disordered growth control in rat fibroblasts.
Cell 52 : 343-354.
- HU, S.S.F., C.MOSCOVICI and P.K.VOGT. 1978. The defectiveness of Mill-Hill-2, a carcinoma - inducing avian oncovirus.
Virology 89 : 162-178.
- HUANG, J.S., S.S.HUANG and T.F.DEUEL. 1984. Transforming protein of simian sarcoma virus stimulates autocrine growth of SSV-transformed cells through PDGF cell-surface receptors.
Cell 39 : 79-87.
- HUANG, C.C., N.HAY and J.M.BISHOP. 1986. The role of RNA molecules in transduction of the proto-oncogene c-fps.
Cell 44 : 935-940.
- HUEBNER, K., A.AR-RUSHDI, C.A.GRIFFIN, M.ISOBE, C.KOZAK, B.S.EMANUEL, L.NAGARAJAN, J.L.CLEVELAND, T.I.BONNER, M.D.GOLDSBOROUGH, C.M.CROCE and U.RAPP. 1986. Actively transcribed genes in the raf oncogene group, located on the X chromosome in mouse and human.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 : 3934-3938.
- HULEIHEL, M., M.GOLDSBOROUGH, J.CLEVELAND, M.GUNNELL, T.BONNER and U.R.RAPP. 1986. Characterization of murine A-raf, a new oncogene related to the v-raf oncogene.
Mol. Cell. Biol. 6 : 2655-2662.

- HUNT,S.P., A.PINI and G.EVAN. 1987. Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation.
Nature 328 : 632-634.
- HUNTER,T. and J.A.COOPER. 1985. protein-tyrosine kinases.
Ann. Rev. Biochem. 54 : 897-930.
- HUNTER,T. 1987. A thousand and one protein kinases.
Cell 50 : 823-829.
- 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 : 4424-4428.
- IBA,H., F.R.CROSS, E.A.GARBER and H.HANAFUSA. 1985. Low level of cellular protein phosphorylation by nontransforming overproduced p60^{c-src}.
Mol. Cell. Biol. 5 : 1058-1066.
- IGUCHI-ARIGA,S.M.M., T.ITANI, Y.KIJI and H.ARIGA. 1987. Possible function of the c-myc product : promotion of cellular DNA replication.
EMBO J. 6 : 2365-2371.
- IKAWA,S., K.HAGINO-YAMAGISHI, S.KAWAI, T.YAMAMOTO and K.TOYOSHIMA. 1986. Activation of the cellular src gene by transducing retrovirus.
Mol. Cell. Biol. 6 : 2420-2428.
- INOUE,M., A.KISHIMOTO, Y.TAKAI and Y.NISHIZUKA. 1977. Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues.
J. Biol. Chem. 252 : 7610-7616.
- ISHIKAWA,F., F.TAKAKU, K.HAYASHI, M.NAGAO and T.SUGIMURA. 1986. Activation of rat c-raf during transfection of hepatocellular carcinoma DNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 : 3209-3212.
- ISHIKAWA,F., F.TAKAKU, M.NAGAO and T.SUGIMURA. 1987a. Rat c-raf oncogene activation by a rearrangement that produces a fused protein.
Mol. Cell. Biol. 7 : 1226-1232.
- ISHIKAWA,F., F.TAKAKU., M.NAGAO and T.SUGIMURA. 1987b. The complete primary structure of the rat A-raf cDNA coding region : conservation of the putative regulatory regions present in rat c-raf.
Oncogene Res. 1 : 243-253.
- JANSEN,H.W., B.RÜCKERT, R.LURZ, and K.BISTER. 1983. Two unrelated cell-derived sequences in the genome of avian leukemia and carcinoma inducing retrovirus MH2.
EMBO J. 2 : 1969-1975.
- JANSEN,H.W., R.LURZ, K.BISTER, T.I.BONNER, G.E.MARK and U.R.RAPP. 1984a. Homologous cell-derived oncogenes in avian carcinoma virus MH2 and murine sarcoma virus 3611.
Nature 307 : 281-284.
- JANSEN,H.W., C.TRACHMANN and K.BISTER. 1984b. Structural relationship between the chicken proto-oncogene c-mil and the retroviral oncogene v-mil.
Virology 137 : 217-224.
- JANSEN,H.W. and K.BISTER. 1985. Nucleotide sequence analysis of the chicken gene c-mil, the progenitor of the retroviral oncogene v-mil.
Virology 143 : 359-367.

- JANSEN, H.W., T.PATSCHINSKY, N.WALTHER, R.LURZ and K.BISTER. 1985. Molecular and biological properties of MH2D12, a spontaneous mil deletion mutant of avian oncovirus MH2. *Virology* **142** : 248-262.
- JOHANSSON, A., C.H.HELDIN, A.WASTESON, B.WESTERMARK, T.F.DEUEL, J.S.HUANG, P.H.SEEBURG, A.GRAY, A.ULLRICH, G.SCRACE, P.STROOBANT and M.D.WATERFIELD. 1984. The c-sis gene encodes a precursor of the β chain of platelet-derived growth factor. *EMBO J.* **3** : 921-928.
- JOHANSSON, A., C.BETSHOLTZ, K.VONderHELM, C.H.HELDIN and B.WESTERMARK. 1985. Platelet-derived growth factor agonist activity of a secreted form of the v-sis oncogene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82** : 1721-1725.
- JOVE, R., S.KORNBLUTH and H.HANAFUSA. 1987. Enzymatically inactive p60^{c-src} mutant with altered ATP-binding site is fully phosphorylated in its carboxy-terminal regulatory region. *Cell* **50** : 937-943.
- KAMPS, M.P., S.S.TAYLOR and B.M.SEFTON. 1984. Direct evidence that oncogenic tyrosine kinases and cyclic AMP-dependent protein kinase have homologous ATP-binding sites. *Nature* **310** : 589-592.
- KAN, N.C., C.S.FLORDELLIS, C.F.GARON, P.H.DUESBERG and T.S.PAPAS. 1983. Avian carcinoma virus MH2 contains a transformation-specific sequence, mht, and shares the myc sequence with MC29, CMII, and OK10 viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80** : 6566-6570.
- KAN, N.C., C.S.FLORDELLIS, G.E.MARK, P.H.DUESBERG and T.S.PAPAS . 1984a. A common onc gene sequence transduced by avian carcinoma virus MH2 and by murine sarcoma virus 3611. *Science* **223** : 813-816.
- KAN, N.C., C.S.FLORDELLIS, G.E.MARK, P.H.DUESBERG and T.S.PAPAS. 1984b. Nucleotide sequence of avian carcinoma virus MH2 : two potential onc genes, one related to avian virus MC29 and the other related to murine sarcoma virus 3611. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81** : 3000-3004.
- KASID, U., A.PFEIFER, R.R.WEICHSELBAUM, A.DRITSCHILO and G.E.MARK. 1987. The raf oncogene is associated with a radiation-resistant human laryngeal cancer. *Science* **237** : 1039-1041.
- KATO, J., T.TAKEYA, C.GRANDORI, H.IBA, J.B.LEVY and H.HANAFUSA. 1986. Amino acid substitutions sufficient to convert the nontransforming p60^{c-src} protein to a transforming protein. *Mol. Cell. Biol.* **6** : 4155-4160.
- KESKI-OJA, J., U.R.RAPP and A.VAHERI. 1982. Transformation of mouse epithelial cells by acute murine leukemia virus 3611 : Inhibition of collagen synthesis and induction of novel polypeptides. *J. Cell. Biochem.* **20** : 139-148.
- KMIETEK, T.E. and D.SHALLOWAY. 1987. Activation and suppression of pp60^{c-src} transforming ability by mutation of its primary sites of tyrosine phosphorylation. *Cell* **49** : 65-73.

- KNOPF, J.L., M.H.LEE, L.A.SULTZMAN, R.W.KRIZ, C.R.LOOMIS, R.M.HEWICK and R.M.BELL. 1986. Cloning and expression of multiple protein kinase C cDNAs. *Cell* **46** : 491-502.
- KOENEN, M., A.E.SIPPEL., C.TRACHMANN and K.BISTER. 1988. Primary structure of the chicken c-mil protein : identification of domains shared with or absent from the retroviral v-mil protein. *Oncogene* **2** : 179-185.
- KONOPKA, J.B., S.M.WATANABE and O.N.WITTE. 1984. An alteration of the human c-abl protein in K562 leukemia cells unmasks associated tyrosine kinase activity. *Cell* **37** : 1035-1042.
- KOZAK, C., M.A.GUNNEL. and U.R.RAPP. 1984. A new oncogene, c-raf, is located on mouse chromosome 6. *J. Virol.* **49** : 297-299.
- KOZMA, S.C., S.M.REDMOND, F.XIAO-CHANG, S.M.SAURER, B.GRONER and N.E.HYNES. 1988. Activation of the receptor kinase domain of the trk oncogene by recombination with two different cellular sequences. *EMBO J.* **7** : 147-154.
- KRAUS, M.H., N.C.POPESCU, S.C.AMSBAUGH and C.R.KING. 1987. Overexpression of the EGF receptor-related proto-oncogene erbB-2 in human mammary tumor cell lines by different molecular mechanisms. *EMBO J.* **6** : 605-610.
- KRIS, R.M., I.LAX, W.GULLICK, M.D.WATERFIELD, A.ULLRICH, M.FRIDKIN and J.SCHLESSINGER. 1985. Antibodies against a synthetic peptide as a probe for the kinase activity of the avian EGF receptor and v-erbB protein. *Cell* **40** : 619-625.
- LEFF, S.E., M.G.ROSENFELD and R.EVANS. 1986. Complex transcriptional units : diversity in gene expression by alternative RNA processing. *Ann. Rev. Biochem.* **55** : 1091-1117.
- LEMON, V. 1985. Monoclonal antibodies specific for glia in the chick nervous system. *Developmental Brain Res.* **23** : 111-120.
- LEUTZ, A., H.BEUG and T.GRAF. 1984. Purification and characterization of cMGF, a novel chicken myelomonocytic growth factor. *EMBO J.* **3** : 3191-3197.
- LEVY, J.B., H.IBA and H.HANAFUSA. 1986. Activation of the transforming potential of p60^{c-src} by a single amino acid change. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83** : 4228-4232.
- LIBERMANN, T.A., H.R.NUSBAUM, N.RAZON, 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.
- LINIAL, M. 1982. Two retroviruses with similar transforming genes exhibit differences in transforming potential. *Virology* **119** : 382-391.
- MARK, G.E and U.R.RAPP. 1984. Primary structure of v-raf : relatedness to the src family of oncogenes. *Science* **224** : 285-289.

- MARK,G.E., T.W.SEELEY, T.B.SHOWS and J.D.MOUNTZ. 1986. pks, a raf-related sequence in humans.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83** : 6312-6316.
- MARK,G.E., R.J.McINTYRE, M.E.DIGAN, L.AMBROSIO and N.PERRIMON. 1987. *Drosophila melanogaster* homologs of the raf oncogene.
Mol. Cell. Biol. **7** : 2134-2140.
- MARTH,J., J.COOPER, C.KING, S.ZIEGLER, D.TINKER, R.OVERELL, E.KREBS and R.PERLMUTTER. 1988. Neoplastic transformation induced by an activated lymphocyte-specific protein tyrosine kinase (pp56^{lck}).
Mol. Cell. Biol. **8** : 540-550.
- MARTIN,P., C.HENRY, F.DENZEZ, P.AMOUYEL, C.BECHADE, G.CALOTHY, B.DEBUIRE, D.STEHELIN and S.SAULE. 1986. Characterization of a MH2 mutant lacking the v-myc oncogene.
Virology **153** : 272-279.
- MARTIN,P., C.HENRY, F.FERRE, C.BECHADE, A.BEGUE, C.CALOTHY, B.DEBUIRE, D.STEHELIN and S.SAULE. 1986. Characterization of a myc-containing retrovirus generated by propagation of an MH2 viral subgenomic RNA.
J.Virol. **57** : 1191-1194.
- 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.
- MARTINEZ,R., B.MATHEY-PREVOT, A.BERNARDS and D.BALTIMORE. 1987. Neuronal pp60^{c-src} contains a six-amino acid insertion relative to its non-neuronal counterpart.
Science **237** : 411-414.
- MATHEY-PREVOT,B. and D.BALTIMORE. 1988. Recombinants within the tyrosine kinase region of v-abl and v-src identify a v-abl segment that confers lymphoid specificity.
Mol. Cell. Biol. **8** : 234-240.
- MATLASHEWSKI,G., D.PIM, L.BANKS and L.CRAWFORD. 1987. Alternative splicing of human p53 transcripts.
Oncogene Res. **1** : 77-85.
- McLAUGHLIN,J., E.CHIANESE and O.N.WITTE. 1987. *In vitro* transformation of immature hematopoietic cells by the P210 bcr/abl oncogene product of the philadelphia chromosome.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84** : 6558-6562.
- MECKLING-HANSEN,K., R.NELSON, P.BRANTON and T.PAWSON. 1987. Enzymatic activation of Fujinami sarcoma virus gag-fps transforming proteins by autophosphorylation at tyrosine.
EMBO J. **6** : 659-666.
- MILLER,J., A.D.McLACHLAN and A.KLUG. 1985. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes.
EMBO J. **4** : 1609-1614.
- MITRA,G., D.MARTIN-ZANCA and M.BARBACID. 1987. Identification and biochemical characterization of p70^{TRK}, product of the human TRK oncogene.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84** : 6707-6711.

- MOELLING,K., B.HEIMANN, P.BEIMLING, U.R.RAPP and T.SANDER. 1984. Serine- and threonine- specific protein kinase activities of purified gag-mil and gag-raf proteins.
Nature **312** : 558-561.
- MÖLDERS,H., J.DEFESCHE, D.MULLER, T.I.BONNER, U.R.RAPP and R.MÜLLER. 1985. Integration of transfected LTR sequences into the c-raf proto-oncogene : activation by promoter insertion.
EMBO J. **4** : 693-698.
- MOOLENAAR,W.H., A.J.BIERMAN, B.C.TILLY, I.VERLAAN, L.H.K.DEFIZE, A.M.HONEGGER, A.ULLRICH and J.SCHLESSINGER. 1988. A point mutation at the ATP-binding site of the EGF-receptor abolishes signal transduction.
EMBO J. **7** : 707-710.
- MOUNT,S.M. 1982. A catalogue of splice junction sequences.
Nucleic Acids Res. **10** : 459-472.
- MULCAHY,L.S., M.R.SMITH and D.W.STACEY. 1985. Requirement for ras proto-oncogene function during serum-stimulated growth of NIH3T3 cells.
Nature **313** : 241-243.
- MÜLLER,R. 1986. Proto-oncogenes and differentiation.
TIBS **11** : 129-132.
- NG,M. and M.L.PRIVALSKY. 1986. Structural domains of the avian erythroblastosis virus erbB protein required for fibroblast transformation : dissection by in-frame insertional mutagenesis.
J. Virol. **58** : 542-553.
- NECKAMEYER,W.S., M.SHIBUYA, M.T.HSU and L.H.WANG. 1986. Proto-oncogene c-ros codes for a molecule with structural features common to those of growth factor receptors and displays tissue-specific and developmentally regulated expression.
Mol. Cell. Biol. **6** : 1478-1486.
- NEIL,J.C., J.GHYSDAEL, P.K.VOGT and J.E.SMART. 1981. Homologous tyrosine phosphorylation sites in transformation-specific gene products of distinct avian sarcoma viruses.
Nature **291** : 675-677.
- NILSEN,T.W., P.A.MARONEY, R.G.GOODWIN, F.M.ROTTMAN, L.B.CRITTENDEN, M.A.RAINES and H.J.KUNG. 1985. c-erbB activation in ALV-induced erythroblastosis : novel RNA processing and promoter insertion result in expression of an amino-truncated EGF receptor.
Cell **41** : 719-726.
- NISHIDA,Y., M.HATA, T.AYAKI, H.RYO, M.YAMAGATA, K.SHIMIZU AND Y.NISHIZUKA. 1988. Proliferation of both somatic and germ cells is affected in the drosophila mutants of raf proto-oncogene.
EMBO J. **7** : 775-781.
- NISHIZUKA,Y. 1984. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion.
Nature **308** : 693-698.
- NISHIKURA,K. and J.M.MURRAY. 1987. Antisense RNA of proto-oncogene c-fos blocks renewed growth of quiescent 3T3 cells.
Mol. Cell. Biol. **7** : 639-649.

- OKADA, T.S., K.YASUDA and K.NOMURA. 1979. The presence of multipotential progenitor cells in embryonic neural retina as revealed by clonal cell culture in cell lineage, stem cells and cell determination .
(in Le DOUARIN, eds) pp335-346.
- OWEN, A.J., P.PANTAZIS and H.N.ANTONIADES. 1984. Simian sarcoma virus-transformed cells secrete a mitogen identical to platelet-derived growth factor.
Science **225** : 54-56.
- OZANNE, B., J.FULTON and P.L.KAPLAN. 1980.
J. Cell Physiol. **105** : 163-180.
- PACHL, C., B.BIEGALKE and M.LINIAL. 1983. RNA and protein encoded by MH2 virus : evidence for subgenomic expression of v-myc.
J.Virol. **45** : 133-139.
- PACIFICI, M., D.BOETTIGER, K.ROBY and H.HOLTZER. 1977. Transformation of chondroblasts by Rous sarcoma virus and synthesis of the sulfated proteoglycan matrix.
Cell **11** : 891-899.
- PALMIERI, S., P.KAHN and T.GRAF. 1983. Quail embryo fibroblasts transformed by four v-myc-containing virus isolates show enhanced proliferation but are non tumorigenic.
EMBO J. **2** : 2385-2389.
- PALMIERI, S. and M.L.VOGEL. 1987. Fibroblast transformation parameters induced by the avian v-mil oncogene.
J. Virol. **61** : 1717-1721.
- PARK, M., M.DEAN, C.COOPER, M.SCHMIDT, S.O'BRIEN, D.BLAIR and G.F.VANDE WOUDE. 1986. Mechanism of met oncogene activation.
Cell **45** : 895-904.
- PARK, M., M.DEAN, K.KAUL, M.J.BRAUN, M.A.GONDA and G.VANDE WOUDE. 1987. Sequence of MET proto oncogene cDNA has features characteristic of the tyrosine kinase family of growth-factor receptors.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84** : 6379-6383.
- PARKER, R.C., H.E.VARMUS and J.M.BISHOP. 1984. Expression of v-src and chicken c-src in rat cells demonstrates qualitative differences between pp60^{v-src} and pp60^{c-src}.
Cell **37** : 131-139.
- PARKER, P.J., L.COUSSENS, N.TOTTY, L.RHEE, S.YOUNG, E.CHEN, S.STABEL, M.D.WATERFIELD and A.ULLRICH. 1986. The complete primary structure of protein kinase C- the major phorbol ester receptor.
Science **233** : 853-859.
- PATSCHINSKY, T., T.HUNTER, F.S.ESCH, J.A.COOPER and B.M.SEFTON. 1982. Analysis of the sequence of amino acids surrounding sites of tyrosine phosphorylation.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79** : 973-977.
- PATSCHINSKY, T., T.HUNTER and B.M.SEFTON. 1986a. Phosphorylation of the transforming protein of Rous sarcoma virus : direct demonstration of phosphorylation of serine 17 and identification of an additional site of tyrosine phosphorylation in pp60^{v-src} of Prague Rous sarcoma virus.
J.Virol. **59** : 73-81.
- PATSCHINSKY, T., B.SCHROEER and K.BISTER. 1986b. Protein product of proto-oncogene c-mil.
Mol. Cell. Biol. **6** : 739-744.

- PENDERGAST, A.M., J.A. TRAUGH and O.N. WITTE. 1987. Normal cellular and transformation-associated abl proteins share common sites for protein kinase C phosphorylation.
Mol. Cell. Biol. 7 : 4280-4289.
- PERSONS, D., W. WILKISON, R. BELL and O. FINN. 1988. Altered growth regulation and enhanced tumorigenicity of NIH3T3 fibroblasts transfected with protein kinase C-I cDNA.
Cell 52 : 447-458.
- PESSAC, B. and G. CALOTHY. 1974. Transformation of chick embryo neuroretinal cells by Rous sarcoma virus *in vitro* : induction of cell proliferation.
Science 185 : 709-710.
- PICCOLI, S.P., P.G. CAIMI and M.D. COLE. 1984. A conserved sequence at c-myc oncogene chromosomal translocation breakpoints in plasmacytomas.
Nature 310 : 327-330.
- PIWNICA-WORMS, H., K.B. SAUNDERS, T.M. ROBERTS, A.E. SMITH and S.H. CHENG. 1987. Tyrosine phosphorylation regulates the biochemical and biological properties of pp60^{c-src}.
Cell 49 : 75-82.
- PONTICELLI, A.S., C.A. WHITLOCK, N. ROSENBERG and O.N. WITTE. 1982. *In vivo* tyrosine phosphorylations of the Abelson virus transforming protein are absent in its normal cellular homolog.
Cell 29 : 953-960.
- PRYWES, R., J.G. FOULKES, N. ROSENBERG and D. BALTIMORE. 1983. Sequences of the A-MuLV protein needed for fibroblast and lymphoid cell transformation.
Cell 34 : 569-579.
- PRYWES, R., J.G. FOULKES and D. BALTIMORE. 1985a. The minimum transforming region of v-abl is the segment encoding protein-tyrosine kinase.
J. Virol. 54 : 114-122.
- PRYWES, R., J. HOAG, N. ROSENBERG and D. BALTIMORE. 1985b. Protein stabilization explains the gag requirement for transformation of lymphoid cells by Abelson murine leukemia virus.
J. Virol. 54 : 123-132.
- PULCIANI, S., E. SANTOS, A.V. LAUVER, L.K. LONG, S.A. AARONSON and M. BARBACID. 1982. Oncogenes in solid human tumours.
Nature 300 : 539-542.
- QIU, F., P. RAY, K. BROWN, P.E. BARKER, S. JHANWAR, F.H. RUDDLE and P. BESMER. 1988. Primary structure of c-kit : relationship with the CSF-1/PDGF receptor kinase family - oncogenic activation of v-kit involves deletion of extracellular domain and C terminus.
EMBO J. 7 : 1003-1011.
- RAPP, U.R., M.D. GOLDSBOROUGH, G.E. MARK, T.I. BONNER, J. GROFFEN, F.H. REYNOLDS, Jr. and J.R. STEPHENSON. 1983a. Structure and biological activity of v-raf, a unique oncogene transduced by a retrovirus.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 : 4218-4222.
- RAPP, U.R., F.H. REYNOLDS, Jr. and J.R. STEPHENSON. 1983b. New mammalian transforming retrovirus : demonstration of a polyprotein gene product.
J. Virol. 45 : 914-924.

- RAPP,U.R., J.L.CLEVELAND, K.BRIGHTMAN, A.SCOTT and J.N.IHLE. 1985a. Abrogation of IL-3 and IL-2 dependence by recombinant murine retroviruses expressing v-myc oncogenes. Nature **317** : 434-438.
- RAPP,U.R., J.L.CLEVELAND, T.N.FREDRICKSON, K.L.HOLMES, H.C.MORSE III, H.W.JANSEN, T.PATSCHINSKY and K.BISTER. 1985b. Rapid induction of hemopoietic neoplasms in newborn mice by a raf (mil)/myc recombinant murine retrovirus. J. Virol. **55** : 23-33.
- REYNOLDS,A.B., J.VILA, T.J.LANSING, W.M.POTTS, M.J.WEBER and J.T.PARSONS. 1987. Activation of the oncogenic potential of the avian cellular src protein by specific structural alteration of the carboxy terminus. EMBO J. **6** : 2359-2364.
- RIEDEL,H., J.SCHLESSINGER and A.ULLRICH. 1987. A chimeric, ligand-binding v-erbB/EGF receptor retains transforming potential. Science **236** : 197-200.
- RNA Tumor Viruses, R.WEISS, N,TEICH, M.VARMUS, J.COFFIN. 1982-1985. Eds Cold Spring Harbor Laboratory.
- ROSEN,O.M., R.HERRERA, Y.OLOWE, L.M.PETRUZZELLI and M.H.COBB. 1983. Phosphorylation activates the insulin receptor tyrosine protein kinase. Proc. Natl. Acad. Sci.USA. **80** : 3237-3240.
- ROTH,C.W., N.D.RICHERT, I.PASTAN and M.M.GOTTESMAN. 1983. Cyclic AMP treatment of Rous sarcoma virus-transformed chinese hamster ovary cells increases phosphorylation of pp60^{src} and increases pp60^{src} kinase activity. J. Biol. Chem. **258** : 10768-10773.
- ROUSSEL,M., S.SAULE, C.LAGROU, C.ROMMENS, H.BEUG, T.GRAF and D.STEHELIN. 1979. Three new types of viral oncogenes of cellular origin specific for hematopoietic cell transformation. Nature **281** : 452-455.
- ROUSSEL,M.F., T.J.DULL, C.W.RETTENMIER, P.RALPH, A.ULLRICH and C.J.SHERR. 1987. Transforming potential of the c-fms proto-oncogene (CSF-1 receptor). Nature **325** : 549-552.
- ROYER-POKORA,B., H.BEUG, M.CLAVIER, H.J.WINKHARDT, R.R.FRIIS and T.GRAF. 1978. Transformation parameters in chicken embryo fibroblasts transformed by AEV and MC29 avian leukemia viruses. Cell **13** : 751-760.
- ROZENGURTE,E. 1986. Early signals in the mitogenic response. Science **234** : 161-166.
- SACCA,R., E.R.STANLEY, C.J.SHERR and C.W.RETTENMIER. 1986. Specific binding of the mononuclear phagocyte colony-stimulating factor CSF-1 to the product of the v-fms oncogene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **83** : 3331-3335.
- SANGER,F., S.NICKLEN and A.R.COULSON. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74** : 5463-5467.
- SAP,J., A.MUNOZ, K.DAMM, Y.GOLDBERG, J.GHYSDAEL, A.LEUTZ, H.BEUG and B.VENNSTROM. 1986. The c-erba protein is a high-affinity receptor for thyroid hormone. Nature **324** : 635-640.

- SARIBAN,E., T.MITCHELL and D.KUFE. 1987. Expression of the c-raf proto oncogenes in human hematopoietic cells and cell lines. Blood **69** : 1437-1440.
- 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.
- SCHULTZ,A.M., S.M.LOCKHART, E.M.RABIN and S.OROSZLAN. 1981. Structure of Glycosylated and unglycosylated gag polyproteins of Rauscher murine leukemia virus : carbohydrate attachment sites. J. Virol. **38** : 581-592.
- SCHULTZ,A.M. and S.OROSZLAN. 1983. *In vivo* modification of retroviral gag gene-encoded polyproteins by myristic acid. J. Virol. **46** : 355-361.
- SCHULTZ,A.M., D.D.COPELAND, G.E.MARK, U.R.RAPP and S.OROSZLAN. 1985a. Detection of the myristylated gag-raf transforming protein with raf-specific antipeptide sera. Virology **146** : 78-89.
- SCHULTZ,A.M., L.HENDERSON, S.OROSZLAN, E.GARBER and H.HANAFUSA. 1985b. Amino-terminal myristylation of the protein kinase p60^{src}, a retroviral transforming protein. Science **227**, 427-429.
- SCHULTZ,A.M., T.COPELAND, S.OROSZLAN and U.R.RAPP. 1988. Identification and characterization of c-raf phosphoproteins in transformed murine cells. Oncogene **2** : 187-193.
- SCHWARTZ,D.E., R.TIZARD and W.GILBERT. 1983. Nucleotide sequence of Rous sarcoma virus. Cell **32** : 853-869.
- SEFTON,B.M., T.HUNTER and W.C.RASCHKE. 1981. Evidence that the Abelson virus protein functions *in vivo* as a protein kinase that phosphorylates tyrosine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **78** : 1552-1556.
- SEMBA,K., N.KAMATA, K.TOYOSHIMA and T.YAMAMOTO. 1985. A v-erbB-related proto oncogene, c-erbB-2, is distinct from the c-erbB-1/epidermal growth factor-receptor gene and is amplified in a human salivary gland adenocarcinoma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82** : 6497-6501.
- SHALLOWAY,D., P.M.COUSSENS and P.YACIUK. 1984. Overexpression of the c-src protein does not induce transformation of NIH 3T3 cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **81** : 7071-7075.
- SHERR,C.J., C.W.RETTENMIER, R.SACCA, M.F.ROUSSEL, A.T.LOOK and E.R.STANLEY. 1985. The c-fms proto-oncogene product is related to the receptor for the mononuclear phagocyte growth factor, CSF-1. Cell **41** : 665-676.
- SHIH,C., 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. USA **76** : 5714-5718.



- SHIH,C., M.LINIAL, M.M.GOODENOW and W.S.HAYWARD. 1984. Nucleotide sequence 5'of the chicken c-myc coding region : localization of a non coding exon that is absent from myc transcripts in most avian leukosis virus-induced lymphomas. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81** : 4697-4701.
- SHIMIZU,K., D.BIRNBAUM, M.A.RULEY, O.FASANO, Y.SUARD, L.EDLUND, E.TAPAROWSKY, M.GOLDFARB and M.WIGLER. 1983. Structure of the Ki-ras gene of the human lung carcinoma cell line Calu-1. Nature **304** : 497-500.
- 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. USA **82** : 5641-5645.
- 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.
- SIBLEY,D.R., J.L.BENOVIC, M.G.CARON and R.J.LEFKOWITZ. 1987. Regulation of transmembrane signaling by receptor phosphorylation. Cell **48** : 913-922.
- SMITH,M.R., S.J.DeGUDICIBUS and D.W.STACEY. 1986. Requirement for c-ras proteins during viral oncogene transformation. Nature **320** : 540-543.
- SOLNICK,D. 1985. Alternative splicing caused by RNA secondary structure. Cell **43** : 667-676.
- SNYDER,M.A., J.M.BISHOP, W.W.COLBY and A.D.LEVINSON. 1983. Phosphorylation of tyrosine-416 is not required for the transforming properties and kinase activity of pp60^{V-SRC}. Cell **32** : 891-901.
- SNYDER,M.A. and J.M.BISHOP. 1984. A mutation at the major phosphotyrosine in pp60^{V-SRC} alters oncogenic potential. Virology **136** : 375-386.
- SNYDER,M.A., J.M.BISHOP, J.P.McGRATH and A.D.LEVINSON. 1985. A mutation at the ATP-binding site of pp60^{V-SRC} abolishes kinase activity, transformation, and tumorigenicity. Mol. Cell. Biol. **5** : 1772-1779.
- SORGE,J., W.RICCI and S.H.HUGHES. 1983. cis-acting RNA packaging locus in the 115-nucleotide direct repeat of Rous sarcoma virus. J.Virol. **48** : 667-675.
- SOUTHERN,E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. **98** : 503-517.
- STANTON,V.P., J.R. and G.M.COOPER. 1987. Activation of human raf transforming genes by deletion of normal amino-terminal coding sequences. Mol. Cell. Biol. **7** : 1171-1179.
- STEHELIN,D., H.E.VARMUS, J.M.BISHOP and P.K.VOGT. 1976. DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma virus is present in normal avian DNA. Nature **260** : 170-173.

- STERN,D., P. HEFFERNAN and R.WEINBERG.1986. p185, a product of the neu proto-oncogene, is a receptor like protein with tyrosine kinase activity.
Mol. Cell. Biol. 6 : 1729-1740.
- STONE,J.C., T.ATKINSON, M.SMITH and T.PAWSON. 1984. Identification of functional regions in the transforming protein of Fujinami sarcoma virus by in-phase insertion mutagenesis.
Cell 37 : 549-558.
- SUTRAVE,P., T.I.BONNER, U.R.RAPP, H.W.JANSEN, T.PATSCHINSKY and K.BISTER. 1984a. Nucleotide sequence of avian retroviral oncogene v-mil : homologue of murine retroviral oncogene v- raf.
Nature 309 : 85-88.
- SUTRAVE,P., H.W.JANSEN, K.BISTER and U.R.RAPP. 1984b. 3' -terminal region of avian carcinoma virus MH2 shares sequence elements with avian sarcoma viruses Y73 and SR-A.
J. Virol. 52 : 703-705.
- SYMONDS,G., N.QUINTRELL, E.STUBBLEFIELD and J.M.BISHOP. 1986. Dispersed chromosomal localization of the proto oncogenes transduced into the genome of Mill Hill 2 or E26 leukemia virus.
J. Virol. 59 : 172-175.
- TAHIRA,T., M.OCHIAI, K.HAYASHI, M.NAGAO and T.SUGIMURA. 1987. Activation of human c-raf-1 by replacing the N-terminal region with different sequences.
Nucleic Acids. Res. 15 : 4809-4820.
- TAKAHASHI,M., J.RITZ and G.M.COOPER. 1985. Activation of a novel human transforming gene, ret, by DNA rearrangement.
Cell 42 : 581-588.
- TAKIO,K., R.D.WADE, S.B.SMITH, E.G.KREBS, K.A.WALSH and K.TITANI. 1984. Guanosine cyclic 3', 5'-phosphate dependent protein kinase, a chimeric protein homologous with two separate protein families.
Biochemistry 23 : 4207-4218.
- TEMIN,H.M. and S.MIZUTANI. 1970. RNA directed DNA polymerase in virions of Rous Sarcoma Virus.
Nature 226 : 1211-1213.
- TEYSSIER,J.R., I.HENRY, C.DOZIER, D.FERRE, J.ADNET, J. and M.PLUOT. 1986. Recurrent deletion of the short arm of chromosome 3 in human renal cell carcinoma : shift of the c-raf 1 locus.
J. Natl. Canc. Inst. 77 : 1187-1195.
- TORELLI,G., L.SELLERI, A.DONELLI, S.FERRARI, G.EMILIA, D.VENTURELLI, L.MORETTI and U.TORELLI. 1985. Activation of c-myb expression by phytohemagglutinin stimulation in normal human T lymphocytes.
Mol. Cell. Biol. 5 : 2874-2877.
- TWARDZIK,D.R., G.J.TODARO, H.MARQUARDT, F.H.REYNOLDS Jr. and J.R.STEPHENSON. 1982. Transformation induced by Abelson murine leukemia virus involves production of a polypeptide growth factor.
Science 216 : 894-896.

- TWARDZIK, D.R., G.J.TODARO., F.H.REYNOLDS Jr. and J.R.STEPHENSON. 1983. Similar transforming growth factors (TGFs) produced by cells transformed by different isolates of feline sarcoma virus.
Virology 124 : 201-207.
- ULLRICH, A., L.COUSSENS, J.S.HAYFLICK, T.J.DULL, A.GRAY, A.W.TAM, J.LEE, Y.YARDEN, T.A.LIBERMANN, J.SCHLESSINGER, J.DOWNWARD, E.L.V.MAYES, N.WHITTLE, M.D.WATERFIELD and P.H.SEEBURG. 1984. Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells.
Nature 309 : 418-425.
- VAN BEVEREN, C., F.VAN STRAATEN, T.CURRAN, R.MÜLLER 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.
- VARLEY, J.M., J.E.SWALLOW, W.J.BRAMMAR, J.L.WHITTAKER and R.A.WALKER. 1987. Alterations to either c-erbB-2 (neu) or c-myc proto-oncogenes in breast carcinomas correlate with poor short-term prognosis.
Oncogene 1 : 423-430.
- VELU, T.J., L.BEGUINOT, W.C.VASS, M.C.WILLINGHAM, G.T.MERLINO, I.PASTAN and D.R.LOWY. 1987. Epidermal growth-factor-dependent transformation by a human EGF receptor proto-oncogene.
Science 238 : 1408-1410.
- VERMA, I.M. and P.SASSONE-CORSI. 1987. Proto-oncogene fos : complex but versatile regulation.
Cell 51 : 513-514.
- VON WEIZSÄCKER, F., H.BEUG and T.GRAF. 1986. Temperature-sensitive mutants of MH2 avian leukemia virus that map in the v-mil and the v-myc oncogene respectively.
EMBO J. 5 : 1521-1527.
- WANG, L., S.IIJIMA, T.DORAI and B.LIN. 1987. Regulation of the expression of proto-oncogene c-src by alternative RNA splicing in chicken skeletal muscle.
Oncogene Res. 1 : 43-59.
- WEINBERGER, C., C.C.THOMPSON, E.S.ONG, R.LEBO, D.J.GRUOL and R.M.EVANS. 1986. The c-erbA gene encodes a thyroid hormone receptor.
Nature 324 : 641- 646.
- WEINMASTER, G., M.J.ZOLLER, M.SMITH, E.HINZE and T.PAWSON. 1984. Mutagenesis of Fujinami sarcoma virus : Evidence that tyrosine phosphorylation of P130^{gag-fps} modulates its biological activity.
Cell 37 : 559-568.
- WEINMASTER, G., M.J.ZOLLER and T.PAWSON. 1986. A lysine in the ATP-binding site of P130^{gag-fps} is essential for protein-tyrosine kinase activity.
EMBO J. 5 : 69-76.
- WHEELER, E.F., C.W.RETTENMIER, A.T.LOOK and C.J.SHERR. 1986. The v-fms oncogene induces factor independence and tumorigenicity in CSF-1 dependent macrophage cell line.
Nature 324 : 377-380.
- WITTE, O.N., A.DASGUPTA and D.BALTIMORE. 1980. Abelson murine leukaemia virus protein is phosphorylated *in vitro* to form phosphotyrosine.
Nature 283 : 826-831.

- YAMAMOTO, T., T. NISHIDA, N. MIYAJIMA, S. KAWAI, T. OOI and K. TOYOSHIMA. 1983. The erbB gene of avian erythroblastosis virus is a member of the src gene family. *Cell* **35** : 71-78.
- YAMAMOTO, T., S. IKAWA, T. AKIYAMA, K. SEMBA, N. NOMURA, N. MIYAJIMA, T. SAITO and K. TOYOSHIMA. 1986. Similarity of protein encoded by the human c-erbB-2 gene to epidermal growth factor receptor. *Nature* **319** : 230-234.
- YARDEN, Y., W. J. KUANG, T. YANG-FENG, L. COUSSENS, S. MUNEMITSU, T. J. DULL, E. CHEN, J. SCHLESSINGER, U. FRANCKE and A. ULLRICH. 1987. Human proto-oncogene c-kit : a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J.* **6** : 3341-3351.
- YOUNG, D., G. WAITCHES, C. BIRCHMEIER, O. FASANO and M. WIGLER. 1986. Isolation and characterization of a new cellular oncogene encoding a protein with multiple potential transmembrane domains. *Cell* **45** : 711-719.
- YU, C. L., M. TSAI and D. W. STACEY. 1988. Cellular ras activity and phospholipid metabolism. *Cell* **52** : 63-71.
- YUNIS, J. J., A. L. SORENG and A. E. BOWE. 1987. Fragile sites are targets of diverse mutagens and carcinogens. *Oncogene* **1** : 59-69.
- ZHOU, R. P., N. KAN, T. PAPAS and P. DUESBERG. 1985. Mutagenesis of avian carcinoma virus MH2 : only one of two potential transforming genes (Δgag-myc) transforms fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82** : 6389-6393.

ANNEXES

article 1

Alternative Splicing of RNAs Transcribed from the Chicken *c-mil* Gene

C. DOZIER,^{1*} F. DENHEZ,¹ C. HENRY,² J. COLL,¹ A. BEGUE,¹ B. QUATANNENS,¹ S. SAULE,¹
 AND D. STEHELIN¹

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Centre National de la Recherche Scientifique, Institut Pasteur, 1 Rue Calmette, 59019 Lille Cedex,¹ and Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Institut de Recherche sur le Cancer, 59045 Lille Cedex,² France

Received 13 October 1987/Accepted 19 January 1988

Two distinct *c-mil*-related cDNA clones have been isolated from a chicken embryo cDNA library. Results presented here show that the single chicken *c-mil* gene is coding for two *c-mil* mRNA species, different by at least 60 base pairs and generated by an alternative splicing mechanism. These mRNA molecules can be translated into two distinct proteins of 73 and 71 kilodaltons.

v-mil, one of two oncogenes of the avian oncogenic retrovirus MH2 (3, 8), represents a truncated form of the chicken cellular gene (*c-mil*) (9). The *c-mil* gene contains 11 exons homologous to *v-mil* in its 3' region (7). *c-mil*, which is highly conserved among avian and mammalian species, is transcribed as an mRNA of 4.0 kilobases in chickens (3) and has been shown to encode a 71/73-kilodalton (kDa) phosphoprotein (15). The 42-kDa carboxy terminus, closely related to the product of its human counterpart *raf1* (2), is identical to the *v-mil*-encoded portion of the MH2 *gag-mil* hybrid protein, except for some point mutations (7), while the 30-kDa amino terminus is encoded by 5' *c-mil* sequences that have not been transduced into the genome of MH2 (7, 15). It has been shown that the viral P100^{gag-mil} fusion protein is associated with a serine-threonine kinase activity in vitro (14), whereas little is known about the physiological function of the *c-mil* gene. Recently, we have shown that upon long terminal repeat activation, the 35-kDa carboxyl terminus encoded by *c-mil* is able, like P100^{gag-mil} (1), to induce proliferation of avian-neuroretinal cells (5). To gain insight into the biological activity of the *c-mil* gene, we undertook to isolate chicken *c-mil* cDNAs. In the present study, we isolated two closely related chicken *c-mil* cDNA clones and determined that they represent two mRNA species generated by an alternative splicing mechanism.

A chicken embryo cDNA library in the vector λ gt11 (kindly provided by B. Vennström; 17) was screened with a *v-mil*-specific probe. To ensure the selection of cDNAs containing the entire coding capacity of the *c-mil* gene, positive clones were subsequently screened by using a 300-base-pair (bp) *PvuII* fragment (containing the initiation codon) of a human cDNA clone (2, 5). Two positive phages containing a 3.1-kilobase-pair (kbp) *EcoRI* insert were purified, subcloned into plasmid pKH47, and analyzed by restriction mapping (Fig. 1A). These two cDNA clones, termed p1A and p6C, overlapped on 3.0 kbp (p1A was about 50 bp longer at the 5' end, while p6C was about 50 bp longer at the 3' end) and exhibited very similar restriction maps identical to that of *v-mil* in their middle portions. However, we observed a slight size variation of the *HindIII-SphI* internal fragment between the two cDNA clones (Fig. 1A). p1A and p6C cDNA clones were characterized by hybridization to *EcoRI* digests of two overlapping genomic clones

containing the cellular counterpart of *v-mil* (Fig. 1B). These genomic clones, termed L2 and L3, had been previously isolated from a chicken erythrocyte partial *AluI-HaeIII* DNA library by using a *v-mil* probe (4). In addition to the expected bands (10.8, 4.3, 2.2, and 0.9 kbp), a 4.8-kbp border *EcoRI* fragment was detected with the two cDNA probes in clone L2 but not with the *v-mil* probe (Fig. 1B); this fragment contained 5' *c-mil* exons not transduced into MH2. Surprisingly, p1A also hybridized to the 1.9-kbp border *EcoRI* fragment of phage L3. This fragment, located between virus-related exons 1 and 2, failed to hybridize with the p6C and *v-mil* probes (Fig. 1B). The genomic region which hybridized with the p1A cDNA probe was more precisely mapped between virus-related exons 1 and 2 within a 280-bp *AluI-CfoI* fragment (Fig. 1C).

Differences in the hybridization pattern of the two cDNA clones and variations in their restriction maps suggested that p1A and p6C vary in their coding sequences. To further characterize these structural variations in the region where the homology to *v-mil* starts, we sequenced the first virus-related exons of the two cDNA clones. The *Sau3A-StuI* fragments encompassing exon 1 to exon 3 homologous to *v-mil* were purified from p1A and p6C cDNA clones, subcloned into mp18 and mp19 vectors, and sequenced by the dideoxynucleotide chain termination method (16). Results demonstrated that the sequence of clone p6C was identical to that reported for cloned *c-mil* genomic sequences (7) and was colinear with *v-mil*. A major structural difference between the two cDNA clones was an insertion of 60 bp into clone p1A, as compared with clone p6C and *v-mil* (Fig. 2). This inserted sequence occurred at the junction of the first and second *v-mil*-related exons. However, downstream from this insertion, the homology with p6C and *v-mil* resumed (Fig. 2). This 60-bp inserted sequence coded for a stretch of 20 amino acids and did not change the reading frame which corresponded to that of the *v-mil* protein. This additional peptide showed no significant homology to any other protein in the Genbank and the European Molecular Biology Laboratory data banks. The results described above strongly suggested that the mRNA molecule represented by the p1A cDNA clone was generated by an alternative splicing mechanism. Thus, the *c-mil* gene could code for at least two types of *c-mil* mRNA molecules, represented by p1A and p6C cDNA clones.

The initial screening of the chicken embryo cDNA library

* Corresponding author.

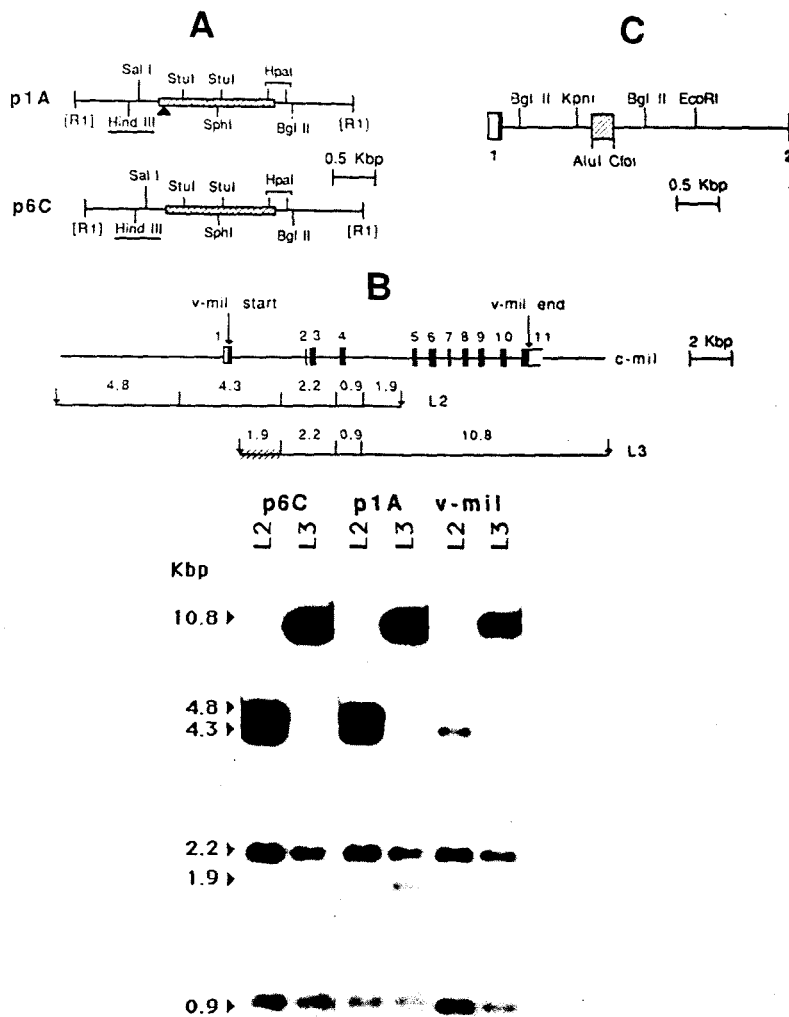


FIG. 1. (A) Restriction endonuclease maps of *v-mil*-related cDNA clones p1A and p6C. Symbols: [R1], site introduced as a linker; , region shown to be homologous to *v-mil* by restriction pattern; \blacktriangle , region of the additional exon sequences in the p1A clone. The restriction site used for the construction of hybrid molecules pKCR3-1A/6C and pKCR3-6C/1A is underlined. (B) Hybridization of p1A, p6C, and *v-mil* probes with two genomic clones, L2 and L3, containing the cellular counterpart of *v-mil*. Symbols: \blacksquare , exons homologous to *v-mil*; \square , intron sequences; \square , part of exons not transduced into MH2; \downarrow , true *EcoRI* fragments; \downarrow , artificial *EcoRI* fragments due to the construction of the libraries used. (C) Mapping of the additional exon sequences within the *c-mil* gene. Symbol: \blacksquare , genomic fragment containing the additional exon sequences. Other symbols are defined in the legend to panel B.

yielded several distinct clones. Since most of them were generated by the mRNA species corresponding to the p6C cDNA clone, we analyzed whether the mRNA species corresponding to the p1A cDNA clone could be detected *in vivo*. Total RNAs from chicken embryo fibroblasts and from a variety of 1-week-old chicken tissues (brain, bone marrow, liver, spleen, kidney, and bursa) were extracted by the guanidine thiocyanate method, separated on a 1% agarose-formaldehyde gel, and transferred to nitrocellulose. These RNA samples were hybridized with the genomic probe containing the 60-bp insert (the 280-bp *AluI-CfoI* fragment) and with the p6C cDNA probe. Results indicated that the genomic probe detected a 4.0-kilobase mRNA species in chicken embryo fibroblasts (Fig. 3A, lane 1). This mRNA was indistinguishable in size from the mRNA species detected with the p6C cDNA probe (Fig. 3A, lane 2) and was detected in all tissues tested (data not shown). Identification

of such a message confirmed that the p1A cDNA clone represents an alternatively spliced mRNA species. To determine whether these additional exon sequences existed in other species, we investigated the presence of homologous sequences in DNAs from phylogenetically distinct origins. Hybridization with the *AluI-CfoI* fragment probe on *EcoRI*-digested high-molecular-weight DNA from quail, rat, and human cells indicated that homologous sequences were present in all three species tested (Fig. 3B).

To identify and characterize the nature of the proteins encoded by the two cDNA clones, we subcloned the 3.1-kbp *EcoRI* inserts into the *EcoRI* site of the expression vector pKCR3. These two subclones were referred to as pKCR3-1A and pKCR3-6C, respectively. A total of 10 μ g of each supercoiled plasmid DNA was transfected into 10^6 COS-1 cells as previously described (10). At 72 h after the transfection, COS-1 cells were labeled with [35 S]methionine, lysed,

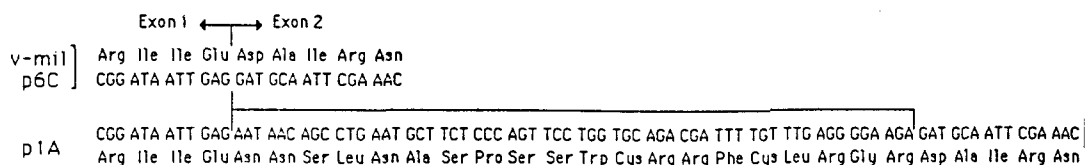


FIG. 2. Comparison of nucleotide and amino acid sequences of cDNA clones p1A and p6C in the region surrounding the additional exon sequences.

and immunoprecipitated with an anti-*v-mil* serum as previously described (1). Immunoprecipitated polypeptides were examined by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (Fig. 4). A polypeptide with an apparent molecular size of 71 kDa was observed in COS-1 cells transfected with pKCR3-6C, whereas pKCR3-1A induced the synthesis of a polypeptide with a slightly larger molecular size (73 kDa). These two polypeptides, specifically immunoprecipitated with the anti-*v-mil* serum, were absent in untransfected COS-1 cells. The sizes of the polypeptides synthesized by pKCR3-6C (71 kDa) and pKCR3-1A (73 kDa) agree with the 71/73-kDa *c-mil* protein observed in previous *in vivo* studies, although the 73-kDa form was attributed to phosphorylation of the 71-kDa protein (15). Hence, on the basis of these considerations, we suggest that the p71/73-*c-mil* detected in various cells (15) could also correspond to two distinct protein products generated by differential splicing. Since the 5' and 3' termini of the two cDNA clones were not identical, we determined whether the two proteins contained other differences than the one observed in the region where *v-mil* starts by constructing hybrids. pKCR3-1A/6C and pKCR3-6C/1A hybrid molecules were made by connecting the 5' *EcoRI*-*HindIII* fragment of one cDNA to the 3'

HindIII-*EcoRI* fragment of the other. pKCR3-1A/6C induced the synthesis of a protein of 71 kDa, identical in size to that of pKCR3-6C, whereas pKCR3-6C/1A induced the synthesis of a 73-kDa protein, identical in size to that of pKCR3-1A (Fig. 4). This result strongly suggests that the 2-kDa difference between these two proteins is encoded by the additional 60-bp exon sequences.

We have shown here that the single functional *c-mil* gene of the chicken coded for at least two *c-mil* mRNA species generated by an alternative splicing mechanism. These two *c-mil* transcript species, closely related in size, were expressed in fibroblasts and in various tissues and encoded two distinct protein products in COS cells; the sizes of the two protein *c-mil* species correspond to those detected *in vivo* (15). Only one mRNA species (colinear with *v-mil* and probably represented in the chicken by clone p6C) has been described for human (2) and rat (6) *c-raftl*. However, we showed here that human and rat genomic DNAs contain sequences homologous to the additional exon sequences; it is therefore possible that an alternative splicing mechanism also occurs in the *raftl* gene of these two species. This hypothesis is under investigation.

Differential splicing of mRNA is a well-recognized mechanism for generating protein diversity and has been found in a variety of cellular genes (11), including some proto-oncogenes: the *abl* gene (19), the *Ki-ras* gene (18), the human p53 gene (13), and the mouse and chicken *c-src* genes (12, 20).

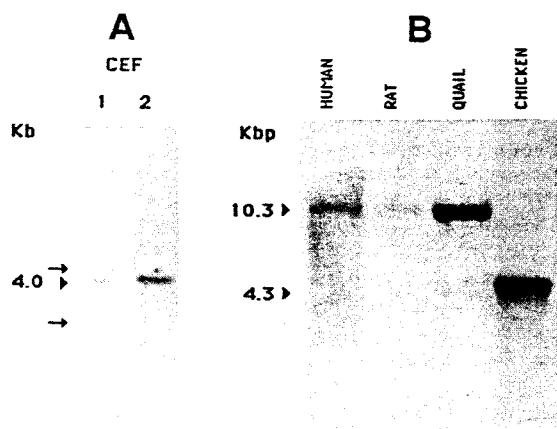


FIG. 3. (A) Expression of the *c-mil* mRNA species in chicken embryo fibroblasts (CEF). Equal amounts of total RNA extracted from chicken embryo fibroblasts were separated by agarose gel electrophoresis and hybridized in $3\times$ SSC ($1\times$ SSC is 0.15 M NaCl plus 0.015 M sodium citrate)-50% formamide at 42°C with the 280-bp *AluI*-*CfoI* genomic probe (lane 1) or the p6C cDNA probe (lane 2). Washing was done in $0.1\times$ SSC-0.1% sodium dodecyl sulfate at 50°C. The positions of the 28S and 18S rRNA markers are indicated by arrows. Kb, Kilobases. (B) Southern blot analysis of additional exon sequences in human, rat, quail, and chicken DNAs. High-molecular-weight human (cell line N417), rat (cell line 208F), quail (embryo fibroblast), and chicken (embryo fibroblast) DNAs (10 μ g) were digested with *EcoRI*, subjected to agarose gel electrophoresis, and hybridized in $5\times$ SSC-50% formamide at 42°C with the 280-bp *AluI*-*CfoI* genomic probe. Washing was done in $2\times$ SSC-0.1% sodium dodecyl sulfate at 50°C. Kb, kilobases.

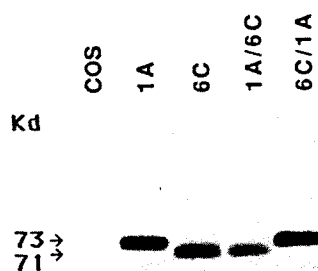


FIG. 4. Polypeptides induced by expression of pKCR3 *mil* cDNA in COS cells. COS cells were transfected with pKCR3-6C, pKCR3-1A, pKCR3-6C/1A, or pKCR3-1A/6C, labeled with [35 S]-methionine for 1 h, and lysed. Proteins were immunoprecipitated with an anti-*v-mil* serum and separated by sodium dodecyl sulfate-10% polyacrylamide gel electrophoresis. Untransfected COS cells were used as controls. Kd, kilodaltons.

The existence of two *c-mil* proteins in chicken cells raises questions concerning the roles of these two proteins. They may reside in different organelles, display different substrate specificities, or carry out specialized functions. The relationship between the two mRNA species, as well as the complete primary structure of the two proteins, remains to be determined. These cloned cDNAs provide a useful tool for further experiments regarding the existence of possible variations in the biological functions of these defined *c-mil* protein species. Preliminary experiments indicate that when the 60-bp additional exon sequences are inserted into the *v-mil* gene, the resulting *gag-mil* fusion protein retains the ability to induce avian neuroretina cell proliferation.

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.

LITERATURE CITED

1. 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 (London)* 316:559-562.
2. Bonner, T. I., H. Oppermann, P. Seeburg, S. B. Kerby, M. A. Gunnell, A. C. Young, and U. R. Rapp. 1986. The complete coding sequence of the human *raf* oncogene and the corresponding structure of the *c-raf1* gene. *Nucleic Acids Res.* 14:1009-1015.
3. 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.
4. Dodgson, J. B., J. Strommer, and J. D. Engel. 1979. Isolation of the chicken β -globin gene and a linked embryonic β -like globin gene from a chicken DNA recombinant library. *Cell* 17:879-887.
5. Dozier, C., F. Denhez, J. Coll, P. Amouyel, B. Quatannens, A. Begue, D. Stehelin, and S. Saule. 1987. Induction of proliferation of neuroretina cells by long terminal repeat activation of the carboxy-terminal part of *c-mil*. *Mol. Cell. Biol.* 7:1995-1998.
6. Ishikawa, F., F. Takaku, M. Nagao, and T. Sugimura. 1987. Rat *c-raf* oncogene activation by a rearrangement that produces a fused protein. *Mol. Cell. Biol.* 7:1226-1232.
7. Jansen, H. W., and K. Bister. 1985. Nucleotide sequence analysis of the chicken gene *c-mil*, the progenitor of the retroviral oncogene *v-mil*. *Virology* 143:359-367.
8. Jansen, H. W., B. Rückert, R. Lurz, and K. Bister. 1983. Two unrelated cell-derived sequences in the genome of avian leukemia and carcinoma inducing retrovirus MH2. *EMBO J.* 2:1669-1975.
9. Jansen, H. W., C. Trachmann, and K. Bister. 1984. Structural relationship between the chicken proto-oncogene *c-mil* and the retroviral oncogene *v-mil*. *Virology* 137:217-224.
10. Knopf, J. L., M. H. Lee, L. A. Sultzman, R. W. Kriz, C. R. Loomis, R. M. Hewick, and R. M. Bell. 1986. Cloning and expression of multiple protein kinase C cDNAs. *Cell* 46:491-502.
11. Leff, S. E., M. G. Rosenfeld, and R. Evans. 1986. Complex transcriptional units: diversity in gene expression by alternative RNA processing. *Annu. Rev. Biochem.* 55:1091-1117.
12. Martinez, R., B. Mathey-Prevot, A. Bernardis, and D. Baltimore. 1987. Neuronal pp60^{c-src} contains a six-amino acid insertion relative to its non-neuronal counterpart. *Science* 237:411-414.
13. Matlashewski, G., D. Pim, L. Banks, and L. Crawford. 1987. Alternative splicing of human p53 transcripts. *Oncogene Res.* 1:77-85.
14. Moelling, K., B. Heimann, P. Beimling, U. R. Rapp, and T. Sander. 1984. Serine- and threonine-specific protein kinase activities of purified *gag-mil* and *gag-raf* proteins. *Nature (London)* 312:558-561.
15. Patschinsky, T., B. Schroeder, and K. Bister. 1986. Protein product of proto-oncogene *c-mil*. *Mol. Cell. Biol.* 6:739-744.
16. Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467.
17. Sap, J., A. Munoz, K. Damm, Y. Goldberg, J. Ghysdael, A. Leutz, H. Beug, and B. Vennström. 1986. The *c-erba* protein is a high-affinity receptor for thyroid hormone. *Nature (London)* 324:635-640.
18. Shimizu, K., D. Birnbaum, M. A. Ruley, O. Fasano, Y. Suard, L. Edlund, E. Taparowsky, M. Goldfarb, and M. Wigler. 1983. Structure of the *Ki-ras* gene of the human lung carcinoma cell line Calu-1. *Nature (London)* 304:497-500.
19. 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.
20. Wang, L., S. Iijima, T. Dorai, and B. Lin. 1987. Regulation of the expression of proto-oncogene *c-src* by alternative RNA splicing in chicken skeletal muscle. *Oncogene Res.* 1:43-59.

article 2

Induction of Proliferation of Neuroretina Cells by Long Terminal Repeat Activation of the Carboxy-Terminal Part of *c-mil*

C. DOZIER, F. DENHEZ, J. COLL, P. AMOUYEL, B. QUATANNENS, A. BEGUE, D. STEHELIN,
 AND S. SAULE*

U 186 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Centre National de la Recherche Scientifique 04 1160,
 Institut Pasteur, 59019 Lille Cedex, France

Received 24 November 1986/Accepted 12 February 1987

Expression of the P100^{gag-mil} protein of avian retrovirus MH2 in cultured chicken embryo neuroretina cells was previously shown to result in the proliferation of normally quiescent cell populations. We show here that long terminal repeat activation of the carboxy terminus of the *c-mil* gene is sufficient to induce neuroretina cell proliferation.

The *v-mil* gene of MH2 is expressed as a 100-kilodalton (kDa) polyprotein resulting from the fusion of *gag* and *mil* sequences (2, 14). This cytoplasmic protein exhibits an *in vitro* serine-threonine kinase activity (4, 20) and is responsible for avian embryo neuroretina (NR) cell proliferation in infected cultures (2). The *v-mil* gene represents a truncated form of the chicken cellular *mil* (*c-mil*) gene (17). The regions of *c-mil* with homology to *v-mil* are distributed over 14 kilobase pairs (kbp) of the chicken genome and are organized in 11 exons (16). Predicted sequences of the *v-mil* and *c-mil* proteins differ by 5 amino acids among 379 amino acid residues (16). *v-mil* is closely related to *v-raf*, the transduced oncogene of the highly oncogenic murine sarcoma virus (MSV) 3611 (18, 26, 31); however, *v-mil* has 5' additional sequences derived from three exons of its chicken cellular homolog (7). The *v-mil* gene shares significant sequence homology with the *src* gene family (11), whose members also induce proliferation of NR cells (5, 23). However, constructed Rous sarcoma virus variants encoding p60^{c-src} instead of p60^{v-src} lack the mitogenic function of the *src* gene (15). Since the *c-neu* (1) and *c-src* (19) proto-oncogenes appear to acquire their transforming ability through mutation of a single amino acid, it was of some interest to know whether *c-mil* sequences themselves were able to cause proliferation of NR cells or whether the acquired mutations activated the biological function of the *v-mil* gene. We therefore examined the growth properties of NR cells transfected with retroviruses containing the carboxy-terminal part of *c-mil*.

We have constructed recombinant plasmids from pMH2HdX, a derivative of pMH2Hd (6) with minor modifications resulting in the deletion of the *XbaI-HindIII* flanking cellular sequences, and either chicken or human cellular *mil-raf-1* sequences (Fig. 1). pPVS, a derivative of pMH2HdX, was used as starting material for recombinant plasmid construction and as positive control in transfection experiments. pPVS was generated by an internal deletion of a 443-bp *PvuII-Sall* fragment in the *myc* gene, which prevented the expression of an active *myc* oncogene product (Fig. 1).

In pSmXH *c-mil*, substitution of partial chicken *c-mil* sequences for *v-mil* sequences was carried out, taking advantage of the fact that the splice donor site of the *gag* sequences was in phase with the splice acceptor site of exon

4 of the chicken *c-mil* sequences homologous to *v-mil*. This recombinant plasmid was constructed by changing a viral *SmaI* site into a *XbaI* site by linker insertion and then replacing the 2.5-kbp *XbaI-HpaI gag-mil* sequences by a 9.2-kbp *XbaI-HpaI* cellular *mil* fragment isolated from a clone of the chicken cellular locus (Fig. 1). The junction at the 3' end of the *v-mil* sequence was made at the *HpaI* site conserved in both *v-mil* and *c-mil* DNA, 26 bp upstream from the *v-mil* translation stop codon; in this region, the amino acid sequence encoded by *v-mil* is identical to that of *c-mil* (16). The cellular sequences substituting the viral sequences contain 8 of the 11 exons homologous to *v-mil* (16). The recombinant virus was expected to express as a subgenomic mRNA *c-mil* sequence linked to the first nucleotides of the *gag* sequence (upstream from the splice donor site) containing the initiation codon. This mRNA should encode a fusion protein containing the carboxy-terminal part (35 kDa) of the *c-mil* protein. This 35-kDa protein should exhibit four amino acid differences compared with *v-mil* (11, 16).

To examine whether amino acid changes occurring in the mammalian *mil-raf* gene could alter the biological activity of the recombinant product, we constructed a plasmid carrying a hybrid structure between *v-mil* and human *c-raf-1* (*RAF1*) sequences. This clone, termed pSpHc *mil-RAF1*, was generated by replacing the 3' region of *v-mil* of pPVS (a 535-bp *SphI-HpaI* fragment) with the corresponding portion of the human *RAF1* cDNA (a 568-bp *SphI-HincII* fragment obtained from a cDNA clone named HMA7 isolated from a human fetal liver cDNA library) (Fig. 1). This stretch of *RAF1* corresponds to exons 7 to 11 from the part of the gene homologous to *v-mil* (3). The expected 100-kDa *gag-mil-RAF1* fusion protein encoded by this recombinant contained 10 amino acid changes when compared with the P100^{gag-mil} product (3).

Neuroretinas were dissected from 7-day-old quail or chicken embryos, and cells were dissociated and suspended in Eagle basal medium supplemented with 10% fetal calf serum. NR cells at a density of ca. 10⁶ per 60-mm dish were transfected with pRAV1 DNA (10 μg) and supercoiled plasmid DNA of either pSmXH *c-mil* or pSpHc *mil-RAF1*, with pPVS as a positive control. Transfection experiments were performed by the calcium method developed by Graham and van der Eb (13). Precipitated DNA (35 μg) was added in a 1-ml volume to the 60-mm dishes. After 1 h of incubation, cells were fed with 5 ml of Eagle basal

* Corresponding author.

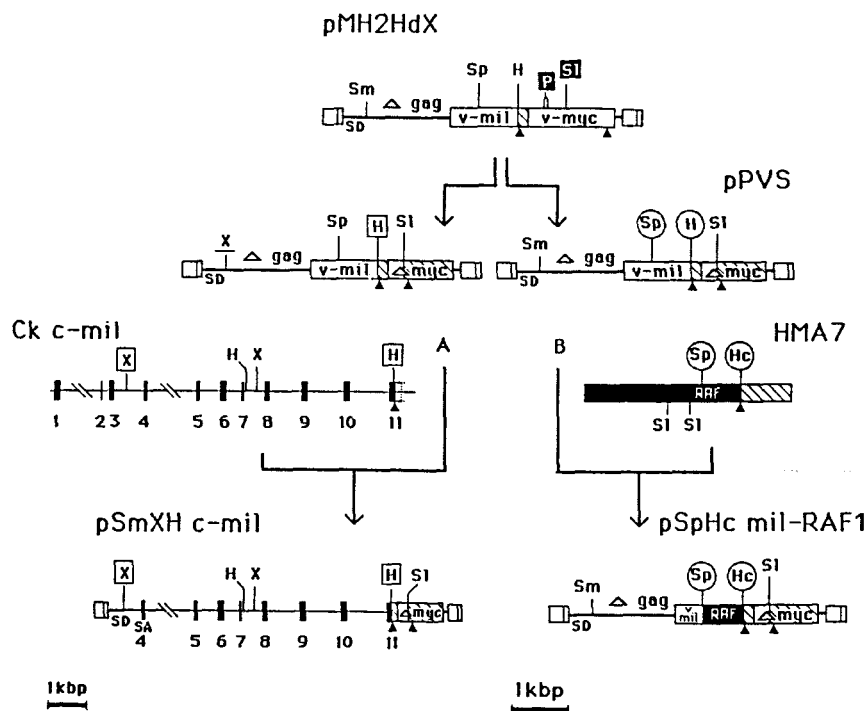


FIG. 1. Construction of recombinant proviruses containing avian *mil* and human *raf-1* (*RAF1*) sequences. On the left, construction of pSmXH *c-mil* which contains chicken *c-mil* sequences is shown; ■, exon; —, intron. On the right, construction of pSpHc *mil-RAF1* which contains a *gag-v-mil-RAF1* hybrid oncogene is shown. Abbreviations for restriction sites: Sm, *Sma*I; Sp, *Sph*I; H, *Hpa*I; P, *Pvu*II; S1, *Sal*I; Hc, *Hinc*II; X, *Xba*I. SD and SA, splice donor and splice acceptor; ▲, translation stop codons. □□□□, *v-myc* and *RAF1* noncoding sequences. Enzymes used to generate pSmXH *c-mil* are boxed; enzymes used to generate pSpHc *mil-RAF1* are encircled. ■■■, Enzymes used to delete the *myc* gene. The *Xba*I site generated by linker insertion at the *Sma*I site is underlined.

medium–10% fetal calf serum, incubated overnight, and then passaged in 100-mm dishes. When proliferation became evident in pPVS-transfected cells (10 to 15 days after transfection), NR transfected cell cultures were passaged once in 100-mm dishes until they reached confluency and were then seeded at low density (ca. 10^5 cells per 60-mm dish) for analysis of growth rates (Fig. 2). pPVS-, pSmXH *c-mil*-, and pSpHc *mil-RAF1*-transfected cells grew much faster than untransfected cells, although pSmXH *c-mil*-transfected cells reproducibly exhibited a growth profile lower than those of cells transfected with pPVS or pSpHc *mil-RAF1* (Fig. 2). The results described above demonstrate that both recombinants pSmXH *c-mil* and pSpHc *mil-RAF1* induce NR cell proliferation. Identical growth profiles were obtained when transfection experiments were performed on chicken embryo NR cells or when pSmXH *c-mil* and pSpHc *mil-RAF1* were transfected without Rous-associated virus type 1 helper provirus (data not shown). This suggests that the target cells for *mil* product are abundant throughout the cell culture.

The protein products encoded by these two constructs were analyzed by two experiments. In one, transfected NR cultures were metabolically labeled with [35 S]methionine for 1 h. Cell lysates were prepared and immunoprecipitated by using antisera prepared with bacterially expressed *v-mil* protein as previously described (2). Immunoprecipitated proteins, characterized by their apparent molecular weights in polyacrylamide gels, are shown in Fig. 3A. pSmXH *c-mil*-transfected NR cells produced a protein with an apparent molecular mass of 35 kDa that was specifically precipitated by an anti-*v-mil* antiserum (Fig. 3A, lane c1). The pSpHc *mil-RAF1*-transfected NR cells produced the ex-

pected protein of 100 kDa specifically precipitated by anti-*v-mil* antiserum (Fig. 3A, lane b1) and similar in size to the one produced by pPVS-transfected NR cells (Fig. 3A, lane a1). We next used the immunoblotting technique to probe for the steady-state level of the protein products (Fig. 3B). A total of 10^6 cell lysates were prepared from each of the transfected NR cultures as previously described (12) and electrophoresed through a sodium dodecyl sulfate–10% polyacrylamide gel. The proteins were transferred to nitrocellulose and probed with the anti-*v-mil* antiserum (dilution, 1:100) described above. 125 I-labeled protein A (0.05 μ Ci per lane) was used to detect bound immunoglobulins. The p35 $^{\Delta c-mil}$ (Fig. 3B, lane c) and p100 $^{gag-mil-RAF1}$ (lane b) proteins accumulated to the steady-state level of p100 $^{gag-mil}$ (lane a) in transfected NR cells. As a control, normal quail NR lysates (lane d) were used.

These transfection data demonstrate that the carboxy-terminal part of the chicken *c-mil* gene causes NR cell proliferation when overexpressed by a retroviral control element. This observation is consistent with the report that the transforming potential of the mouse *c-raf* gene can be activated by insertion of a Moloney murine leukemia virus long terminal repeat (21). The hybrid *v-mil-RAF1* gene in pSpHc *mil-RAF1* stimulates NR cells to proliferate, indicating that the carboxyl portion of the p100 $^{gag-mil}$ protein can be functionally complemented by *RAF1* protein components. Comparable results have been reported for *v-fes* with chimeric constructs of the Gardner feline sarcoma viral oncogene and the *FES* proto-oncogene (29) and for *v-raf* with chimeric constructs of the 3611 MSV oncogene and the *RAF1* proto-oncogene (3).

Our results indicate that the 35-kDa carboxy-terminus part

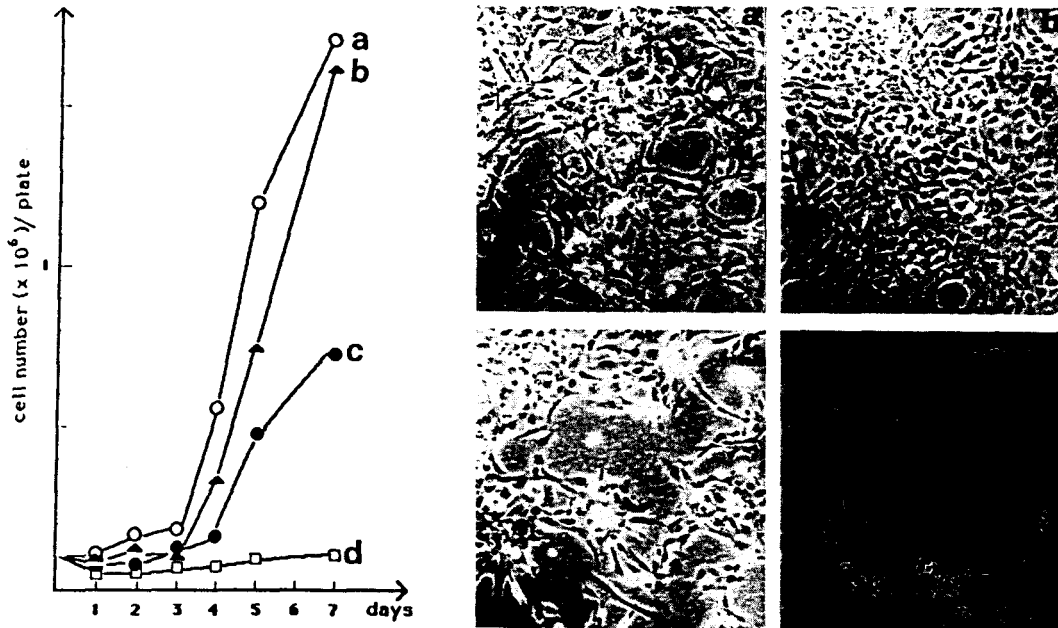


FIG. 2. Growth kinetics and morphology of transfected quail NR cells. At 10 to 15 days after transfection, NR cells were passaged once in 100-mm dishes until they reached confluency and then were subcultured into several 60-mm dishes at low cell density. Medium was renewed daily, and cells from two dishes were counted as indicated. Symbols: \circ and a, pPVS (pRAV1)-transfected cells; \blacktriangle and b, pSpHc *mil*-RAF1 (pRAV1)-transfected cells; \bullet , and c, pSmXH *c-mil* (pRAV1)-transfected cells; \square , and d, untransfected cells.

of the chicken *mil* protein is sufficient to induce NR cell proliferation. It is interesting that this portion of the *c-mil* protein corresponds to the region of strongly conserved amino acid sequence among the members of the tyrosine kinase family (11). Many reports show that this highly conserved amino acid sequence, defined as the kinase domain, is important for the transforming ability of the *v-erbB* (22), the *v-abl* (24), and the *v-fes* (30) oncogene products. Moreover, all three oncogenic alleles of *mil-raf*, i.e., *v-raf*, *v-mil*, and the long terminal repeat murine *c-raf*, have retained similar stretches of the 3' half of the gene and encode polypeptides with molecular masses ranging from 35 to 45 kDa, which all share the carboxy-terminal part of the normal cellular protein. This observation suggests that the 3' sequences encoding the protein kinase domain retain the malignant potential of the gene product. The recent identification of transforming versions of *RAF1* after transfection of DNA derived from a human stomach tumor (27) and a glioblastoma cell line (10) which share amino-terminal truncation suggests that amputation of 5' sequences may be essential for *c-mil-raf* activation detected on immortalized (NIH 3T3) or normal (avian NR) embryonic cells. However, we have not tested the mitogenic activity of the entire *c-mil* gene product on NR cells.

gag sequences (except the 18 nucleotides upstream from the splice donor site, which are probably translated in the 35-kDa protein) present in P100^{*gag-mil*} are not required for induction of proliferation. Identical results have been obtained for some other viral oncogenes containing viral *gag* gene sequences: *gag* sequences are not specifically required for transformation by *v-fps* in Fujinomi sarcoma virus (8), by *v-myc* in MC29 (28), or by *v-fms* in McDonough strain feline sarcoma virus (32). However, the growth rate of the proliferating NR cells obtained with the p35 ^{Δ c-*mil*} was lower than that obtained with the complete *v-mil* gene product. The four

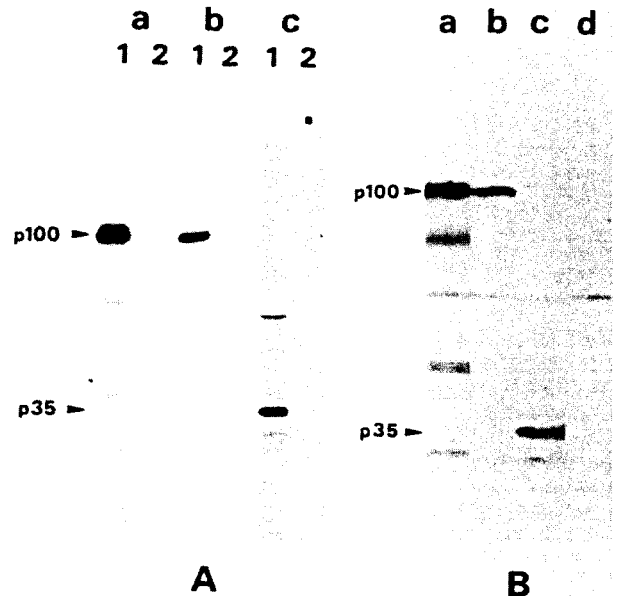


FIG. 3. Immunoprecipitated proteins. (A) NR cells transfected with pPVS (lanes a), pSpHc *mil*-RAF1 (lanes b), and pSmXH *c-mil* (lanes c) were labeled for 1 h with [³⁵S]methionine, lysed, and incubated with rabbit anti-*v-mil* antiserum prepared with a bacterially expressed polypeptide (lanes 1) or the same antiserum preincubated with the corresponding polypeptide (lanes 2). (B) These NR cells (10^6) were extracted, fractionated on a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel, transferred to nitrocellulose, and probed with anti-*v-mil* antiserum. Bound immunoglobulins were detected with ¹²⁵I-labeled protein A.

amino acid changes observed between p35^{Δc-mil} and the corresponding *v-mil* sequence could explain the difference in proliferating activity. Alternatively, the difference could be due to the deletion of nearly the whole *gag* gene in pSmXH *c-mil*; indeed, it has been shown that fusion of *c-fps* sequences with *gag* sequences can provide a mutagenic event able to activate the transforming potential of *c-fps* (9), and other studies suggest that *gag* gene sequences are not simply a vehicle for expression of a cellular gene in a retrovirus (25, 30). However, since p35^{Δc-mil} and p100^{gag-mil} exhibited similar steady-state levels in the proliferating cells, as shown by the immunoblotting technique (Fig. 3B), we can exclude an instability of p35^{Δc-mil} in explaining the difference observed in the growth rate shown in Fig. 2. Thus the amino-terminal part of P100^{gag-mil}, although not essential, might play a role in the strong mitogenic activity observed for the viral protein.

We thank M. B. Raes, B. Debuire, and K. E. Boulukos for their help in the manuscript preparation.

This work was supported by funds from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Centre National de la Recherche Scientifique, Institut Pasteur de Lille, and Ligue Nationale Française contre le Cancer.

LITERATURE CITED

- Bargmann, C. I., M. 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.
- 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 (London)* 316:559-562.
- Bonner, T. I., S. B. Kerby, P. Suttrave, M. A. Gunnell, G. Mark, and U. R. Rapp. 1985. Structure and biological activity of human homologs of the *raf-mil* oncogene. *Mol. Cell. Biol.* 5:1400-1407.
- Bunte, T., I. Greiser-Wilke, and K. Moelling. 1983. The transforming protein of the MC29-related virus CMII is a nuclear DNA-binding protein whereas MH2 codes for a cytoplasmic RNA-DNA binding polyprotein. *EMBO J.* 2:1087-1092.
- Calothy, G., F. Poirier, G. Dambrine, P. Mignatti, P. Combes, and B. Pessac. 1980. Expression of viral oncogenes in differentiating chick embryo neuroretinal cells infected with avian tumor viruses. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 44:983-990.
- 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.
- Flordellis, C. S., N. C. Kan, J. A. Lautenberger, K. P. Samuel, C. F. Garon, and T. S. Papas. 1985. Analysis of the cellular proto-oncogene *mht-raf*: relationship to the 5' sequences of *v-mht* in avian carcinoma virus MH2 and *v-raf* in murine sarcoma virus 3611. *Virology* 141:267-274.
- Foster, D. A., and H. Hanafusa. 1983. A *fps* gene without *gag* gene sequences transforms cells in culture and induces tumors in chickens. *J. Virol.* 48:744-751.
- Foster, D. A., M. Shibuya, and H. Hanafusa. 1985. Activation of the transformation potential of the cellular *fps* gene. *Cell* 42:105-115.
- Fukui, M., T. Yamamoto, S. Kawai, K. Maruo, and K. Toyoshima. 1985. Detection of a *raf*-related and two other transforming DNA sequences in human tumors maintained in nude mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:5954-5958.
- Galibert, F., S. Dupont de Dinechin, M. Righi, and D. Stehelin. 1984. The second oncogene *mil* of avian retrovirus MH2 is related to the *src* gene family. *EMBO J.* 3:1333-1338.
- Gazin, C., M. Rigolet, J. P. Briand, M. H. V. Van Regenmortel, and F. Galibert. 1986. Immunochemical detection of proteins related to the human *c-myc* exon 1. *EMBO J.* 5:2241-2250.
- Graham, F. L., and J. van der Eb. 1973. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52:456-461.
- Hu, S. S. F., C. Moscovici, and P. K. Vogt. 1978. The defectiveness of Mill-Hill-2, a carcinoma-inducing avian oncovirus. *Virology* 89:162-178.
- Iba, H., R. Jove, and H. Hanafusa. 1985. Lack of induction of neuroretinal cell proliferation by Rous sarcoma virus variants that carry the *c-src* gene. *Mol. Cell. Biol.* 5:2856-2859.
- Jansen, H. W., and K. Bister. 1985. Nucleotide sequence analysis of the chicken gene *c-mil*, the progenitor of the retroviral oncogene *v-mil*. *Virology* 143:359-367.
- Jansen, H. W., C. Trachmann, and K. Bister. 1984. Structural relationship between the chicken proto-oncogene *c-mil* and the retroviral oncogene *v-mil*. *Virology* 137:217-224.
- Kan, N. C., C. S. Flordellis, G. E. Mark, P. H. Duesberg, and T. S. Papas. 1984. A common *onc* gene sequence transduced by avian carcinoma virus MH2 and by murine sarcoma virus 3611. *Science* 223:813-816.
- Levy, J. B., H. Iba, and H. Hanafusa. 1986. Activation of the transforming potential of p60^{c-src} by a single amino acid change. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:4228-4232.
- Moelling, K., B. Heimann, P. Beimling, U. R. Rapp, and T. Sander. 1984. Serine- and threonine-specific protein kinase activities of purified *gag-mil* and *gag-raf* proteins. *Nature (London)* 312:558-561.
- Mölders, H., J. Defesche, D. Müller, T. I. Bonner, U. R. Rapp, and R. Müller. 1985. Integration of transfected LTR sequences into the *c-raf* proto-oncogene: activation by promoter insertion. *EMBO J.* 4:693-698.
- Ng, M., and M. L. Privalsky. 1986. Structural domains of the avian erythroblastosis virus *erbB* protein required for fibroblast transformation: dissection by in-frame insertional mutagenesis. *J. Virol.* 58:542-553.
- Pessac, B., and G. Calothy. 1974. Transformation of chick embryo neuroretinal cells by Rous sarcoma virus *in vitro*: induction of cell proliferation. *Science* 175:898-900.
- Prywes, R., J. G. Foulkes, and D. Baltimore. 1985. The minimum transforming region of *v-abl* is the segment encoding protein-tyrosine kinase. *J. Virol.* 54:114-122.
- Prywes, R., J. G. Foulkes, N. Rosenberg, and D. Baltimore. 1983. Sequences of the A-MuLV protein needed for fibroblast and lymphoid cell transformation. *Cell* 34:569-579.
- Rapp, U. R., M. D. Goldsborough, G. E. Mark, T. I. Bonner, J. Groffen, F. H. Reynolds, Jr., and J. R. Stephenson. 1983. Structure and biological activity of *v-raf*, a unique oncogene transduced by a retrovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:4218-4222.
- Schimizu, 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. USA* 82:5641-5645.
- Shaw, J., M. J. Hayman, and P. J. Enrietto. 1985. Analysis of a deleted MC29 provirus: *gag* sequences are not required for fibroblast transformation. *J. Virol.* 56:943-950.
- Sodroski, J. G., W. C. Goh, and W. A. Haseltine. 1984. Transforming potential of a human proto-oncogene (*c-fps/lfes*) locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3039-3043.
- Stone, J. C., T. Atkinson, M. Smith, and T. Pawson. 1984. Identification of functional regions in the transforming protein of Fujinami sarcoma virus by in-phase insertion mutagenesis. *Cell* 37:549-558.
- Suttrave, P., T. I. Bonner, U. R. Rapp, H. W. Jansen, T. Patschinsky, and K. Bister. 1984. Nucleotide sequence of avian retrovirus oncogene *v-mil*: homologue of murine retroviral oncogene *v-raf*. *Nature (London)* 309:85-88.
- Wheeler, E. F., M. F. Roussel, A. Hampe, M. H. Walker, V. A. Fried, A. T. Look, C. W. Rettenmier, and C. J. Scherr. 1986. The amino-terminal domain of the *v-fms* oncogene product includes a functional signal peptide that directs synthesis of a transforming glycoprotein in the absence of feline leukemia virus *gag* sequences. *J. Virol.* 59:224-233.

article 3
Soumis à Journal of Virology

**MAPPING BY IN VITRO CONSTRUCTS OF THE P100^{gag-mil}
REGION ACCOUNTING FOR THE INDUCTION OF CHICKEN NR
CELL PROLIFERATION**

JEAN COLL*, CHRISTINE DOZIER, SIMON SAULE, CATHERINE HENRY§, BRIGITTE
QUATANNENS, BRIGITTE DEBUIRE§ AND DOMINIQUE STEHELIN

INSERM U 186/ CNRS UA 04 1160, Institut Pasteur de Lille 59019 Lille cedex and §INSERM
U 124, IRCL 59045 Lille cedex

*Corresponding author.

Running title : *v-mil* mutants in CNR

Key Words : *v-mil* oncogene, mutants, proliferation, chicken neuroretina cells

ABSTRACT

The *v-mil* oncogene of the avian retrovirus MH2 is expressed as a fusion protein with viral *gag* determinants in infected cells. This P100*gag-mil* protein accounts for the proliferation of chicken embryo neuroretina cells (CNR) induced by MH2 in vitro. We constructed a series of mutants by in-frame deletions in different parts of the *gag* and *mil* domains and tested their ability to induce CNR growth. We show that *gag* sequences, as well as 200 bp 5' *mil* sequences, were not required to induce such a proliferation. However *gag* sequences seem to contribute to a full proliferation of growing CNR. In contrast deletions in the kinase domain abolish this induction. In particular, by deleting only 9 nucleotides localized around the unique SphI site of *v-mil* a totally inactive mutant (BalSp) was produced. This mutant directs the synthesis of a *v-mil* protein lacking the dipeptide Tyr-Leu which is conserved in almost all the members of the large protein kinase family and an histidine residue highly conserved in Ser/Thr protein kinase members.

INTRODUCTION

The avian carcinoma virus MH2 preferentially induces kidney and liver carcinomas in vivo and transforms fibroblasts and macrophages in vitro (17,28). MH2 also induces sustained growth of chicken embryo neuroretina cells (CNR) which are normally quiescent in culture (2). The genome of MH2 contains two cell-derived oncogenes : *v-mil* and *v-myc* (7,24,25). *v-mil* is expressed as the carboxyterminal moiety of a cytoplasmic 100 kDa fusion protein containing viral sequences (5,7), whereas the *v-myc* product is expressed through a subgenomic mRNA as a p61/63 nuclear protein (35,44). The study of spontaneous and in-vitro constructed mutants deleted in one or the other gene has demonstrated that the p61/63 *v-myc* protein is responsible for the transformation of fibroblasts and macrophages induced by MH2 as well as for the induction of kidney tumors in vivo (2,16). Conversely, the *v-mil* gene seems to have no obvious effect "per se" on these cells or when introduced alone into chicks (16). However, the P100gag-*mil* product abrogates growth factor dependence of macrophages transformed by *v-myc*, and is both necessary and sufficient to induce CNR proliferation (2,16,30). Furthermore P100gag-*mil* combined with *v-myc* leads to a high incidence of monocytic leukemia and liver tumors in chicks and so confers to MH2 a stronger oncogenic potential (16,28).

The biological function of *v-mil* is poorly documented. By sequence homology *v-mil* was found to be a member of the protein kinase family (15,23,26) and P100gag-*mil* was shown to have a Thr/Ser kinase activity in-vitro (33). Three independent MH2 isolates have been cloned in different laboratories and sequenced. The *v-mil* sequences of these three molecular clones show few point differences (15,23,26). The protein encoded by the pMH2-Hd clone used in the present work was recently shown in our laboratory to have a considerably reduced kinase activity in-vitro (Denhez et al. submitted). However, this clone retained wild type biological properties for macrophage transformation (T.Graf unpublished) as well as for CNR proliferation (2 and figure 4), and is referred therefore as wild type MH2 throughout this paper. The kinase domain shared with the oncogene kinase family (15) as well as with the cAMP dependent kinase (47) or the insulin receptor (52) represents the carboxyterminal part of the *v-mil* encoding domain. This part corresponds roughly to the part of the murine homologue of *c-mil* named *c-raf* transduced in the murine retrovirus MSV 3611 as *v-raf* (25,41,49). In contrast to *v-mil* in MH2, *v-raf* confers to MSV 3611 the ability to transform mouse fibroblasts in vitro and to induce neoplasia, mainly fibrosarcomas, in mice (42). From these data, we assume that the *gag-mil* coding capacity can be divided in three distinct regions : *gag* sequences, the 5' part of *v-mil* not transduced in *v-raf* and the 3' part of *v-mil* containing the kinase domain.

In order to obtain insight into the role of these regions in regard to the biological effect detected on CNR, we constructed in-frame deletion mutants affected in one of these three defined regions. The assay of these mutants in the CNR system showed that *gag* sequences as well as the 5' part of *v-mil* not transduced in MSV 3611 were not essential to the induction of proliferation by *v-mil* carrying viruses. However *gag* sequences were required to induce the biological response observed in *v-mil* proliferating CNR. On the other hand, viruses carrying mutations spanning the kinase

domain were no more able to induce such a proliferation.

MATERIALS AND METHODS

Cells, plasmids and transfections

Japanese quail embryo fibroblasts (QEF) for transfection were from 10-day old eggs and grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and 1% chicken serum (CS). CNR cell cultures were essentially prepared as described (2). Neuroretinas were dissected from 7-day old chick embryos. Cells were dissociated and resuspended in basal Eagle's medium (BEM) supplemented with 10 % FCS. pRAV-1 used in transfection experiments contained a permuted Rous associated virus 1 inserted in pBR322. The plasmid clones containing an entire MH2 provirus genome and used for mutagenesis were derivatives of previously described pMH2-Hd (7).

Transfection experiments were performed with plasmid DNA purified from CsCl gradient according to the calcium method developed by Graham and Van der Eb (18) and as previously described (7). 25 μ g of mutant DNA were added with 5 μ g of pRAV-1 DNA in either 0.5 ml volume to 60 mm dishes containing 10⁶ QEF, or in 1 ml volume to 100 mm dishes containing 10⁷ CNR. After 1 hr incubation, cells were fed with DMEM supplemented with 10 % FCS (QEF) or BEM supplemented with 10 % FCS (CNR). Transfected QEF were passaged twice and then maintained at confluence. Ten days after, groups of developing foci were picked, pooled and grown up. Transfected CNR were passaged the day after transfection and maintained in BEM, 5% FCS until proliferation become evident or morphological changes appeared in the culture. Then the cultures were processed for protein analysis and growth kinetic studies.

Construction of mutated MH2 plasmid clones

The general strategy to generate deletion mutants of MH2 involves the use of plasmids suitable for in vitro mutagenesis i.e. lacking cleavage sites for the following restriction endonucleases which were employed to delete parts of the gag and/or *mil* sequences : BamHI, BglII, HpaI, PvuII, Sall, SphI and StuI. For pHPv and pHSK, pMH2-Hd was digested with either HpaI and PvuII or HpaI and SphI. The HpaI/SphI digest was treated with the Klenow fragment of the DNA polymerase I in order to trim the SphI 3' protruding ends. The two vector fragments were then independently ligated with T4 DNA ligase, and were used to transform *E. coli* bacteria (strain HB101). DNAs from Ampicillin resistant colonies were screened for the desired constructs lacking the internal fragments of 490 bp for pHPv and of 540 bp for pHSK (15). Mutant pGRL was obtained by partial digestion of clone pPvS with BamHI and StuI followed by two subsequent treatments of the BamHI site with the Klenow fragment of DNA polI to recover the appropriate *v-mil* reading frame. The recircularized vector lacked the ca. 200 bp BamHI-StuI internal fragment. The detailed construction of pPvS was described elsewhere (10). In summary, pPvS is a mutant in which the *v-myc* gene was inactivated by an out-of-frame deletion between the PvuII and Sall sites, the Sall site being preserved by the deletion. For pBgX and pRSH, pMH2-Hd was digested with HpaI and BglII. The two generated fragments were separated by

electrophoresis, purified from an agarose gel and the 1.4 kbp internal fragment was digested, either with XhoII for pBgX, or RsaI for pRsH. The fragments XhoII-HpaI of 780 bp and BglII-RsaI of 1.2kbp were isolated, purified and ligated separately with the BglII-HpaI vector leading to pBgX and pRsH, respectively.

The pXSK mutant which carries a deletion between the XhoII and SphI sites in the middle of *v-mil* was obtained by a 3 step strategy in order to retain the open reading frame. First, pMH2-Hd was digested with BamHI/SphI and the 3 resulting fragments were isolated and purified. The larger BamHI-SphI fragment corresponding to the vector was treated with the Klenow fragment in order to fill BamHI ends and trim SphI ends. The blunt ends of the vector were ligated to yield closed circular plasmids transfected in HB101 bacteria. Plasmid DNAs of ampicillin resistant colonies were screened for the lack of the internal fragments. Appropriate Klenow treatment generated, in this intermediate construct, a new BamHI site at the recombination point. The BamHI-SphI fragment of 600 bp was digested with XhoII, and the resulting 350 bp BamHI-XhoII fragment was ligated with the first intermediate linearized at the BamHI site. After transfection, DNAs of colonies were screened for the desired orientation of the insert by restriction endonuclease mapping. A similar procedure was used to reintroduce in this second intermediate, at its unique BamHI site, the 1.4 kbp BamHI fragment. The resulting MH2 mutant, named pXSK, contained an in-frame deletion of only 240 bp in *v-mil* (see results section). Figure 1A presents a map of the different deletions of the mutants described above.

The procedure used to generate the mutant pBalSp is shown in figure 1B. It consists in producing the smallest in frame deletions at the unique SphI site present in *v-mil* by the exonuclease Bal31. The optimal range of Bal31 treatment was empirically determined by kinetics experiments varying time periods and enzyme concentrations, monitored by gel electrophoresis. 5µg of SphI linearized DNA were mixed in 50µl of 20mM Tris-HCl pH8, 200mM NaCl, 12mM CaCl₂, 12mM MgCl₂ and 1mM EDTA. The reaction, performed at 30°C, started with the addition of 0.5µl of Bal31 (40U/ml, BRL). Aliquots of 10µl (1µg) were taken every minute and added to 2µl of 0.5 M EDTA to stop the reaction. Samples were then pooled, treated with the Klenow enzyme to fill up recessed ends and ligated to close plasmid molecules. Wild type remaining molecules were eliminated before transfection in HB101 bacteria by digestion of ligated molecules with SphI. Plasmid DNAs from resistant colonies were checked by restriction enzyme analysis for the smallest deletions around the SphI site.

The construction of mutant pSGRL is depicted in figure 1C. pSGRL is the result of an hybrid construction between two plasmids derived from pMH2-Hd : pPvS and pSmXH *c-mil*. The detailed construction of pSmXH *c-mil* was described elsewhere (10). In summary, pSmXH *c-mil* contains the deletion in *v-myc* already described for pPvS and 9.4 kbp of genomic sequences derived from the 3' part of the chicken *c-mil* locus. These sequences include the last 8 exons of the gene homologous to the *v-mil* sequence downstream from the most 5' StuI site in this latter gene. Taking advantage of the conservation of this StuI site between the viral and the cellular genes, the 9.6 kbp StuI-SalI internal sequences of pSmXH *c-mil* were replaced by the 1.4 kbp StuI-SalI corresponding viral fragment from pPvS to yield pSGRL.

Virus titration, CNR infection and CNR growth kinetics

Supernatants of QEF transformed with each mutant were subjected to serial dilutions and added in 1 ml volume to 60 mm petri dishes containing 10^6 QEF. 12 hrs later, cells were overlaid with an 0.7% agar solution in DMEM supplemented with 10% FCS. The plates were screened for foci 10 days later.

CNR infection experiments were carried out on 100 mm culture plates containing 10^7 CNR with 10 ml of supernatant from each transformed QEF culture producing a given mutant virus (ca. 10^4 particles). The cells were then cultured in BEM, 10 % FCS. In CNR infected with MH2 proliferation become evident after 7 to 10 days (2). Uninfected or non-proliferating infected cells were passaged 4 times before either staining, or protein analysis, or growth kinetics studies. Plates selected to be stained were fixed and stained in Giemsa blue. As described (2) cultures used in growth assay were trypsinized and cells were seeded at low density (ca. 10^5 cells per 35 mm plate) in the same medium. The number of cells in one culture plate was scored every day.

DNA sequencing, protein labelling and gel analysis

For sequencing experiments plasmid pBalSp was digested with StuI. The c.a. 400 bp StuI fragment of *v-mil* from pBalSp and containing the deletion (15) was recovered from a 1 % agarose gel and digested with HaeIII and AluI. Nucleotide sequencing was performed by the Maxam and Gilbert procedure (32).

Protein labelling, immunoprecipitation and gel analysis were performed as previously described (3). The *v-mil* antiserum was a rabbit antiserum directed against the carboxyterminal part of P100*gag-mil* expressed in bacteria (9). The *v-myc* serum was a rabbit antiserum prepared with a bacterially expressed protein corresponding to the third exon of the human *myc* gene (11). This serum cross-reacts with the viral product (11). The *gag* antiserum was a rabbit serum directed against the *gag* gene of AEV (11).

RESULTS

Construction of MH2 deletion mutants

To identify the functional domains of P100*gag-mil* implicated in the proliferation of CNR, we constructed in-frame deletion mutants in different parts of the *gag-mil* sequences. For all the mutants, with the exception of pHPv, pGRL and pSGRL, the deletions kept the integrity of the *v-myc* gene in order to use its transforming ability as a selection marker of the different constructs in QEF. This strategy permitted to test the ability of these mutants to induce CNR proliferation upon both infection and transfection. The molecular clones employed to mutagenize MH2 were derivatives of pMH2-Hd carrying biologically active *v-mil* and *v-myc* genes (2,7) and pPvS, a molecular clone in which *v-myc* was inactivated by a deletion (10). The detailed procedure used to generate the deletions is described in Materials and Methods and figure 1. Mutants can be grouped in three sets carrying either (i) *gag* and/or 5' *v-mil* deletions, or (ii) *v-mil* central deletions, or (iii) 3' *v-mil* deletions.

(i) Mutants deleted in the 5' part of *gag-mil* coding sequences include mutants carrying deletions in both *gag* and 5' *v-mil* sequences (pBgX and pSGRL) and a mutant carrying a deletion of 5' *v-mil* sequences only (pGRL). In pBgX, the deletion extends from the BglII site in the p27 *gag* encoding domain (position 418) to the XhoII site in 5' *v-mil* sequences (position 627) (15). The 77 kDa protein encoded by this construct lacks 96 amino acid residues from p27 and p12 *gag* peptides and 114 amino acid residues from corresponding 5' *v-mil* sequences including the ATP-binding site. The construction of pSGRL allowed the expression of the entire *v-mil* kinase domain including the ATP-binding site, i.e. 317 amino acid residues, linked to the 6 first amino acid residues of *gag*. This p35 product should be encoded by a subgenomic mRNA resulting from a splicing event between the splice donor site of *gag* and the splice acceptor site of exon 4 from the chicken *c-mil* gene linked to *v-mil* sequences (position 578) (15,23). This was made possible by the reading frame compatibility between the two spliced sequences and by the conservation of a StuI site in *c-mil* and *v-mil* close to the splice acceptor site (figure 1C) (23). In pGRL the deletion extends from the BamHI site at the junction between the *gag* and the *mil* gene (position 514) to the StuI site at position 578 in the 5'*v-mil* sequences. The 92 kDa protein encoded by this construct lacks the 5'*v-mil* sequences also absent in pSGRL but retains the complete *gag* sequence of MH2. These two last constructs were named SGRL (for subgenomic *raf*-like) and GRL (for genomic *raf*-like) because both could express the portion of *v-mil* equivalent to *v-raf* (26,41).

(ii) Mutants deleted in the central part of *v-mil* were made in two ways. First, pXSK was deleted between the XhoII and SphI sites in *v-mil* so that it should direct the synthesis of a 91 kDa *gag-mil* protein lacking 79 amino acid residues of the kinase domain. This mutant retained in the amino-terminal part an intact ATP-binding site and the carboxy-terminal half of the kinase domain. Second, mutants were generated around the SphI site in *v-mil* by exonuclease Bal31. From all the clones selected for minimal deletions around the SphI site, only one, pBalSp, retained the correct reading-frame and was further characterized. DNA sequencing experiments were carried out to measure the extent of the deletion in this clone. As shown in figure 1B, the sequence spanning the deletion was identical to that of the wild type except for 9 nucleotides absent in pBalSp. This mutant should synthesize a *gag-mil* product lacking the 4 amino acid residues Tyr-Leu-His-Ala replaced by a serine residue.

(iii) Mutants deleted in the 3' part of *v-mil* specified the synthesis of *gag-mil* proteins truncated in their carboxyterminal part. pHPv should express a product lacking the last 9 amino acid residues of P100*gag-mil* replaced by 4 amino acid residues derived from *myc* sequences read out of frame (25). This mutant lacking 5' *v-myc* sequences, including the splice acceptor site, did not express any functional *v-myc* protein. pRsH should direct the synthesis of a 92 kDa product lacking 75 amino acid residues at its carboxy terminus (ligation of RsaI and HpaI blunt ends generated a TAA stop codon at the recombination point). In this mutant, the truncation hits the carboxy-terminal part of the kinase domain which is moderately conserved among oncogenes of the protein kinase family. pHSK should synthesize a 80 kDa product lacking 188 amino acid residues of the carboxyterminal part of P100*gag-mil*, replaced by 22 amino acid residues derived from out-of-frame 3' *v-mil* sequences and from *v-myc* intron (15). The deletion eliminated carboxy-terminal highly conserved sequences from the kinase domain.

Transfection on QEF, protein expression and virus production.

All constructs, as well as the wt pMH2-Hd clone as control, were transfected on QEF together with pRAV-1. The constructs carrying an active *v-myc* gene i.e. pBgX, pXSK, pBalSp, pHSK and pRsH induced the formation of foci within 7-8 days with the same efficiency as pMH2-Hd. Isolated foci from cultures transformed by each construct were pooled, amplified and screened for expression of viral proteins and virus production. Transformed cells were labelled with ^{35}S - methionine and the corresponding lysates were challenged with either *myc* or *mil* antisera. Immunoprecipitation with a *myc* antiserum allowed the detection, in all transformed cells, of a doublet of 61/63 kDa characteristic of the MH2 *v-myc* proteins (data not shown). Immunoprecipitation of these lysates with a *mil* antiserum allowed us to detect the *mil* related protein encoded by each of the deletion mutants. As shown in figure 2 (lanes i), cells transformed by our constructs synthesized *mil* polypeptides compatible in size with the expected product. An aliquot of the supernatant of each bulk of transformed foci was tested for the production of infectious viral particles. As shown by the results reported in table 1, the titer of the viruses produced ranged from $2.2 \cdot 10^3$ FFU/ml for BalSp to $7.7 \cdot 10^3$ FFU/ml for RsH as compared to the $5 \cdot 10^3$ FFU/ml obtained with the wild type. These mutant viruses were used in infection experiments on CNR. As expected from previous experiments showing no obvious effect of mutants containing only a *v-mil* functional gene, no foci were obtained after transfection with pHPv, pSGRL and pGRL which lack a functional *v-myc* gene. Thus no virus could be recovered from QEF transfected with pHPv, pSGRL and pGRL and only transfection experiments were performed on CNR with these last constructs to test the property of their *v-mil* related products.

Biological effect of MH2 mutants on CNR.

CNR from 7-day-old chicken embryos were cotransfected with plasmid DNA containing each of the deletion mutants and pRAV-1 or infected by the corresponding viruses produced by the transformed QEF. After 20 days, morphological changes appeared in the transfected or infected cultures, the delay being shorter (10 days) in the case of proliferating cultures. From here on and for mutants carrying a functional *v-myc* gene, only results obtained after infection are reported. Similar results were obtained in transfection experiments.

As illustrated in figure 3 for XSK and BalSp (figure 3, bottom row), CNR cultures infected with mutants XSK, BalSp, BgX, HSK and RsH after four passages gave numerous foci of dense "epithelial cells", isolated in the culture, and clearly distinct from normal cells (figure 3, first row, left panel). However, in contrast to CNR infected with MH2 wild type (figure 3, first row, right panel), these cells did not show a proliferating activity. These infected CNR were maintained until death without detecting any proliferating effect. Similar results were obtained with MC29, a virus expressing a *v-myc* gene fused to *gag* determinants, pointing out the role of *v-myc* in the morphological changes induced on infected and non-proliferating CNR. Indeed, experiments performed on CNR with the same mutants carrying an inactive *v-myc* gene resulted in the loss of the morphological changes induced with akin mutants carrying a functional *v-myc* gene (data not shown).

These data were confirmed by experiments of growth kinetics and ^{35}S -labelling of CNR cultures infected with each of these mutants. Some of the results obtained in this study are reported

in figure 4. As shown in figure 4A for XSK and BalSp, growth curves scored the non-proliferating activity of CNR infected with mutants BgX, XSK, BalSp, HSK and RsH. However, immunoprecipitation with an anti-*mil* serum of extracts prepared from these non-growing cells labeled with ^{35}S -methionine confirmed the presence of the expected truncated *gag-mil* products and therefore the expression of the introduced recombinant. Figure 4C shows an example of such an expression with the 100 kDa and 91 kDa *mil* related proteins synthesized by BalSp and XSK respectively (lanes 2) as well as the 61/63 kDa protein doublet characteristic of the expression of the *v-myc* gene of MH2 (lanes 3). In the same figure are shown similar CNR extracts challenged with an anti-*gag* serum (lanes 1). This serum detected predominantly Pr 76, the *gag* product from the RAV-1 helper virus and faintly the recombinant proteins suggesting a ratio between the two viral products in large favor of the helper virus, as expected from MH2 mutants having lost their growing advantage.

In contrast, growth curves indicated that CNR transfected with mutants HPV, GRL and SGRL were readily induced to proliferate (figure 4B). The growth rates of CNR induced to proliferate by GRL which carried a deletion of the most 5'*v-mil* sequences, and of CNR induced by HPV lacking the 9 carboxy terminal amino acid residues of P100*gag-mil* were similar to that of CNR transfected with PvS, a MH2 mutant carrying an inactive *myc* gene but still expressing a wild type P100*gag-mil* protein. The growth rate of cells transfected with mutant SGRL lacking almost the whole *gag* gene and part of 5' *v-mil* sequences was slightly lower than that obtained with cells induced to proliferate by GRL which shares with SGRL the same *v-mil* deletion. So the differential effect detected on CNR with two mutants expressing the same portion of *v-mil* seems to be due to the presence (GRL) or the absence (SGRL) of *gag* linked sequences. Figure 4C shows that the proliferating cells transfected with pHPv, pGRL and pSGRL synthesized, as expected from the construction, proteins of 100 kDa, 92 kDa and 35 kDa respectively, immunoprecipitated with anti-*mil* serum (lanes i). The morphology of GRL or SGRL as well as HPV infected cells was indistinguishable of that of PvS infected cells (10 and data not shown).

Figure 5 presents a summary of the results obtained with all the mutants on QEF and CNR and figure 6 represents the mapping of the deletions generated and their corresponding biological effect on CNR proliferation in relation to the structural features of the P100*gag-mil* protein. The common feature of these mutants with no effect on CNR proliferation was that they all carried deletions encompassing part of the kinase domain of *v-mil*. In the amino-terminal part of this domain, BgX which lacks 49 amino acid residues more than GRL or SGRL turned out to be inactive probably because of the loss of the ATP binding site (figure 5). In a same way a further truncation of 65 amino acid residues in the corresponding 3' part of the *v-mil* sequences (RsH) abolished the biological effect observed with a less severely truncated mutant (HPV). Of particular interest was mutant BalSp showing that a deletion of *v-mil* sequences as small as 4 amino acids residues (705 to 708) replaced by a serine residue abrogated the biological effect of P100*gag-mil* on CNR.

DISCUSSION

To determine the functional domains of P100*gag-mil* in the induction of CNR proliferation, we constructed a series of deletion mutants of a biologically active MH2 molecular clone, pMH2-Hd. These constructs were assayed on CNR either directly by transfection or by infection after selection on QEF of transforming viruses containing an active *v-myc* gene. These last viruses when harboring an inactive *v-mil* gene generated morphological changes of infected CNR cultures but did not induce proliferation of these cells.

Our results show that, in mutant SGRL, an extensive deletion of the *gag* gene (but the 6 aminoterminal residues), together with the deletion of the first 64 residues of *v-mil* specific sequences (positions 514 to 578) reduced only slightly the mitogenic property of the truncated 35 kDa ϵ *gag*- Δ *mil* protein. We conclude from these results that *gag* sequences are not essential in the induction of CNR proliferation by *v-mil* containing viruses. This was already shown for the transforming ability on fibroblasts of other *gag* linked oncogenes like, *v-fps* in FSV (14), *v-abl* in A-MuLV (39), or *v-fms* in GA-FeSV (54). However the lack of *gag* sequences in SGRL could explain the lower growth rate observed in SGRL transfected cultures. Indeed the results obtained with GRL which lacks the same 64 amino acid residues of amino-terminal *v-mil* sequences as SGRL but retains the *gag* sequences of P100*gag-mil* indicate that some *gag* sequences could play a role in the modulation of a fully sustained growth of *v-mil* triggered CNR. Consistent with this observation is our previous observation of a lower growth rate for CNR transfected with a mutant, SmXH *c-mil*, identical to SGRL in its *gag* content but expressing the *c-mil* counterpart of the *v-mil* content of SGRL (10). Apparently contrasting with the first point, a role for *gag* sequences was previously demonstrated for some *gag-onc* products. For example, *gag* sequences linked to *c-fps* activate the transforming potential of this cellular gene (13). Similarly, *gag* sequences play a role in the protein stability in the case of the lymphoid transformation induced by *v-abl* containing products (38). As we previously showed for SmXH *c-mil* (10), we did not detect a lower stability of SGRL p35 by immunoblotting (data not shown) that thus cannot explain the reduced growth rate of CNR infected by SGRL. Our study corroborates the idea that *gag* sequences are not always a simple vehicle for expression of a cellular gene in a retrovirus.

In addition, from the data obtained with mutants SGRL and GRL, we conclude that the first 64 amino acid residues of *v-mil* (514 to 578) are not essential for the biological effect induced by *v-mil*. This is not always the case for oncogenes of the protein kinase family as illustrated by FSV mutants showing that 5' *v-fps* sequences play a role in the transforming activity of this virus (1). As the growth curves of SGRL and SmXH *c-mil* CNR were similar, we can also exclude that the four mutations found in between these two constructs played a role in the lower growth rate observed with SmXH *c-mil* (10).

Interestingly the 5' *v-mil* sequences deleted in SGRL and GRL correspond approximately to the sequences absent in *v-raf* (26). *v-raf* is expressed by MSV 3611 as a fusion product with *gag* determinants, but in contrast to P100*gag-mil* the gp 75*gag-raf* protein is able to transform mouse fibroblasts in vitro (41,42). The deletion of the additional 5' sequences present in *v-mil* versus *v-raf* did not restore the ability of the recombinants SGRL and GRL to transform QEF. Thus it is

very unlikely that these 5' sequences display an inhibitory effect on the *v-mil* ability to transform fibroblasts. The differences of action between the two oncogenes may more probably be due to species specificity.

With mutant BgX which carries a further deletion of 50 amino acid residues (579 to 629) in the corresponding 5' part of *v-mil* with respect to SGRL and GRL, the biological activity was lost. Thus we can conclude that this region contains the 5' border of the minimal mitogenic part of *v-mil*. Within this region, around isoleucine 602, begins the homology found between *v-mil* and the protein kinase family (15 and figure 6). More precisely between position 603 and position 608 maps the canonical sequence Gly-X-Gly-X-X-Gly implicated in the ATP binding site of nucleotide binding proteins and at position 622 the lysine residue supposed to bind ATP. Lysine 622 was shown recently, by site directed mutagenesis, to be instrumental for both biological effect on CNR and autophosphorylating activity in vitro of P1008*ag-mil*(9). In the carboxy-terminal part of the protein, while the 9 carboxy-terminal amino acid residues could be deleted without affecting the property of this protein, a further deletion of 65 amino acid residues abolished the mitogenic property of the recombinant protein. This region defining the carboxy-terminal border of the minimal mitogenic *v-mil* protein, contains the most carboxy-terminal area of *v-mil* showing homologies with the protein kinase family (figure 6).

Between these two defined borders (positions 579 to 885) lies the region essential for the effects induced by *v-mil* on CNR and which roughly corresponds to the common domain shared by all the members of the protein kinase family. The importance of the integrity of the kinase domain for the transforming potential was already shown for other oncogenes of the kinase family as *v-erbB*, *v-abl* or *v-fps* (34,37,48). Figure 6 reports a schematic representation of this homology where a vertical bar represents a conservative amino acid residue present in at least 80% of the proteins listed in the materials section. Two of the amino acid residues (Tyr-705 and Leu-706) deleted in BalSp belong to these well conserved amino acids among the protein kinase family. Moreover, His-707 also deleted in the mutant is specific of a large majority of the members of the family displaying a Ser/Thr kinase activity (19). This area is found in the most highly conserved region of this family (12). Stone and coworkers have shown that an in-frame insertion of a linker at the corresponding site of the kinase domain of *v-fps*, which substitutes the tyrosine residue by the tripeptide Ser-Arg-Asp, abolishes the transforming potential of this gene on fibroblasts (48). Hence, high conservation among kinases and deleterious effects of independent limited mutations in this region of two *v-oncs*, both strongly suggest that this region is particularly important for the biological function of the corresponding proteins through their kinase activity. To emphasize the importance of this region in the kinase domain, it is noteworthy to observe that at position 378 in *c-src*, which corresponds to His-707 in *v-mil*, a substitution of the glutamic residue for a glycine activates the transforming potential and kinase activity of p60^{c-src} (29). Indeed, p60^{c-src} do not transform fibroblasts and do not induce either the proliferation of CNR when overexpressed in these cells (22). It would be therefore interesting to evaluate the autophosphorylating activity of mutant BalSp in vitro. However, pMH2-Hd, the clone used in our experiments and progenitor of BalSp was recently shown to display a considerably reduced kinase activity in vitro (Denhez et al. submitted). A similar situation was already found on CNR with mutants of p60^{v-src} which

displayed a mitogenic capacity in spite of their reduced kinase activity (36). Under these conditions, a comparative kinase assay between MH2-Hd and BalSp would not be significant. As the point mutation responsible for this reduction of activity in vitro (a serine for an asparagine residue at position 720) lies only 12 amino acid residues downstream from the deletion generated in BalSp, we cannot exclude a cooperation between these two mutations in the loss of the mitogenic property of BalSp. The restoration, at position 720 in BalSp, of an asparagine residue which is invariant in all known protein kinases would be useful to ascribe the precise role of region 705-708 in the biological function in relation with the in-vitro kinase assay. These mutants could be powerful tools to study this region probably directly involved in the catalytic function, not only of *v-mil*, but also of all the members of the protein kinase family.

We thank C.Lagrou for technical assistance, N.Devassine and V.Dufresnoy for patient typing and K.E.Boulukos for help in the manuscript preparation.

This work was supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Centre National de la Recherche Scientifique, the Association pour la Recherche contre le Cancer and the Institut Pasteur de Lille. C.Dozier was supported by a fellowship from the Association pour la Recherche contre le Cancer.

LITTERATURE CITED

01. Ariizumi, K. and M. Shibuya. 1985. Construction and biological analysis of deletion mutants of Fujinami sarcoma virus : 5'-*fps* sequence has a role in the transforming activity. J. Virol. 55 : 660-669.
02. 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 (London) 316 : 559-562.
03. Bennet, M.K. and M.B. Kennedy. 1987. Deduced primary structure of the β subunit of brain type II Ca^{++} / calmodulin-dependent protein kinase determined by molecular cloning. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 : 1794-1798.
04. 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.
05. Bunte, T., I. Greiser-Wilke and K. Moelling. 1983. The transforming protein of the MC29-related virus CMII is a nuclear DNA-binding protein whereas MH2 codes for a cytoplasmic RNA-DNA binding polyprotein. EMBO J. 2 : 1087-1092.
06. Chan, A.M.L., H.W.S. King, P.R. Tempest, E.A. Deakin, C.S. Cooper and P. Brookes. 1987. Primary structure of the met protein tyrosine kinase domain. Oncogene 1 : 229-233.
07. Coll, J., M. Righi, C. de Taisne, C. Dissous, A. Gégonne 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.
08. Coussens, L., T.L. Yang-Feng, Y.C. Liao, E. Chen, A. Gray, J. Mc Grath, P.H. Seeburg, T.A. Libermann, J. Schlessinger, U. Francke, A. Levinson, A. Ullrich. 1985. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with *neu* oncogene. Science 230 : 1132-1139.
09. Denhez, F., B. Heimann, L. d'Auriol, T. Graf, M. Coquillaud, J. Coll, F. Galibert, K. Moelling, D. Stehelin and J. Ghysdael. 1988. Replacement of lys 622 in the ATP binding domain in P100*gag-mil* abolishes the in vitro autophosphorylation of the protein and the biological properties of the *v-mil* oncogene of MH2 virus. EMBO J. : in press
10. Dozier, C., F. Denhez, J. Coll, P. Amouyel, B. Quatannens, A. Begue, D. Stehelin and S. Saule. 1987. Induction of proliferation of neuroretina cells by long terminal repeat activation of the carboxy-terminal part of *c-mil*. Mol. Cell. Biol. 7 : 1995-1998.
11. Ferré, F. P. Martin, A. Begue, J. Ghysdael, S. Saule et D. Stéhelin. 1986. Preparation and characterization of specific antisera directed against different polypeptidic domains encoded by the human *c-myc* oncogene to analyse the expression of this gene introduced into quail or rat cells. C.R. Acad. Sc. Paris, 303, p633-636.
12. Foster, D.A., J.B. Levy, G.Q. Daley, M.C. Simon and H. Hanafusa. 1986. Isolation of Chicken cellular DNA sequences with homology to the region of viral oncogenes that encodes the tyrosine domain. Mol. Cell. Biol. 6 : 325-331.

13. Foster,D.A., M.Shibuya and H.Hanafusa. 1985. Activation of the transformation potential of the cellular *fps* gene. Cell 42 : 105-115.
14. Foster,D.A. and H.Hanafusa. 1983. A *fps* gene without *gag* gene sequences transforms cells in culture and induces tumors in chickens. J. Virol. 48 : 744-751.
15. Galibert, F., S.Dupont de Dinechin, M.Righi and D.Stehelin. 1984. The second oncogene *mil* of avian retrovirus MH2 is related to the *src* gene family. EMBO J. 3 : 1333-1338.
16. Graf.T., F.V.Weizsaecker, S.Grieser, J.Coll, D.Stehelin, T.Patschinsky, 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.
17. Graf,T., and D.Stehelin. 1982. Avian leukemia viruses. Oncogenes and genome structure. BBA Revs. Cancer 651, 245-271.
18. Graham,F.L. and J.van der Eb. 1973. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. Virology 52 : 456-461.
19. Hanks,S.K. 1987. Homology probing : identification of cDNA clones encoding members of the protein-serine kinase family. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84 : 388-392.
20. Hanley,R.M., A.R.Means, T.Ono, B.E.Kemp, K.E.Burgin, N.Waxham and P.T.Kelly. 1987. Functional analysis of a complementary DNA for the 50 Kd subunit of calmodulin kinase II. Science 237 : 293-297.
21. Huleihel,M., M.Goldsborough, J.Cleveland, M.Gunnell, T.Bonner and U.R.Rapp. 1986. Characterization of murine *A-raf*, a new oncogene related to the *v-raf* oncogene. Mol. Cell. Biol. 6 : 2655-2662.
22. Iba,H., R.Jove and H.Hanafusa. 1985. Lack of induction of neuroretinal cell proliferation by Rous Sarcoma Virus variants that carry the *c-src* gene. Mol. Cell. Biol. 5 : 2856-2859.
23. Jansen,H.W. and K.Bister. 1985. Nucleotide sequence analysis of the chicken gene *c-mil*, the progenitor of the retroviral oncogene *v-mil*. Virology 143 : 359-367.
24. Jansen,H.W., B.Ruckert., R.Lurz. and K.Bister. 1983. Two unrelated cell-derived sequences in the genome of avian leukemia and carcinoma inducing retrovirus MH2. EMBO J. 2, 1969-1975.
25. Kan,N.C., C.S.Flordellis, G.E.Mark, P.H.Duesberg and T.S.Papas. 1984. Nucleotide sequence of avian carcinoma virus MH2 : two potential *onc* genes, one related to avian virus MC29 and the other related to murine sarcoma virus 3611. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81 : 3000-3004.
26. Kan,N.C., C.S.Flordellis, G.E.Mark, P.H.Duesberg and T.S.Papas. 1984. A common *onc* gene sequence transduced by avian carcinoma virus MH2 and by murine sarcoma virus 3611. Science 223 : 813-816.
27. Knopf,J.L., M.H.Lee, L.A.Sultzman, R.W.Kriz, C.R.Loomis, R.M.Hewick and R.M.Bell. 1986. Cloning and expression of multiple protein kinase C cDNAs. Cell 46 : 491-502.
28. Linial,M. 1982. Two retroviruses with similar transforming genes exhibit differences in transforming potential.Virology 119, 382-391.

29. Levy, J.B., H. Iba and H. Hanafusa. 1986. Activation of the transforming potential of p60^{c-src} by a single amino acid change. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 : 4228-4232.
30. Martin, P., C. Henry, F. Denhez, P. Amouyel, C. Bechade, G. Calothy, B. Debuire, D. Stehelin and S. Saule. Characterization of a MH2 Mutant Lacking the v-myc oncogene. Virology 153, 272-279.
31. 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.
32. Maxam, A.M. and W. Gilbert. 1980. Sequencing end labeled DNA with base specific chemical cleavages. Methods Enzymol. 65 : 499-560.
33. Moelling, K., B. Heimann, P. Beimling, U.R. Rapp and T. Sander. 1984. Serine- and threonine-specific protein kinase activities of purified gag-mil and gag-raf proteins. Nature (London) 312 : 558-561.
34. Ng, M. and M.L. Privalsky. 1986. Structural domains of the avian erythroblastosis virus *erbB* protein required for fibroblast transformation : dissection by in-frame insertional mutagenesis. J. Virol. 58 : 542-553.
35. Pacht, C., B. Biegelke and M. Linial. 1983. RNA and protein encoded by MH2 virus : evidence for subgenomic expression of v-myc. Virology 45, 133-139.
36. Poirier, F., G. Calothy, R.E. Karess, E. Erikson and H. Hanafusa. 1982. Role of p60^{src} kinase activity in the induction of neuroretinal cell proliferation by Rous Sarcoma Virus. J. Virol. 42 : 780-789.
37. Prywes, R., J.G. Foulkes and D. Baltimore. 1985. The minimum transforming region of v-*abl* is the segment encoding protein-tyrosine kinase. J. Virol. 54 : 114-122.
38. Prywes, R., J. Hoag, N. Rosenberg and D. Baltimore. 1985. Protein stabilization explains the gag requirement for transformation of lymphoid cells by Abelson murine leukemia virus. J. Virol. 54 : 123-132.
39. Prywes, R., J.G. Foulkes, N. Rosenberg and D. Baltimore. 1983. Sequences of the A-MuLV protein needed for fibroblast and lymphoid cell transformation. Cell 34 : 569-579.
40. Quintrell, N., R. Lebo, H. Varmus, J.M. Bishop, M.J. Pettenati, M.M. Le Beau, M.O. Diaz and J.D. Rowley. 1987. Identification of a human gene (*HCK*) that encodes a protein-tyrosine kinase and is expressed in hemopoietic cells. Mol. Cell. Biol. 7 : 2267-2275.
41. Rapp, U.R., M.D. Goldsborough, G.E. Mark, T.I. Bonner, J. Groffen, F.H. Reynolds, Jr. and J.R. Stephenson. 1983. Structure and biological activity of v-*raf*, a unique oncogene transduced by a retrovirus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 : 4218-4222.
42. Rapp, U.R., F.H. Reynolds, Jr. and J.R. Stephenson. 1983. New mammalian transforming retrovirus : demonstration of a polyprotein gene product. J. Virol. 45 : 914-924.
43. Reimann, E.M., K. Titani, L.H. Ericsson, R.D. Wade, R.D. Fisher, E.H. Fisher and K.A. Walsh. 1984. Homology of the γ subunit of phosphorylase b kinase with c-AMP dependent protein kinase. Biochemistry 23 : 4185-4192.

44. 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
45. Semba,K., M.Nishizawa, N.Miyajima, M.C.Yoshida, J.Sukegawa, Y.Yamanashi, M.Sasaki, T.Yamamoto and K.Toyoshima. 1986. *yes*-related protooncogene, *syn*, belongs to the protein-tyrosine kinase family. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 83 : 5459-5463.
46. Selten,G., H.T.Cuypers, W.Boelens, E.R.Maandag, J.Verbeek, J.Domen, C.van Beveren and A.Berns. 1986. The primary structure of the putative oncogene *pim-1* shows extensive homology with protein kinases. Cell 46 : 603-611.
47. Shoji,S., D.Parmelee, R.Wade, S.Kumar, L.Ericsson, K.Walsh, H.Neurath, G.Long, J.Demaille, E.Fisher and K.Titani. 1981. Complete amino acid sequence of the catalytic subunit of the bovine cardiac muscle cyclic AMP-dependent protein kinase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 : 848-851.
48. Stone,J.C., T.Atkinson, M.Smith and T.Pawson. 1984. Identification of functional regions in the transforming protein of Fujinami sarcoma virus by in-phase insertion mutagenesis. Cell 37 : 549-558.
49. Sutrave,P., T.I.Bonner, U.R.Rapp, H.W.Jansen, T.Patschinsky and K.Bister. 1984. Nucleotide sequence of avian retrovirus oncogene *v-mil* : homologue of murine retroviral oncogene *v-raf*. Nature (London) 309 : 85-88.
50. Takahashi,M. and G.M.Cooper. 1987. *ret* transforming gene encodes a fusion protein homologous to tyrosine kinases. Mol. Cell. Biol. 7 : 1378-1385.
51. Takio,K., R.D.Wade, S.B.Smith, E.G.Krebs, K.A.Walsh and K.Titani. 1984. Guanosine cyclic 3',5'-phosphate dependent protein kinase, a chimeric protein homologous with two separate protein families. Biochemistry 23 : 4207-4218.
52. Ullrich,A., J.R.Bell, E.Y.Chen, R.Herrera, L.M.Petruzzelli, T.J.Dull, A.Gray, L.Coussens, Y.C.Liao, M.Tsubokawa, A.Mason, P.H.Seeberg, C.Grunfeld, O.M.Rosen and J.Ramachandran. 1985. Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. Nature (London) 313 : 756-761.
53. Voronova,A.F. and B.M.Sefton. 1986. Expression of a new tyrosine protein kinase is stimulated by retrovirus promoter insertion. Nature 319 : 682-685.
54. Wheeler,E.F., M.F.Roussel, A.Hampe, M.H.Walker, V.A.Fried, A.T.Look, C.W.Rettenmier and C.J. Scherr. 1986. The amino-terminal domain of the *v-fms* oncogene product includes a functional signal peptide that directs synthesis of a transforming glycoprotein in the absence of Feline leukemia virus *gag* sequences. J. Virol. 59 : 224-233.
55. Ziegler S.F., J.D.Marsh, D.B.Lewis and R.M.Perlmutter.1987. Novel protein-tyrosine kinase gene (*hck*) preferentially expressed in cells of hematopoietic origin. Mol. Cell. Biol. 7: 2276-2285.

TABLE 1. Virus production of QEF transformed with the different mutants carrying an active *v-myc* gene.

mutant	Titer ^a (FFU/ml)
wt MH2-Hd	5.0 10 ³
RsH	7.7 10 ³
HSK	5.0 10 ³
BalSp	2.2 10 ³
XSK	2.7 10 ³
BgX	3.5 10 ³

^a Average of 3 independent experiments determined on QEF. FFU, Focus forming units.

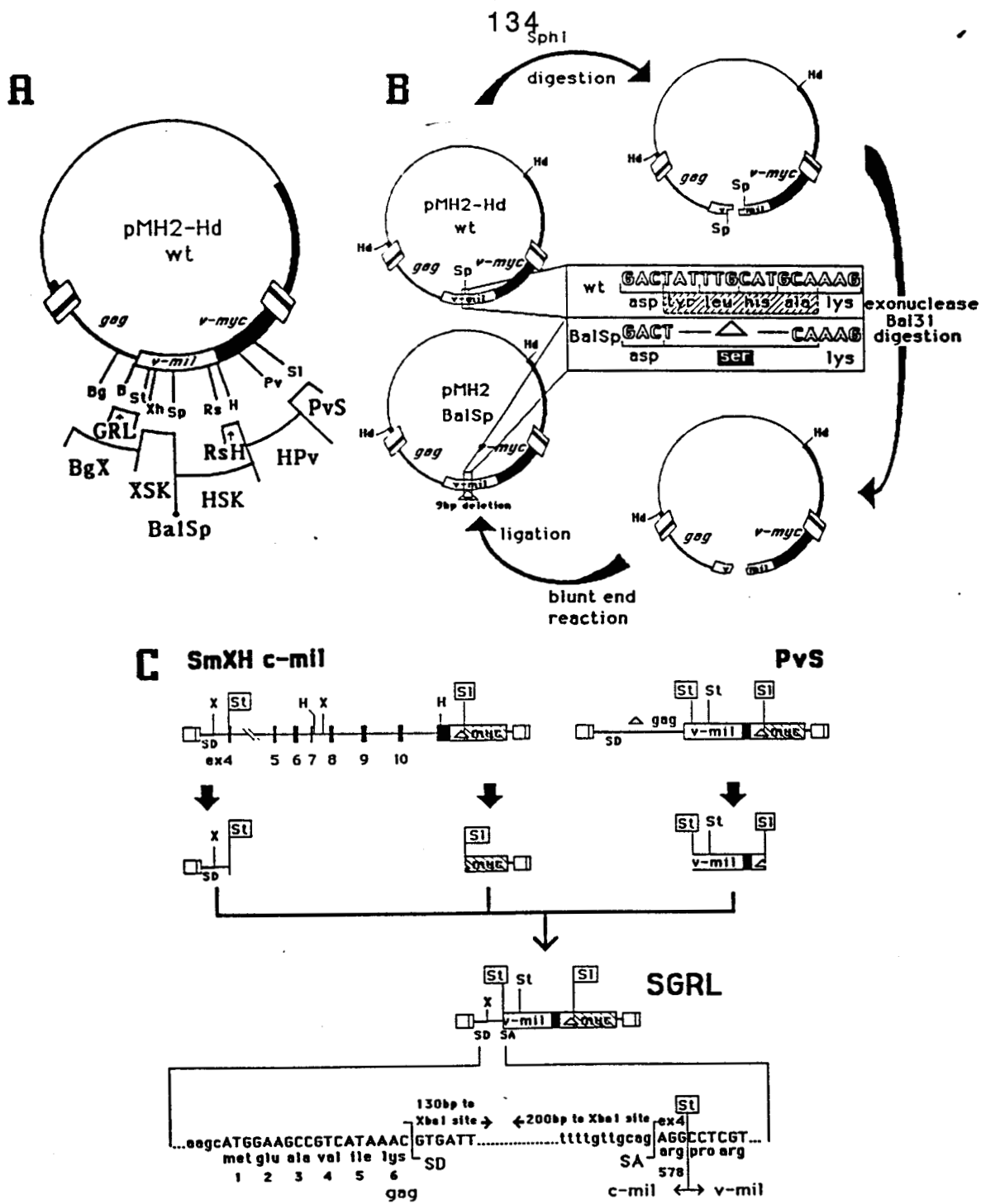


Figure 1 : Construction of recombinant proviruses. **Panel A**: mapping of the deletion mutants on the wild type clone pMH2-Hd. **Panel B**: strategy used to generate the deletion in mutant pBalSp. Sequences around the deletion site in pBalSp and pMH2Hd are shown and boxed. The four amino acid residues deleted are striped in the pMH2Hd sequence and the new serine residue generated in pBalSp is boxed in black. **Panel C**: construction of recombinant pSGRL. **|** : *c-mil* exons ; **—** : introns. SD : splice donor ; SA : splice acceptor. Stippled boxes are *v-myc* intronic sequences and striped boxes are *v-myc* non coding sequences. Amino acid residues are numbered according to their position in the wild type P100*gag-mil* protein. Abbreviations for restriction sites : B, BamHI ; Bg, BglIII ; St, StuI ; Sp, SphI ; Rs, RsaI ; H, HpaI ; Pv, PvuII ; S1, Sali ; Hd, HindIII ; X, XbaI.

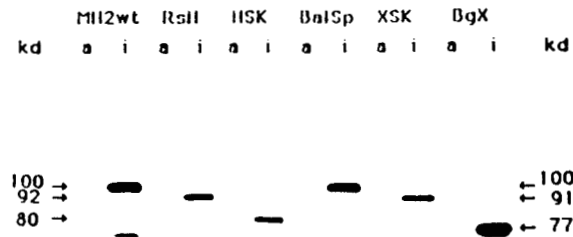


Figure 2 : Analysis of mutant proteins in QEF. Radiolabelled QEF transfected with the different constructs were immunoprecipitated with rabbit anti *v-mil* serum (lanes i) or with an anti *v-mil* serum preincubated with a *v-mil* polypeptide (lanes a). MH2 wt refers to QEF transformed with pMH2-Hd.

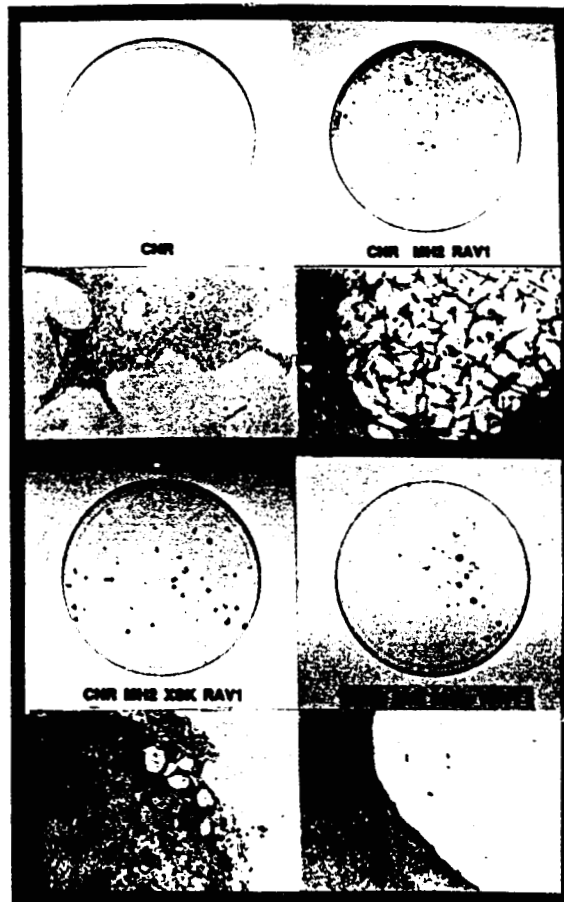


Figure 3 : Morphology of CNR cell cultures. Non infected cultures (CNR) or cultures infected with wild type MH2-Hd (CNR MH2 RAV-1) or infected with non-mitogenic mutants XSK (CNR MH2 XSK RAV-1) and BalSp (CNR MH2 BalSp RAV-1). Top row : aspect of 3 weeks of culture plates after fixation and coloration. Bottom row : same culture plates at higher magnification.

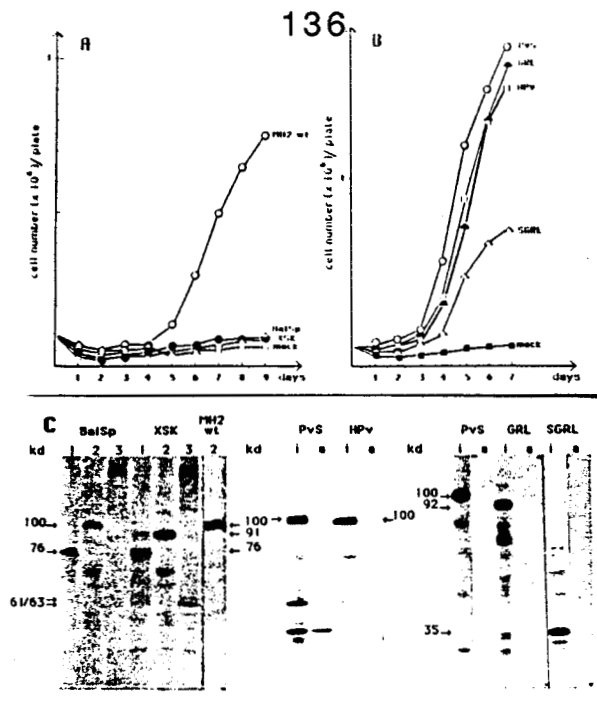


Figure 4 : Growth kinetics and protein expression in infected or transfected CNR. Panel A : growth curves of non infected CNR (mock), CNR infected with MH2-Hd (MH2 wt) or with mutants (BalSp, XSK). Panel B : growth curves of untransfected CNR (mock) or CNR transfected with different constructs carrying an inactive *v-myc* oncogene with either a wild type P100gag-*mil* protein (PvS) or mutated *v-mil* products (GRL, HPV and SGRL). Panel C : expression of viral proteins in infected CNR immunoprecipitated with an antigag serum (lanes 1), anti *v-mil* serum (lanes 2) or anti *v-myc* serum (lanes 3). Expression of viral proteins in transfected CNR challenged with an anti *v-mil* serum (lanes i) or preadsorbed *v-mil* serum (lanes a).

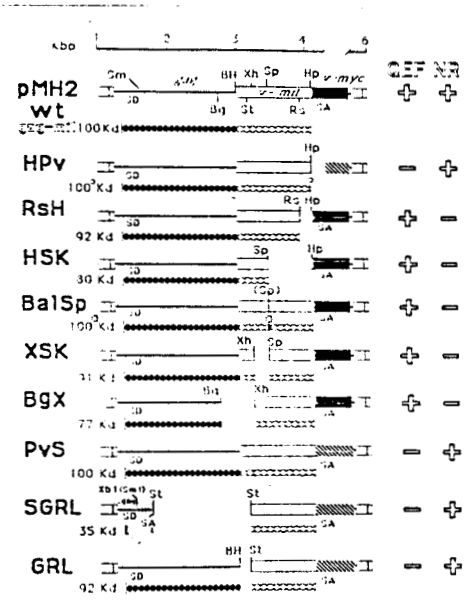


Figure 5 : Summary of the constructs and their biological effect. For each construct a schematic map of the deletion and the corresponding *v-mil* product with their related size are presented. ° and * mark the slightly smaller 100 kDa proteins produced by mutants HPV and BalSp respectively. Open boxes are *v-mil* sequences, closed boxes are active *v-myc* genes and striped boxes represent inactive *v-myc* genes, and the squared box represents *c-mil* intronic sequences. Open circles and closed squares represent respectively the *v-mil* and *gag* parts of expressed proteins. Abbreviations for restriction sites: Sm, SmaI ; Bg, BglII ; BH, BamHI ; St, StuI ; Xh, XhoII ; Sp, SphI ; Rs, RsaI ; Hp, HpaI. XbI (Sml) : XbaI site generated by linker insertion in the SmaI site of *gag*. SD : splice donor ; SA : splice acceptor. QEF: Quail embryos fibroblasts; NR: Chicken neuroretina cells.

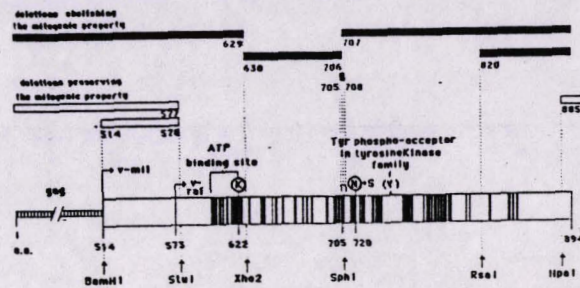


Figure 6 : Mapping of the deletion mutants in relation to structural features of P1008ag-mil . Amino acid residues bracketing the deletions and other relevant residues are shown and numbered according to their position in P1008ag-mil . The striped area defines the kinase domain of v-mil by homology with other members of the protein kinase family. Each vertical bar represents an amino acid residue present in v-mil and conserved in at least 80% of the oncogenes and other proteins of the kinase family listed hereafter. Conservative amino acid substitutions were the following: G=A=V=L=I; E=D; K=R; Q=N; Y=T=S; Y=F. Single letter code : G, glycine ; A, alanine ; V, valine; L, leucine ; I, isoleucine ; E, glutamic acid ; D, aspartic acid ; K, lysine ; R, arginine ; Q, glutamine ; N, asparagine ; Y, tyrosine ; T, threonine ; S, serine ; F, phenylalanine. Oncogenes v-mos, v-fps, v-yes, v-src, v-erbB, v-fes and v-fms were compared to v-mil from position 514 to position 894 (15). Between position 691 and position 789, 24 other genes have been added to the study, namely the v-ros, v-fgr, v-abl oncogenes, TKR 11, TKR 16, the insuline receptor, the bovine cAMP dependent protein kinase (12) and v-kit (4), lck (53), neu (8), met (6), A-raf (21), trk (31), syn (45), lyn (55), hck (40,55), ret (50), pim-1 (46) oncogenes, the protein kinase C-1 (27), the cGMP dependent protein kinase (51), the IGF-I receptor (6), the γ subunit of the phosphorylase kinase (43) and the α (20) and β (3) subunits of the calmodulin kinase II. K : lysine 622 instrumental in biological properties and in vitro kinase activity ; N - S : serine 720 found in pMH2-Hd instead of an asparagine residue invariant in this position in all known protein kinases. (Y) position of the invariant tyrosine residue autophosphorylated in members of the tyrosine kinase family (12).



RESUME

Le rétrovirus transformant MH2 est un virus aviaire défectif qui contient 2 oncogènes d'origine cellulaire : v-mil et v-myc. Le gène v-mil représente une version tronquée et mutée du gène c-mil de poulet et résulte de la transduction de la partie carboxy-terminale de ce gène. Cette partie du gène possède des homologies de séquence avec le domaine catalytique des protéines kinases.

Le gène v-mil est traduit sous forme d'une protéine de fusion P100gag-mil qui présente une activité sérine/thréonine kinase *in vitro*. Contrairement à l'oncogène v-myc, v-mil ne transforme pas les macrophages de poulet. Cependant, la présence de v-mil au sein du virus MH2 est responsable de la croissance autocrine des macrophages transformés par ce virus, ainsi que de l'effet mitogène de ce virus sur les cellules de neurorétine d'embryons de poulet de 7 jours.

Nous nous sommes intéressés au modèle des cellules de neurorétine pour étudier le rôle de v-mil et de son homologue cellulaire c-mil :

- En substituant les séquences gag-mil du virus MH2 par la portion carboxy-terminale du gène c-mil, que nous avons isolée et caractérisée, nous avons montré que cette portion du gène c-mil (qui contient le domaine kinase) est capable d'induire la prolifération des cellules de neurorétine. L'ensemble des résultats permet de dégager un schéma général d'activation du gène c-mil qui suppose une amputation de sa portion amino-terminale plutôt que l'accumulation de mutations ponctuelles.

- En construisant des mutants de délétion dans différentes régions de la P100gag-mil, nous avons déterminé que la portion de cette protéine, qui correspond strictement au domaine kinase de v-mil, est essentielle et suffisante pour l'activité mitogène sur les cellules de neurorétine.

Nous avons poursuivi l'étude du gène c-mil en isolant des ADNc mil. Deux ADNc distincts (par au moins 60 bp de séquence codante) ont été isolés et caractérisés et nous avons montré qu'ils correspondaient à deux ARN messagers produits par épissage alterné du gène c-mil. Ces deux ARN coderaient pour les protéines c-mil de 71 et 73 Kd détectées *in vivo*.