

50376  
1988  
93

50376  
1988  
93

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

N° d'ordre 235

## THESE

présentée pour l'obtention du grade de  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES  
ET TECHNIQUES DE LILLE

option : BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE

par

Marie-Fabienne DENHEZ

ETUDE DE L'ACTIVITE KINASE ET DES  
PROPRIETES BIOLOGIQUES DU PRODUIT DE  
TRADUCTION DE L'ONCOGENE v-mil



\*0300058636\*

soutenue le 10.6.88 devant la commission d'examen



Président : Professeur J.MONTREUIL

Rapporteurs : Professeur J.KREMBEL  
Professeur A.BURNY

Examineur : Professeur D.STEHELIN

*How often have I said to you, that when you have eliminated the impossible, whatever remains however improbable must be the truth.*

*Sherlock Holmes.*

*Je suis très heureuse de profiter de l'occasion de cette thèse pour remercier Dominique STEHELIN de m'avoir accueillie dans son laboratoire où il sait maintenir des "conditions de culture riches" pour travailler.*

*Je remercie Jacques GHYSDAEL qui a su être un directeur de thèse patient et rigoureux. J'ai été très contente de travailler dans son équipe qu'il sait toujours motiver avec son tempérament de "fonceur".*

*Je remercie Monsieur le Professeur J.MONTREUIL d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse et Monsieur le Professeur J.KREMBEL d'en être le rapporteur. Vous avez été tous deux mes professeurs de Licence et de Maîtrise et j'en garde un excellent souvenir.*

*Je remercie Monsieur le Professeur A.BURNY d'avoir bien voulu juger ce travail et faire partie de ce jury.*

*Je remercie toute l'équipe de l'U186 dans laquelle il régnait une ambiance formidable. J'aurai quand même une petite pensée particulière pour mon voisin de paillasse, le grand DL, avec qui j'aimais bien me chamailler.*

*Je remercie Nicole DEVASSINE et Valérie DUFRESNOY, les deux secrétaires de choc de l'unité qui ont été assez chics pour assurer la frappe de ce mémoire. Merci beaucoup !*

*Merci aussi à Monsieur Macintosh ...*

*Je tiens à remercier toutes les générations de cafetières que j'ai croisées au cours de ces années passées au laboratoire et qui ont péri à la tâche. J'ai vraiment passé d'excellents moments à leur côté en parlant quelques fois "manips", mais pas toujours...*

*Je remercie le Ministère de la Recherche ainsi que la Ligue Nationale Française Contre le Cancer qui m'ont accordé l'aide financière dont j'ai bénéficiée pendant la préparation de cette thèse.*

**CODE des AAs**

-----  
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

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, LHCMMME, 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

M. 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. CABILLARD 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. BCSCQ 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. DYMMENT 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. FROUVOST Jean	Minéralogie
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. SALMER Georges	Electronique
M. SCHAMPS Joel	Spectroscopie moléculaire
M. SEGUIER 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. BCDARD 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. DENUNTER Paul	Sociologie
M. DENEL Jacques	Informatique
M. DE PARIS Jean Claude	Analyse
M. DEPREZ 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 hertziennne
M. DUBERULLE Alain	Spectroscopie hertziennne
M. DUBUS Jean Paul	Spectrométrie des solides

M. DUPONT Christophe	Vie de la firme (I.A.E.)
Mme EVRARD Michéline	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. LANCRAND Claude	Probabilités et statistiques
M. LATTEUX Michel	Informatique
Mme LECLERCQ Ginette	Catalyse
M. LEFEBVRE Jacques	Physique
M. LEFEBVRE 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

## LISTE DE PUBLICATIONS

C.BECHADE, G.CALOTHY, B.PESSAC

P.MARTIN, J.COLL, F.DENHEZ, S.SAULE, J.GHYSDAEL and D.STEHELIN.

Induction of proliferation or transformation of neuroretina cells by the *mil* and *myc* viral oncogenes.

Nature, **1985**, 316, 559-562

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

Characterisation of a MH2 mutant lacking the *v-myc* oncogene

Virology, **1986**, 153, 272-279

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

Induction of proliferation of neuroretina cells by long terminal repeat activation of the carboxy-terminal part of *c-mil*

Molecular and Cellular Biology, **1987**, 7, 1995-1998

F.DENHEZ, B.HEIMANN, L.d'AURIOL, M.COQUILLAUD, J.COLL, T.GRAF, F.GALIBERT, K.MOELLING, D.STEHELIN and J.GHYSDAEL

Replacement of Lys 622 in the ATP binding domain of p100<sup>gag-mil</sup> abolishes the in vitro autophosphorylation of the protein and the biological properties of the *v-mil* oncogene of MH2 virus

EMBO, **1988**, 7, 541-546.

C.DOZIER, F.DENHEZ, C.HENRY, J.COLL, A.BEGUE, B.QUATANNENS, S.SAULE and D.STEHELIN

Alternative Splicing of RNAs transcribed from the chicken *c-mil* gene

Molecular and Cellular Biology, **1988**, 8, 1835-1838.

F.DENHEZ, 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

Oncogene Research, sous presse.

## GLOSSAIRE

- ADNc** : copie d'ARN en ADN double brin.
- ALV** : Avian Leukemia Virus.
- Banque d'ADNc** : ensemble de cDNA représentant tous les ARNs messagers exprimés dans une cellule.
- cAMP** : AMP cyclique.
- CNR** : Chicken Neuroretina Cell.
- DAG** : Diacylglycérol.
- DLV** : Defective Leukemia virus.
- DM** : Double minute (chromosome).
- EGF** : Epidermal Growth Factor.
- FEP** : Fibroblastes embryonnaires de poulet.
- FSBA** : pFluoroSulfonylBenzoylAdenosine.
- GTP** : Guanosine TriPhosphate.
- HSR** : Homogenously Stained Region.
- Ig** : Immunoglobulines.
- IP3** : Inositol Triphosphate.
- kb** : Kilobase (millier de bases) ; unité de taille.
- kbp** : Kilobase-paire (millier de paire de base) ; unité de taille.
- kd** : Kilodalton (unité de masse moléculaire).
- LTR** : Long Terminal Repeat (promoteur fort de transcription viral).
- MMTV** : Mouse Mammary Tumour Virus.
- NAD** : Nicotinamide Adénine Dinucléotide.
- NR** : Neurorétine.
- PIP2** : Phosphatidyl Inositol Biphosphate.
- PK** : Protéine-Kinase.
- PKA** : cAMP dépendante protéine-kinase.
- PKC** : Protéine Kinase C.
- PLCII** : Phospholipase II.
- PTK** : Protéine-Tyrosine-Kinase.
- px** : Protéine x mature.
- ppx** : Phosphoprotéine x.
- Px** : Protéine de fusion x.
- Pr** : Protéine précurseur.

**QNR :** Quail Neuroretina Cell.

**RSV :** Rous Sarcoma Virus.

**Suppression :** dans le sens "suppression du phénotype transformé".

**T3/T4 :** Hormones thyroïdiennes (Tyroxine et Tyronine).

**ts :** Thermosensible.

**UDPG :** Uridyl Diphosphate Glucose.

**UTP :** Uridyl Triphosphate.

**Western Blot :** Technique d'étude des protéines par transfert sur une feuille de nitrocellulose fixant les protéines et permettant leur quantification.

## PRESENTATION DU MEMOIRE

## AVANT-PROPOS

Le sujet de ce mémoire est l'étude de la fonction biochimique du produit de traduction de l'oncogène *v-mil* et de l'importance de cette fonction pour les propriétés biologiques qui sont associées à l'expression de cet oncogène dans différents systèmes cellulaires. *v-mil* a été trouvé dans le génome d'un rétrovirus aviaire, MH2, qui contient en plus de *v-mil* un deuxième oncogène, *v-myc*.

Dans la première partie des résultats, nous montrons que le produit de traduction de l'oncogène *v-mil* (*P100gag-mil*) possède une activité protéine-kinase spécifique de résidus sérine et thréonine et que cette activité est indispensable à la protéine pour les propriétés biologiques qui sont associées à son expression.

Dans la seconde partie des résultats, nous décrivons un isolat particulier de MH2 dont le produit de traduction (*P100gag-mil*) présente une activité kinase faible dans des expériences d'autophosphorylation *in vitro* alors que les propriétés biologiques classiquement associées à l'expression de *v-mil* sont conservées.

Pour pouvoir situer l'oncogène *v-mil* dans le contexte des oncogènes, nous avons divisé l'introduction de ce mémoire en trois chapitres.

Dans le premier chapitre nous avons tenté de résumer brièvement ce qu'est un oncogène, comment il est devenu transformant et comment on peut le mettre en évidence. Ce chapitre se termine sur la description de gènes dont le rôle est de contrer l'action des oncogènes dans une cellule normale : ce sont les anti-oncogènes.

La *P100gag-mil* possédant une activité kinase, le second chapitre est réservé à cette classe d'enzymes. Après quelques généralités, nous avons décrit les deux groupes de kinases dans lesquels on trouve des oncogènes : les protéine-tyrosine-kinases et les protéine-sérine-kinases. Il était très difficile d'être exhaustif et de poser un modèle général dans lequel on aurait pu faire entrer tous les oncogènes dont les produits de traduction sont des kinases. Aussi, nous avons préféré prendre dans chaque classe de kinase un exemple et à chaque fois que cela a été possible nous avons généralisé les observations à tous les membres de la catégorie concernée.

Le troisième chapitre est consacré au rétrovirus qui héberge l'oncogène *v-mil* : MH2. Dans ce chapitre, nous décrivons les différents systèmes biologiques que nous utilisons dans l'étude de *v-mil*. Cette partie se termine sur la description de différentes observations sur l'implication du locus *c-RAF*, l'homologue cellulaire humain de *v-mil*, dans différents cancers humains.

# PLAN

# **INTRODUCTION**..... P 20

## **- GENERALITES**..... P 21

### **A - INTRODUCTION.**

- 1) ALV (Avian Leukemia Viruses).
- 2) DLV (Defective Leukemia Viruses).

### **B - ONCOGENES.**

- 1) CONSERVATION PHYLOGENETIQUE DES ONCOGENES.
- 2) CLASSIFICATION DES ONCOGENES.
  - a) Protéines homologues à des facteurs de croissance.
  - b) Protéines de la famille *ras*.
  - c) Protéines nucléaires.
  - d) Protéines homologues à la phospholipase C.
- 3) MODES D'ACTIVATION DES PROTO-ONCOGENES.
  - a) Insertion rétrovirale.
  - b) Mutation ponctuelle.
  - c) Translocations chromosomiques.
  - d) Amplification génique.
- 4) COMMENT TROUVER DE NOUVEAUX ONCOGENES ?
  - a) Test NIH 3T3.
  - b) Transfection d'ADN de LTR.
  - c) Utilisation de sondes oligonucléotidiques.
- 5) ONCOGENESE : PROCESSUS MULTI-ETAPE.

### **C - LES GENES SUPPRESSEURS : EMEROGENES.**

- a) Suppression de la tumorigénicité par formation d'hybrides somatiques.
- b) Sélection de Révertants.
- c) Court circuit (By Pass) du blocage de la différenciation (par un oncogène).
- d) Description d'un candidat à la fonction de gène suppresseur : RB1.
- e) Suppression par des produits diffusés par des cellules.
- f) Oncosuppression par les parvovirus.

**- PROTEINE-KINASES..... P 54**

**A - INTRODUCTION.**

**B - CARACTERISATION DU DOMAINE CATALYTIQUE.**

**C - LES DIFFERENTES CLASSES DE PROTEINE-KINASES.**

1) CLASSIFICATION.

2) COMMENT DETECTER DE NOUVELLES KINASES ?

**D - MODES DE REGULATION DES PROTEINE-KINASES.**

1) REGULATION AU NIVEAU DES GENES.

a) "Multi gene family".

b) Epissage alternatif.

2) REGULATION AU NIVEAU BIOCHIMIQUE.

a) Les seconds messagers.

b) Régulation par phosphorylation/déphosphorylation.

**E - LES PROTEINE-TYROSINE-KINASES.**

1) LES PROTEINES CYTOPLASMIQUES : Un exemple : *src*.

a) Synthèse et modifications post-traductionnelles de la protéine virale.

b) Sites de phosphorylation de *pp60<sup>v-src</sup>*.

c) Organisation de la protéine *pp60<sup>v-src</sup>*.

d) La protéine cellulaire *src*.

2) LES PROTEINES TRANSMEMBRANAIRES : un exemple *erbB*.

a) La protéine virale.

b) La protéine cellulaire.

c) Phosphorylation du récepteur de l'EGF.

d) Le domaine catalytique du récepteur de l'EGF.

3) GENERALISATION.

**F - LES PROTEINE-SERINE-KINASES.**

**G - CONCLUSION.**

- LE RETROVIRUS AVIAIRE MH2..... P 78

A - STRUCTURE et EXPRESSION du PROVIRUS.

B - PROPRIETES BIOLOGIQUES de MH2.

1) LES MACROPHAGES.

a) Le système.

b) Le cMGF.

2) LES NEURORETINES.

3) LES FIBROBLASTES.

C - ORGANISATION GENOMIQUE DE L'EQUIVALENT CELLULAIRE DE  
*v-mil : c-mil.*

D - HYPOTHESES SUR LA GENESE DE MH2.

E - PROTEINES "*mil*" VIRALE ET CELLULAIRES.

F - *raf* : HOMOLOGUE MURIN DE *mil*.

1) 3611 MSV.

2) FAMILLE DES GENES *raf*.

3) LOCALISATIONS CHROMOSOMIQUES.

G - MODES D'ACTIVATION DES GENES *c-mil / raf*

1) LTR ACTIVATION

2) ACTIVATION AU COURS DU TEST NIH3T3

3) MODELE

H - IMPLICATION DU LOCUS *RAF* DANS DES CANCERS HUMAINS

**RESULTATS**..... P 96**PRESENTATION DU TRAVAIL**

I<sup>ère</sup> PARTIE : Démonstration de la nature intrinsèque de l'activité kinase de la P100*gag-mil*.  
Etude de son rôle dans les propriétés biologiques associées à l'expression de *v-mil*.

II<sup>ème</sup> PARTIE : Etude d'un mutant de MH2 : mise en évidence d'une région conservée dans les protéine-kinases

**DISCUSSION**..... P 115**BIBLIOGRAPHIE**..... P 119**ANNEXE**..... P 141

ARTICLE 1 : Replacement of Lys 622 in the ATP binding domain of P100*gag-mil* abolishes the *in vitro* autophosphorylation of the protein and the biological properties of the *v-mil* oncogene of MH2 virus

ARTICLE 2 : 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.

# INTRODUCTION

# GENERALITES

## A-INTRODUCTION.

Le pouvoir de certains virus (les rétrovirus oncogènes aigus) à provoquer de façon reproductible des cancers chez les animaux a soulevé la question : les cancers humains peuvent-ils être d'origine virale ? Il semblerait, en effet, que certains virus soient associés de manière significative avec le développement de certains cancers. Cependant, l'expérience montre que d'autres événements sont requis, en plus de la présence du virus, pour qu'un cancer se développe chez un individu particulier. Les virus pour lesquels il existe de très fortes présomptions sur leur implication dans des développements malins sont, entre autres, le virus de l'hépatite B, le virus d'Epstein Barr (EBV), les virus de papillomes et depuis récemment le virus HTLV1 (Human T cell Leukemia/Lymphoma Virus).

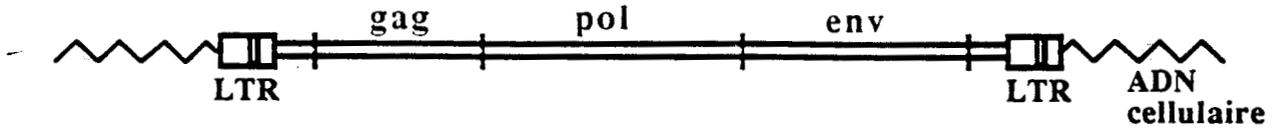
Le virus de l'hépatite B est responsable d'une forme de jaunisse. Dans un nombre de cas relativement faible, la jaunisse induite par ce virus devient chronique et, dans un petit nombre de cas, cette hépatite chronique conduit à un cancer du foie. Il y a de fortes raisons de penser que la présence du virus seule soit insuffisante et que celle d'autres facteurs (tels que des carcinogènes chimiques) soit requise pour aboutir à l'étape de cancérisation.

Le virus EBV provoque en principe une maladie bénigne du sang, la mononucléose infectieuse. Cependant, dans certains pays, il est étroitement associé avec le développement d'une forme de leucémie (lymphome de Burkitt) dans un contexte que l'on commence à connaître : il faudrait apparemment que des lymphocytes infectés par le virus EBV, très tôt dans la vie du sujet, soient stimulés à se diviser de manière continue sous l'action d'un agent, tel que celui responsable du paludisme, et que parmi ces lymphocytes, il y en ait un qui ait subi des altérations chromosomiques particulières (translocation chromosomique).

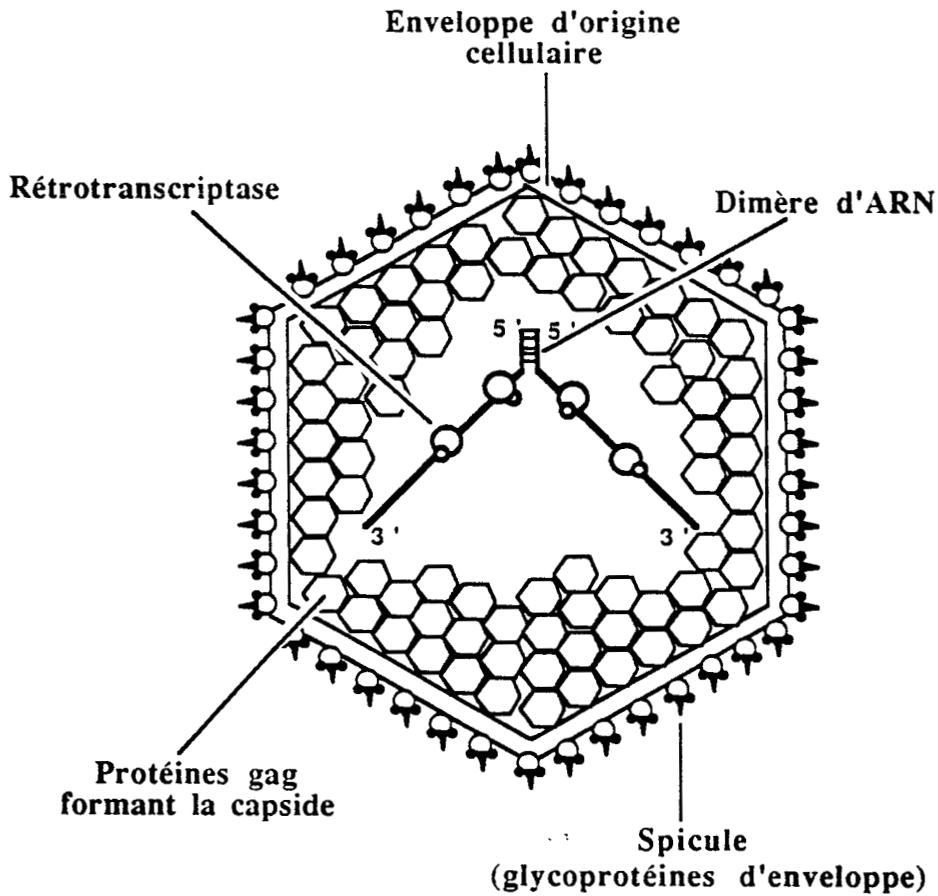
Les papillomavirus induisent généralement des tumeurs bénignes de la peau et des muqueuses (verruques, papillomes). Ces lésions se stabilisent en général, régressent occasionnellement, cependant certaines évoluent parfois vers la malignité.

Le cas d'HTLV1 est un peu plus particulier. Ce virus est étroitement associé à des leucémies ou lymphomes des cellules T matures dont l'issue est très rapidement fatale. A l'heure actuelle, certaines observations font qu'il n'est pas exclu que le déterminisme des leucémies et lymphomes T par HTLV1 fasse intervenir un ou plusieurs co-facteurs qui sont encore à identifier.

Cette liste ne cite que quelques exemples de virus impliqués dans le développement de



### A - Structure d'un provirus ALV



### B - Morphologie d'une particule virale

figure 1

certains cancers et n'est pas exhaustive, on n'y trouve pas, par exemple, le virus HIV (Human Immunodeficiency Virus) qui favorise l'apparition de cancers "opportunistes".

Chez l'homme, on ne connaît pas (encore ?) de virus capables d'induire des cancers avec une efficacité comparable à celle des virus oncogènes chez les animaux. Ces virus sont capables de provoquer la mort de l'animal quelques semaines après l'infection. Il était difficile d'imaginer que les virus qui induisent de manière si spécifique et si reproductible des cancers chez les animaux puissent un jour servir de modèles d'étude des mécanismes impliqués dans le phénomène de cancérisation chez l'homme. C'est pourtant ce qui est arrivé grâce à l'essor de la biologie moléculaire qui a permis d'identifier, au sein de ces virus particuliers que sont les rétrovirus oncogènes, une information génétique spécifique à chaque virus et de montrer que cette même information génétique existait également dans le génome d'animal non infecté et dans le génome humain aussi ! Cette découverte fut d'une importance capitale car elle jeta les bases d'une hypothèse génétique unificatrice de la cancérogénèse qu'elle soit virale, chimique ou physique.

Ces virus animaux aux propriétés oncogènes font partie de la classe des rétrovirus. Le groupe qui a sans doute été le plus étudié est celui des rétrovirus aviaires qui, selon leur aptitude à se répliquer, se divisent en deux groupes : les ALV et les DLV.

#### 1) ALVs (Avian Leukemia Viruses).

La plupart du temps les virus de ce premier groupe sont peu pathogènes, cependant, ils sont capables d'induire à long terme (6 mois à 1 an) des leucémies. Leur génome est diploïde et est constitué de deux ARN monocaténares mesurant 8 à 9 kb contenant les capacités codantes pour 3 gènes majeurs (figure 1A).

- le gène **gag** qui code pour les protéines de la nucléocapside du virion.
- le gène **pol** qui code pour la reverse transcriptase dont le rôle est de copier (rétrotranscrire) l'ARN simple brin en ADN double brin qui sera ensuite intégré sous forme de provirus dans le génome de la cellule infectée.
- le gène **env** qui code, à partir d'un ARN sous-génomique, pour les protéines d'enveloppe.

En outre, en 5' et en 3' de ces séquences, l'ARN génomique contient diverses séquences essentielles pour la propagation de ces rétrovirus (par exemple, les signaux d'encapsidation de l'ARN). Après l'infection, les ARN de l'ALV sont rétrotranscrits en ADN double brin ; c'est sous cette forme provirale que le virus s'intègre dans le génome de la cellule hôte (figure 1A) où il sera considéré par la cellule comme faisant partie de son propre matériel génétique. Le provirus utilise alors la machinerie cellulaire pour produire de nouveaux ARN viraux ainsi que des protéines

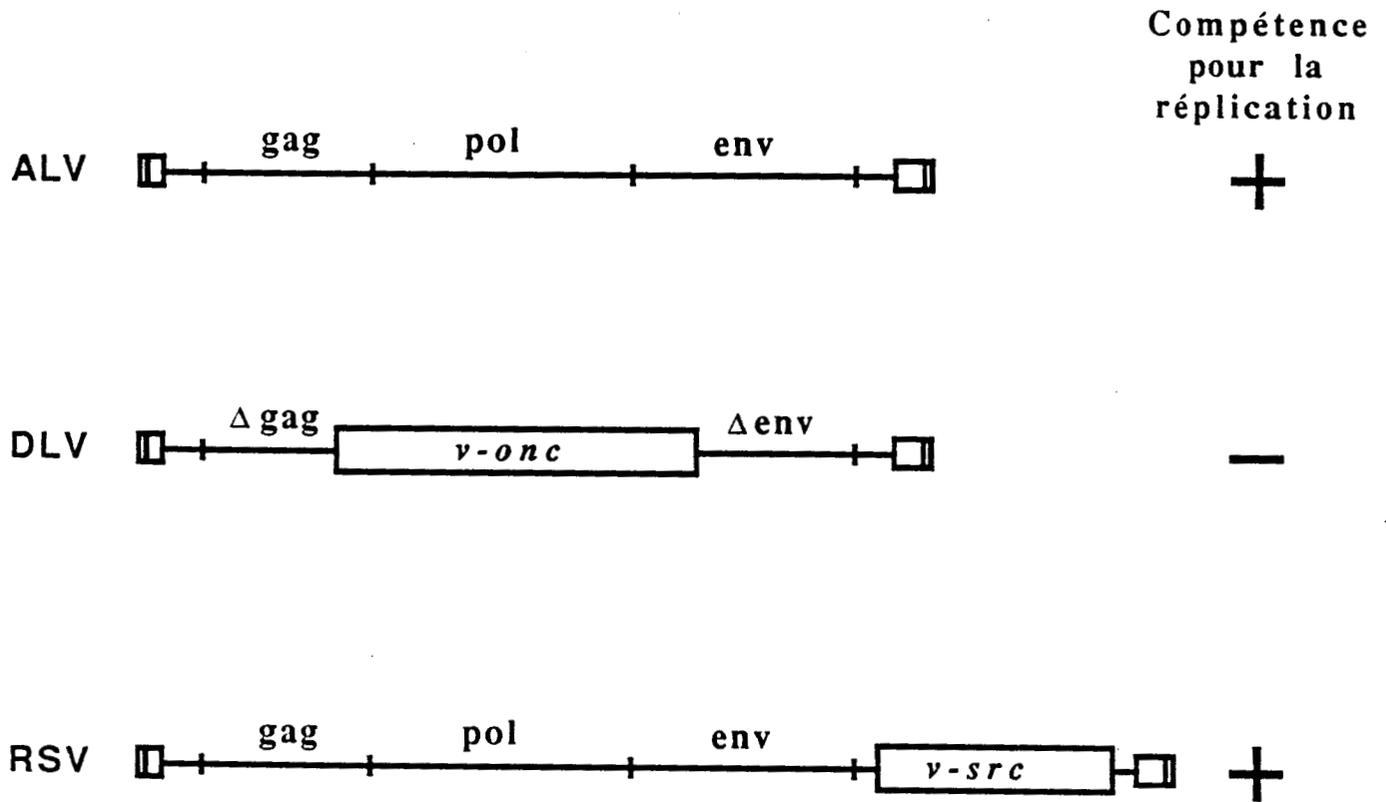


figure 2 : Génome des rétrovirus et compétence pour la réplication.

virales. Ces dernières seront assemblées pour former de nouvelles particules virales dans lesquelles viendront s'encapsider les ARN viraux (figure 1B).

## 2) DLV (Defective Leukemia Viruses).

Ces virus sont les plus étudiés. Ce sont en fait des ALV qui ont transduit dans leur génome des gènes d'origine cellulaire (oncogènes) qui leur confèrent des propriétés oncogènes *in vivo* et souvent transformantes *in vitro*. Cette recombinaison s'est généralement réalisée au détriment d'un, ou plusieurs, des gènes de structure *gag*, *pol* ou *env*. Ayant perdu une partie de leur information génétique virale, par délétion partielle ou totale (figure 2), ces virus sont devenus défectifs pour la réplication et requièrent pour leur propagation la présence d'un virus compétent (virus "helper" du type ALV décrit dans le paragraphe précédent). La seule exception connue est le virus RSV qui a transduit dans son génome l'oncogène *src* sans altérer aucun gène de structure (figure 2).

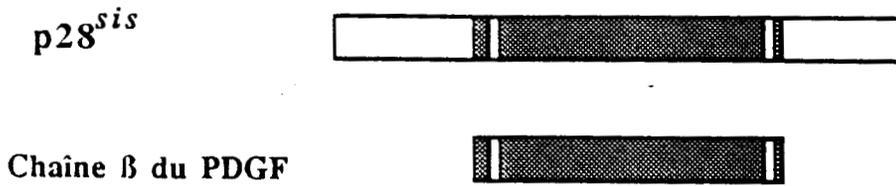
Chaque oncogène, et par extension le gène cellulaire correspondant ou proto-oncogène, est désigné par un code de 3 lettres qui dérive soit du nom du virus à partir duquel la séquence a été isolée (par exemple l'oncogène *v-mil* du rétrovirus MH2, Mill Hill N°2), soit du nom de celui qui l'a identifié pour la première fois (*abl* : Abelson) ou encore qui correspond à une abréviation du nom de la maladie induite (*src* : sarcome ; *erb* : érythroblastose). Lorsqu'il s'agit d'un oncogène humain les trois lettres s'écrivent en majuscule. Plusieurs oncogènes semblables ayant été trouvés dans différents isolats, ce code de 3 lettres est souvent précédé par le nom ou le préfixe du virus correspondant (ainsi, les oncogènes *v-Ha-ras* et *v-Ki-ras* ont été isolés respectivement des virus Harvey et Kirsten). Les préfixes *v-* et *c-* indiquent s'il s'agit du gène viral ou de son équivalent cellulaire, quand il n'y a pas de préfixe il s'agit toujours du gène viral.

## B- ONCOGENES.

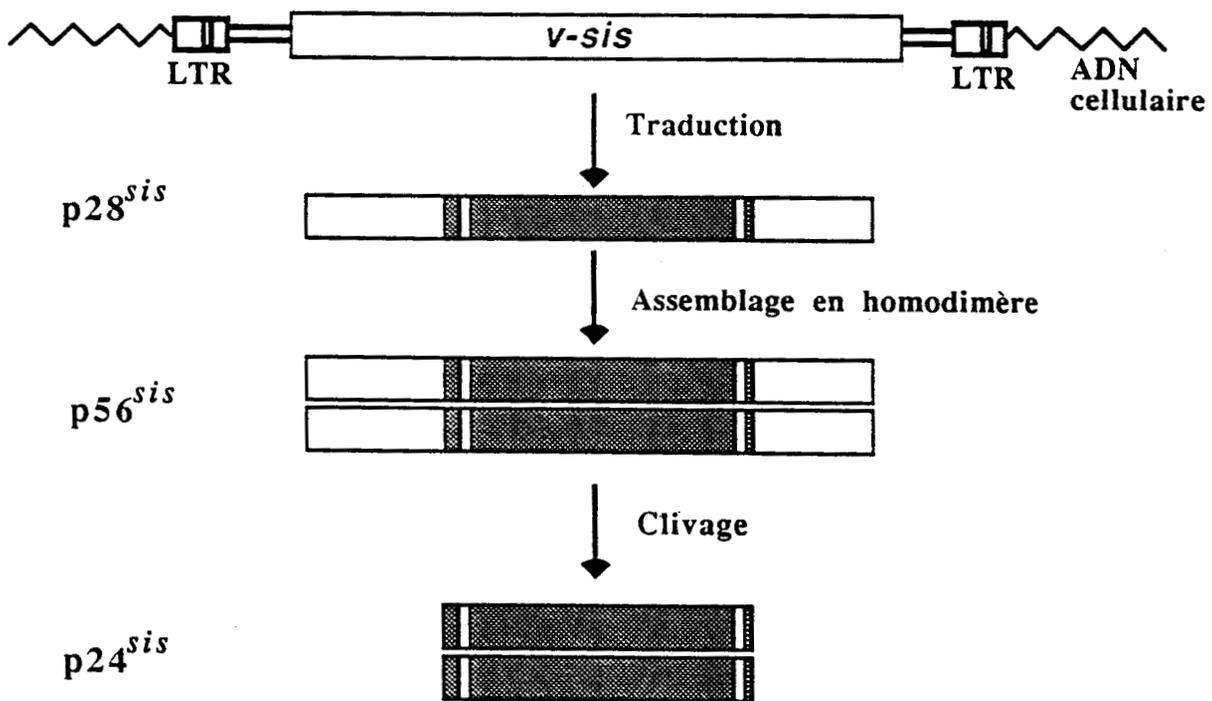
### 1) CONSERVATION PHYLOGENETIQUE DES ONCOGENES.

En 1976 Stéhelin *et al.* démontraient que l'oncogène *v-src* provient d'une séquence d'origine cellulaire qu'un rétrovirus aviaire a transduit dans son génome. Il s'est rapidement révélé que cette séquence cellulaire existait aussi bien dans le génome humain que dans celui de poulet.

Depuis, tous les oncogènes isolés et étudiés montrent que la conservation phylogénétique semble être une propriété intrinsèque des oncogènes, ce qui suggère fortement que ces gènes sont importants sinon essentiels pour la vie de la cellule (Bishop, 1981).



**A** - Régions d'homologies (■) entre le produit de *v-sis* et la chaîne  $\beta$  du PDGF. (schéma).



**B** - Modifications post-traductionnelles du produit de traduction de *v-sis*.

figure 3

## 2) CLASSIFICATION DES ONCOGENES.

Sur la base de la fonction (parfois présumée par homologie avec la séquence peptidique de protéines dont on connaît la fonction) et/ou de la localisation cellulaire de leur produit, la plupart des oncogènes peuvent être classés en 5 groupes : les protéine-kinases, les protéines homologues à des facteurs de croissance, les protéines de la famille *ras*, les protéines nucléaires et vient de s'ajouter une protéine oncogène homologue à la phospholipase C (PLC). Le groupe des kinases est actuellement, et de loin, celui qui contient le plus d'oncogènes ; il fera donc l'objet de la II<sup>o</sup> partie qui lui est exclusivement réservée. Dans ce paragraphe, nous n'aborderons donc que les oncogènes dont les produits de traduction ne sont pas des kinases.

### a) Protéines homologues à des facteurs de croissance.

Un archétype de situation pour les cellules transformées est la perte du contrôle de la prolifération d'où l'hypothèse généralement admise que les équivalents cellulaires des oncogènes interviennent très probablement dans le processus de prolifération des cellules normales. La découverte que l'oncogène *v-sis* était homologue à la sous-unité  $\beta$  du PDGF (platelet-derived growth factor) (figure 3A) n'a fait que renforcer cette idée (Doolittle *et al.*, 1983 ; Waterfield *et al.*, 1983).

Le gène *v-sis* est traduit sous la forme d'une protéine de 28 kd, qui est assemblée en un homodimère de 56 kd (figure 3B). Cet homodimère est clivé pour donner un homodimère de 24 kd (dont la structure est très similaire à un homodimère  $\beta$  du PDGF) puis excrété (Deuel *et al.*, 1983 ; Owen *et al.*, 1984 ; Robbins *et al.*, 1983). Une fois excrété, le produit de *v-sis* a une activité mitogène autocrine qui peut être bloquée par l'addition d'anticorps anti-PDGF (Deuel *et al.*, 1983 ; San Huang *et al.*, 1984). Seules les cellules qui expriment le récepteur du PDGF peuvent être transformées par *v-sis* (Garrett *et al.*, 1984 ; Leal *et al.*, 1985). Cependant, *v-sis* n'est pas obligé de quitter la cellule pour induire la prolifération, dans ce cas de figure le produit de *v-sis* s'associe avec son récepteur à l'intérieur même de la cellule (Betsholtz *et al.*, 1984 ; Keating *et al.*, 1988).

### b) Protéines de la famille *ras*.

3 types de gènes *ras* ont déjà été décrites : *Ha-ras* et *Ki-ras* qui ont été transduits dans des rétrovirus murins (Chien *et al.*, 1979 ; Ellis *et al.*, 1981 ; De Feo *et al.*, 1981) et *N-ras* qui a été identifié comme gène transformant dans une lignée cellulaire provenant d'un neuroblastome (Shimizu *et al.*, 1983a). Les gènes de la famille *ras* ont été trouvés activés dans 15 à 20 % des tumeurs humaines qui ont été analysées (Cooper, 1982 ; Shimizu *et al.*, 1983b ; 1983c).

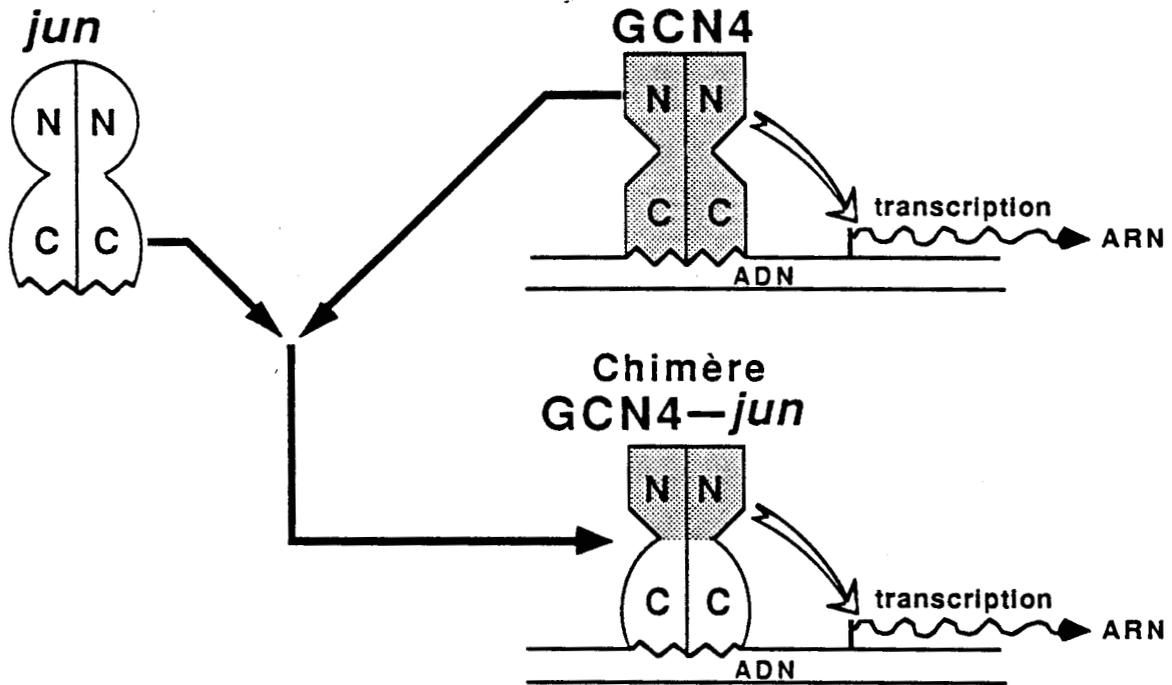


figure 4 : Substitution fonctionnelle du domaine carboxy-terminal du facteur de transcription de levure GCN4 par le domaine carboxyterminal de *v-jun*.

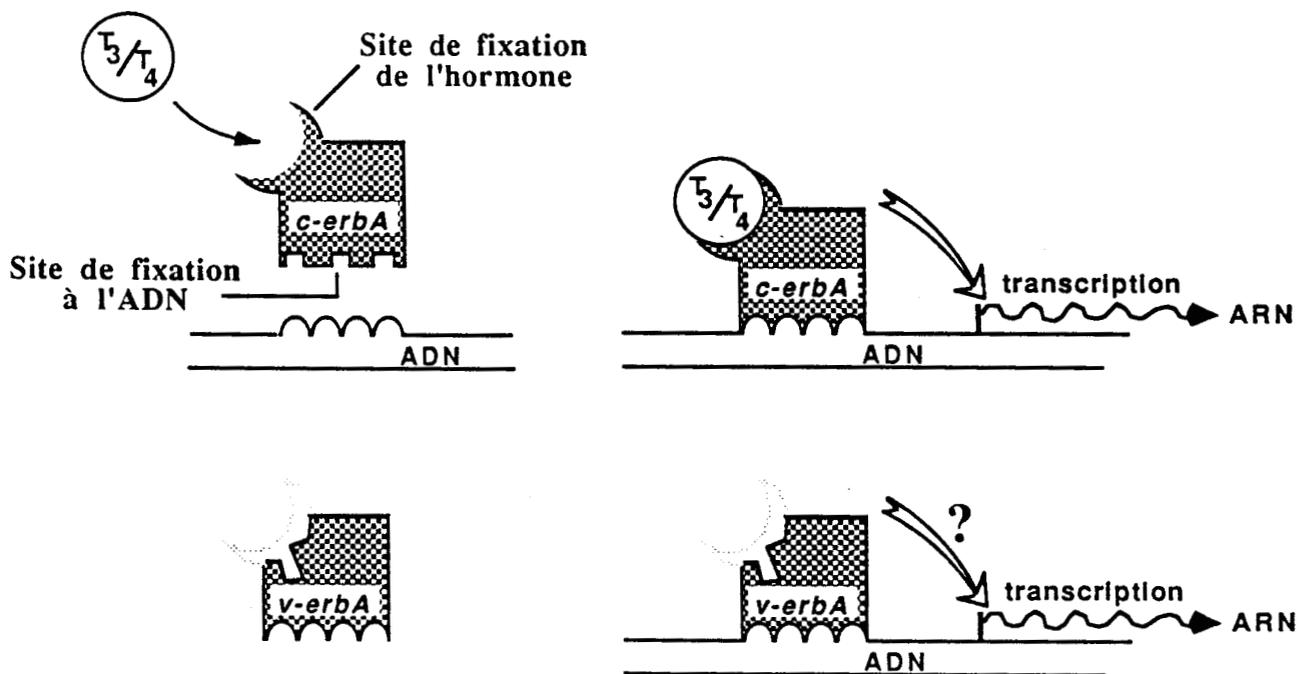


figure 5 : Modèle hypothétique du mode d'activation de *v-erbA*.

Le produit de traduction des gènes *ras* viraux ou cellulaires sont des protéines situées sur la face interne de la membrane cytoplasmique de la cellule. Cette localisation subcellulaire n'est pas neutre dans le mode de transformation par *ras*. En effet, des mutations, empêchant l'attachement à la membrane d'une p21<sup>ras</sup> activée, suppriment ses propriétés transformantes (Willingham *et al.*, 1980 ; Willumsen *et al.*, 1984a ; 1984b).

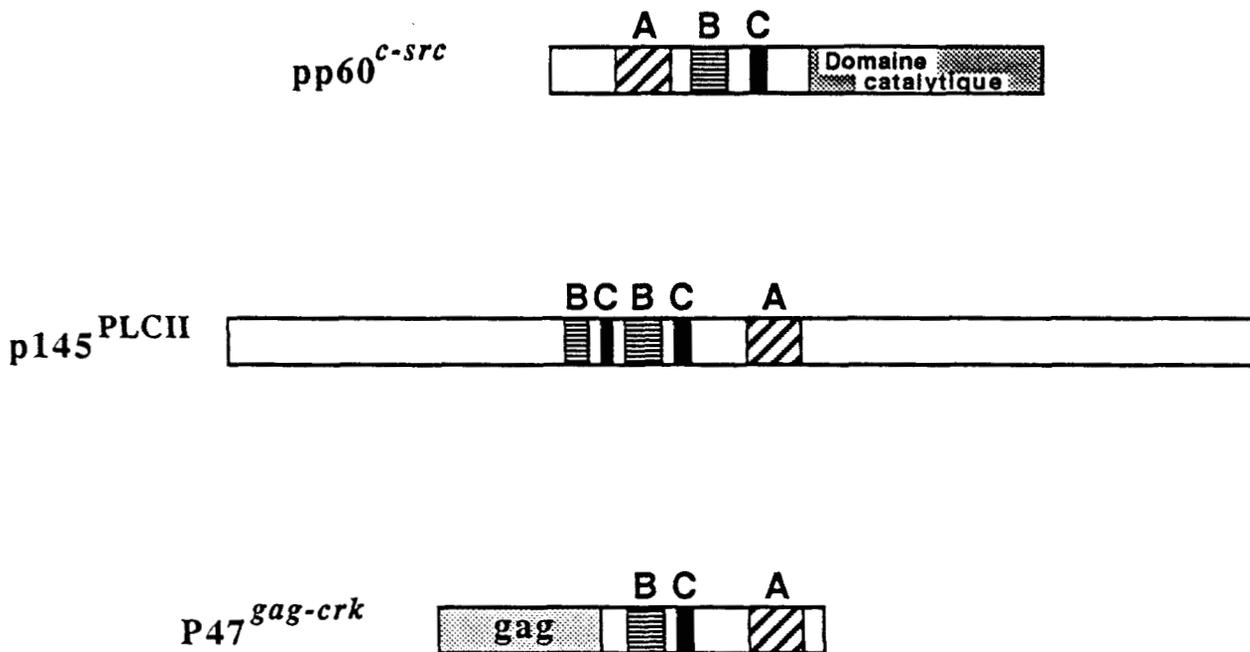
Les propriétés biochimiques des protéines *ras* cellulaires ressemblent à celles des protéines G qui interviennent dans la modulation de la transduction des signaux extracellulaires à travers la membrane cytoplasmique (Gilman, 1984). La séquence peptidique de *c-ras* présente des homologies avec la sous-unité  $\alpha$  des protéines G telles que Gs (protéine qui active l'adénylate cyclase en réponse à des stimuli de type  $\beta$  adrénrgiques), Gi (protéine qui inhibe l'adénylate cyclase et peut-être active la phospholipase C, Barbacid *et al.*, 1987), Go (dont on ne connaît pas la fonction) et la transducine (une protéine qui régule l'activité cGMP phosphodiesterase : Itoh *et al.*, 1986).

### c) Protéines Nucléaires.

Dans l'état actuel de nos connaissances on se trouve parfois devant l'impossibilité d'attribuer une fonction à certaines protéines oncogènes. La localisation cellulaire peut alors apporter des indices sur leur rôle dans la cellule. Les oncogènes qui codent pour des protéines qui migrent dans le noyau ont été rapidement étudiés pour leur rôle éventuel en tant que trans-activateurs et régulateurs de la synthèse d'ADN ou d'ARN (Kingston *et al.*, 1985). Bien que quelques oncogènes dont les produits de traduction sont nucléaires (*fos* : Curran *et al.*, 1984 ; *myb* : Klempnauer *et al.*, 1984 ; *myc* : Alitalo *et al.*, 1983a ; Donner *et al.*, 1982 ; Hann *et al.*, 1983 ; *ets* : Boulukos *et al.*, 1988 et *ski* : Stavnezer communication personnelle) aient été isolés et caractérisés, les mécanismes biochimiques par lesquels le produit de ces gènes fonctionne pour réguler l'expression génique ne sont pas encore bien compris, sauf...

... pour 2 oncogènes, *jun* et *erbA*, pour lesquels on a récemment trouvé des fonctions (*jun* : Bohmann *et al.*, 1987 ; *erbA* : Sap *et al.*, 1986 ; Weinberger *et al.*, 1987).

Au niveau de sa séquence polypeptidique, le produit de traduction de *v-jun* présente une similitude avec un facteur de transcription de la levure, GCN4, qui régule l'expression de gènes impliqués dans la biosynthèse des acides aminés (Hope et Struhl, 1985 ; Arndt et Fink, 1987). La région conservée est restreinte au domaine carboxyterminal de *v-jun* qui présente 44% d'homologie avec le domaine de GCN4 responsable de la liaison à l'ADN ("DNA binding"). Le domaine "DNA binding" de ces deux protéines est non seulement structurellement mais également fonctionnellement similaire (Struhl, 1987). Une protéine chimérique constituée du domaine aminoterminal de GCN4 et du domaine carboxyterminal de *v-jun* stimule en effet la transcription de



**figure 6** : Domaines d'homologies entre la P47<sup>gag-crk</sup>, la p145<sup>PLCII</sup> et le domaine non catalytique des protéine-tyrosine-kinases qui ne sont pas des récepteurs de facteurs de croissance (ex. pp60<sup>c-src</sup>).

la même manière que la protéine GCN4 (figure 4).

Le produit de traduction du proto-oncogène humain *c-JUN* code pour une protéine qui se lie à l'ADN et qui possède des propriétés structurales et fonctionnelles comparables à celles de AP1 (Bohmann *et al.*, 1987), une protéine qui a été récemment purifiée à la fois dans les groupes de Michael Karin (Angel *et al.*, 1987) et de Robert Tijian (Lee *et al.*, 1987). AP1 est un facteur de transcription qui se lie spécifiquement à des séquences du contrôle en *cis* de SV40 et du gène humain de la métallothionine IIA. La stimulation de la transcription par AP1 peut être augmentée d'environ 4 fois après traitement par un ester de phorbol. Etant donné que les esters de phorbol sont des promoteurs tumoraux, il était tentant de penser que *v-jun* se comporte comme une version de AP1 activée en permanence.

L'équivalent cellulaire de l'oncogène cellulaire *erbA* a été aussi récemment isolé. La localisation de la protéine *c-erbA* mais surtout sa capacité à fixer l'hormone T3/T4 suggèrent qu'il s'agit d'un récepteur des hormones thyroïdiennes, une protéine nucléaire qui se lie à l'ADN et qui active la transcription (figure 5). Bien que le produit de traduction de l'oncogène *v-erbA* ne soit pas capable de se lier à l'hormone (le site de fixation de l'hormone est absent de la protéine oncogène : figure 5), il est toujours localisé dans le noyau. Les différences qui existent entre *v-erbA* et *c-erbA* (absence du site de fixation de l'hormone et mutations ponctuelles) pourraient rendre compte de modifications structurales qui activeraient de manière constitutive la protéine virale, comme cela a déjà été montré pour le récepteur des glucocorticoïdes (Hollenberg *et al.*, 1985 ; Weinberger *et al.*, 1985), et dont les conséquences se traduiraient au niveau d'un dérèglement du contrôle de la division cellulaire.

#### d) Protéines homologues à la phospholipase C

Un nouvel oncogène, *v-crck*, n'appartenant à aucune des classes que nous venons de décrire vient d'être isolé au sein d'un virus transformant et tumorigène de poulet : CT10 (Mayer *et al.*, 1988). Son produit de traduction est une protéine de fusion *gag-crck* de 47 kd. Etant donné que les codons d'initiation et de fin de synthèse peptidique sont fournis par les gènes viraux, il est probable que *v-crck* représente une version amputée au moins des séquences aminotermiales et carboxyterminales de son équivalent cellulaire : *c-crck*.

La comparaison des séquences peptidiques de *v-crck* (Mayer *et al.*, 1988) et de la phospholipase CII (PLCII : Stahl *et al.*, 1988) révèle de fortes similitudes entre les deux protéines. Ces régions d'homologies sont concentrées dans 3 blocs peptidiques nommés A, B et C (figure 6). Très curieusement des régions similaires sont retrouvées, mais dans un ordre différent, dans le domaine non catalytique des protéine-tyrosine-kinases non homologues à des récepteurs de facteur

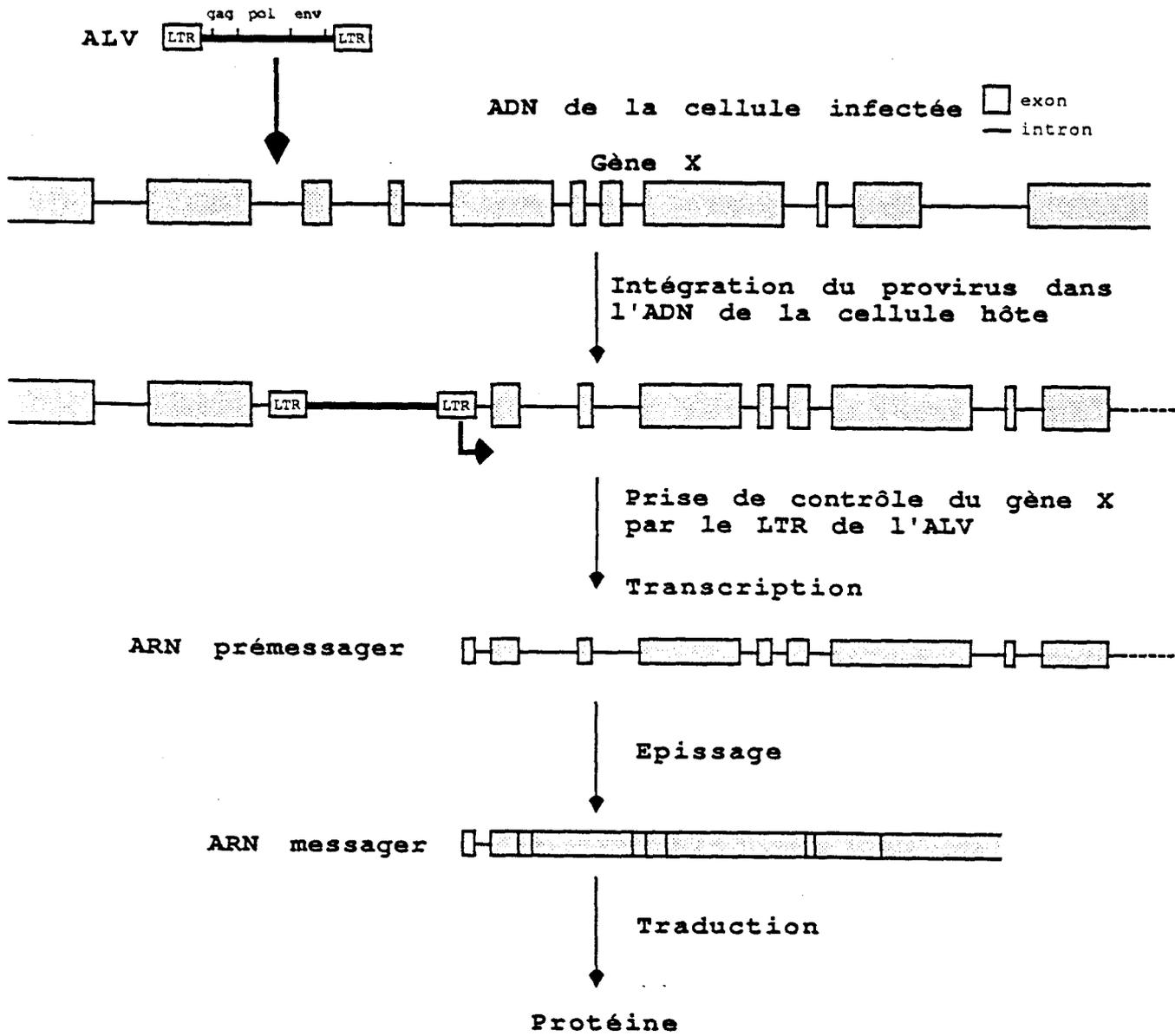


figure 7 : Mécanisme de la "LTR activation"

de croissance (figure 6). Les phospholipases sont des enzymes qui dégradent des phospholipides, par exemple le phosphatidyl inositol biphosphate (PIP2) en diacylglycérol (DAG) et en inositol triphosphate (IP3). Le DAG et l'IP3 font partie des molécules qu'on appelle les "seconds messagers" et qui sont des intermédiaires dans des cascades d'événements en réponse à des stimuli externes. Ce sont, entre autres, des activateurs de protéine-kinases (voir figure 19 pour plus d'informations).

Bien que *p47gag-crk* ne possède aucune similitude avec le domaine catalytique de protéine-kinases connues, elle peut apparemment moduler l'activité de protéine-kinases cellulaires et induire la phosphorylation de diverses protéines sur des résidus tyrosines *in vivo* et *in vitro* (Mayer *et al.*, 1988), ceci explique le choix de son nom : *crk*, CT10 regulator of kinase.

Une des premières hypothèses envisagées est que la protéine *crk* correspond à une version tronquée d'une phospholipase dépourvue de son domaine régulateur. Comme le domaine régulateur des phospholipases n'est toujours pas identifié, on ne peut pas encore exclure ce modèle. Cependant, une autre hypothèse beaucoup plus intéressante, si elle se révèle exacte, vient de l'observation que la séquence peptidique de *crk* présente des homologues avec le domaine régulateur des protéine-tyrosine-kinases. En effet, on peut imaginer que *p47gag-crk* détourne en quelque sorte des inhibiteurs de protéine-kinases en les fixant précisément sur les régions peptidiques communes avec celles du domaine régulateur des protéine-tyrosine-kinases. Ce détournement serait le résultat d'une simple compétition due à la quantité de protéine *crk* présente dans la cellule. De plus, ceci expliquerait par la même occasion pourquoi on observe une augmentation de la phosphorylation sur des résidus tyrosines dans les cellules transformées par *v-crk*. Dans ce modèle, le produit de l'oncogène *v-crk* détournerait la régulation négative de l'activité des protéine-tyrosine-kinases.

L'étude des oncogènes viraux a permis d'entrevoir quelques mécanismes possibles de transformation maligne (phosphorylation, initiation de la synthèse d'ADN, régulation de la transcription,...). Il était alors tentant d'aller voir dans des cancers humains non viro-induits si des proto-oncogènes n'avaient pas subi des modifications (activations) qui auraient pu leur conférer des propriétés transformantes comparables à celles des oncogènes viraux (*v-oncs*).

### 3) MODES D'ACTIVATION DES PROTO-ONCOGENES.

#### a) Insertion rétrovirale.

Les ALV sont des rétrovirus qui ne contiennent pas d'oncogènes pourtant il arrive qu'ils induisent des tumeurs : le mécanisme proposé dans ce cas est l'insertion d'un provirus à proximité

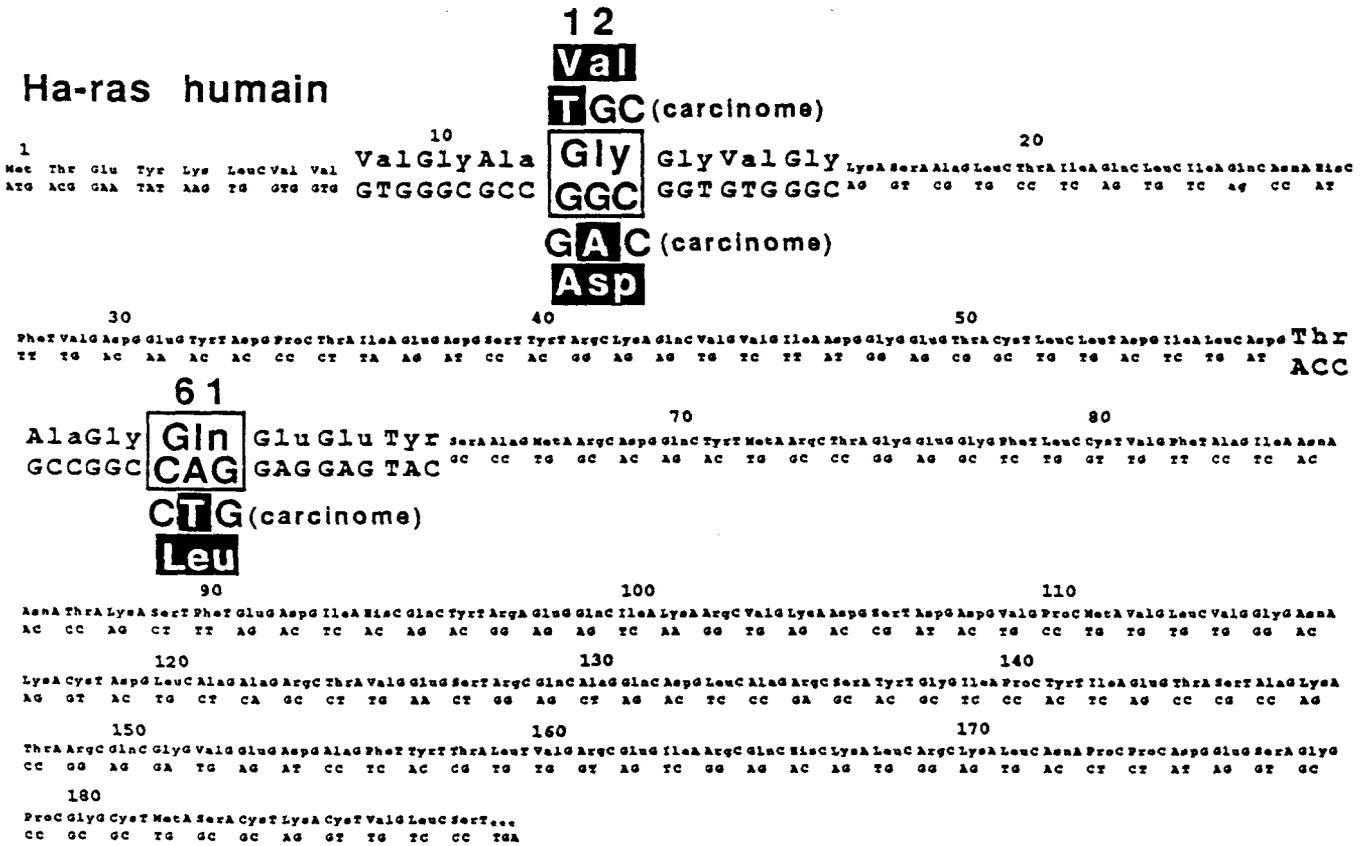


figure 8 : Activation d'un proto-oncogène par mutation ponctuelle

d'un proto-oncogène. On observe généralement une augmentation de la transcription du gène qui est passé sous le contrôle des séquences promotrices et activatrices contenues dans les LTR (promoteur puissant de transcription des rétrovirus) de l'ALV: c'est une LTR activation (figure 7).

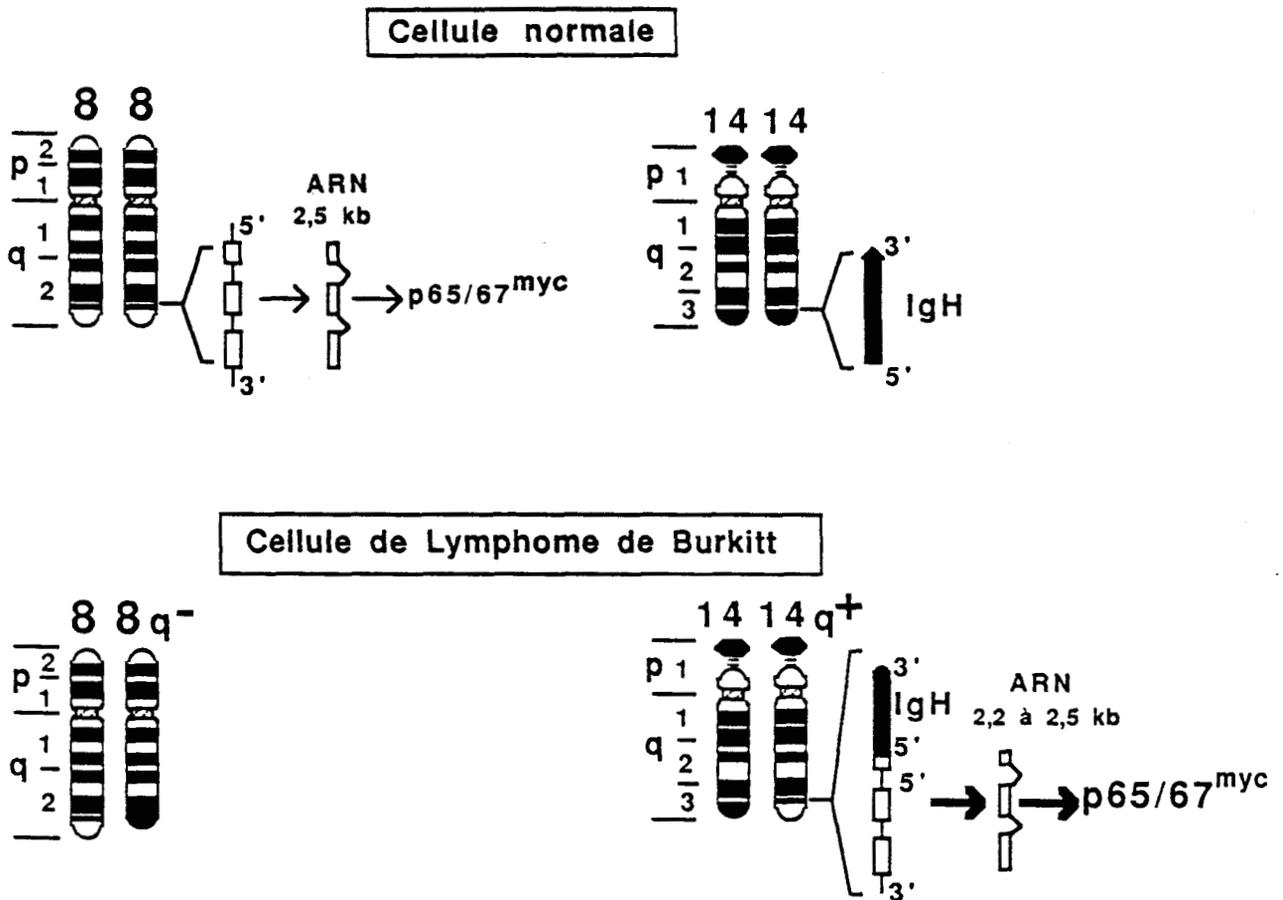
Six proto-oncogènes, que l'on connaissait déjà en tant que *v-onc*, ont ainsi été retrouvés (*c-erbB*, *c-mos*, *c-myb*, *c-myc*, *c-Ha-ras*, *c-fms*; Payne *et al.*, 1982; Shen Ong *et al.*, 1986; Westaway *et al.*, 1986; Gisselbrecht *et al.*, 1987). Deux gènes codant pour des facteurs de croissance (IL1; IL2) ont été trouvés activés et surproduits de cette façon avec pour conséquence une indépendance des cellules vis à vis d'addition exogène de ces facteurs (Chen *et al.*, 1985; Ymer *et al.*, 1985).

Un grand nombre de pathologies induites par ce processus de LTR activation est maintenant connu. On peut parfois associer une pathologie bien typée avec l'activation d'un proto-oncogène défini. Les cas les plus documentés à ce sujet sont des érythroblastoses et des lymphomes développés chez une race de poulets prédisposés à développer ce type de tumeurs. Selon les expériences, 45 à 90% des poulets développant des érythroblastoses possèdent dans leur génome une version activée du proto-oncogène *c-erbB* (Raines *et al.*, 1985) tandis qu'il s'agit d'une version activée de *c-myc* dans 85% des cas de poulets développant des lymphomes viro-induits (Hayward *et al.*, 1981).

Il existe également des zones d'intégration particulièrement "efficaces" pour le virus MMTV (Mouse Mammary Tumour Virus) qui induit des carcinomes chez la souris. Curieusement ces sites sont différents d'une espèce de souris à l'autre, il s'agit de *int 1* (souris C3H) et *int 2* (souris BR6) qui sont désormais considérés comme des proto-oncogènes (Garcia *et al.*, 1986; Peters *et al.*, 1986). On sait maintenant que *int1* est similaire à un gène de drosophile, *wingless* (Rijsewijk *et al.*, 1987), important dans le développement embryonnaire de la drosophile (Cabrera *et al.*, 1987). *int2* code, quant à lui, pour une protéine présentant des similitudes avec les FGFs (Fibroblast Growth Factors) (Smith *et al.*, 1988).

### b) Mutations ponctuelles

Un des modes d'activation d'un gène *ras* normal est le résultat de modifications ponctuelles changeant un AA en position 12, 13, 59 ou 61. La forme activée du gène *ras* la plus fréquente est une modification ponctuelle substituant la glycine en position 12 pour une alanine ou un acide aspartique (Reddy *et al.*, 1982; Tabin *et al.*, 1982; Taparowsky *et al.*, 1982) (figure 8). Des expériences de mutation dirigée ont montré que n'importe quel AA substituant la glycine en position 12 (à l'exception de la proline) est capable d'activer le gène (Mac Grath *et al.*, 1984; Seeburg *et al.*, 1984). Cette glycine fait partie de la séquence consensus [Gly X Gly X X Gly] caractéristique des protéines qui possèdent un site de fixation de nucléotide (Gay et Walker, 1983; Wierenga et Hol, 1983). De fait, les protéines *ras* normales lient le GTP et le GDP et possèdent une



(Remarque: dans les Burkitt variants  $t(2 ; 8)$  et  $t(8 ; 22)$ , *myc* est également transloqué en 5' des gènes d'immunoglobulines, chaînes légères  $\lambda$  et  $\kappa$  respectivement.)

**figure 9 : Translocations Chromosomiques.**

**Ex : translocation (8;14) dans un lymphome de Burkitt.**

activité GTPasique *in vitro* (Gibbs *et al.*, 1984 ; Mc Grath *et al.*, 1984 ; Sweet *et al.*, 1984) alors que les protéines *ras* activées ont en général une activité GTPasique très réduite.

### c) Translocations Chromosomiques.

Les translocations, qui avaient été considérées comme des événements génétiques mineurs à une époque, ont connu un regain d'intérêt lorsqu'on s'est aperçu que les cassures, spécifiquement associées à certaines tumeurs, se produisaient quelquefois à proximité du locus d'un proto-oncogène. Par extrapolation, l'ADN au voisinage des points de cassure est devenu susceptible de recéler de nouveaux gènes postulant au titre de proto-oncogène. Les conséquences des translocations peuvent être une modification de l'expression du proto-oncogène ou une altération de sa fonction biochimique ou les deux à la fois.

#### Modification de l'expression.

Les exemples les plus célèbres sont les translocations qui amènent le gène *c-myc* au voisinage des gènes d'immunoglobulines dans les lymphomes de Burkitt (Klein, 1983) ou dans des plasmocytomes (Shen-Ong *et al.*, 1982). Ces assemblages (*myc/Ig*) ont pour conséquence une dérégulation de la transcription du gène *myc* (figure 9). Pour expliquer ce phénomène plusieurs hypothèses, non généralisables, ont été avancées :

- ayant été séparé de ses séquences régulatrices par translocation, le gène *c-myc* peut être transcrit à une période inappropriée au cours du cycle cellulaire.
- les séquences régulatrices des *Ig* peuvent prendre le contrôle de l'expression de *c-myc*.
- les altérations subies par le gène au cours de la translocation peuvent augmenter la stabilité de l'ARN.
- la perte du 1<sup>er</sup> exon du gène *c-myc*, qui est un événement fréquent dans ce type de cancer, peut augmenter le taux de traduction.

Au cours des translocations *c-myc* a subi quelques mutations ponctuelles dont l'importance n'est pas connue (Rabbits *et al.*, 1983 ; Taub *et al.*, 1984).

Pour montrer que la perte du contrôle de l'expression de *c-myc* dans des lymphocytes pouvait être un événement causal dans le développement des lymphomes, une expérience de reconstitution de translocation a été réalisée (Adams *et al.*, 1985). Le gène *c-myc* complet ou tronqué a été mis sous contrôle de promoteurs d'*Ig* (ces promoteurs ont été choisis dans le but de faire s'exprimer *c-myc* spécifiquement dans les lymphocytes). Ensuite, des souris transgéniques ont été obtenues avec ces constructions. Après la naissance, un grand nombre de souris développèrent des lymphomes faisant ainsi peser plus que des présomptions sur l'implication de *c-myc* dans le développement de ces tumeurs.

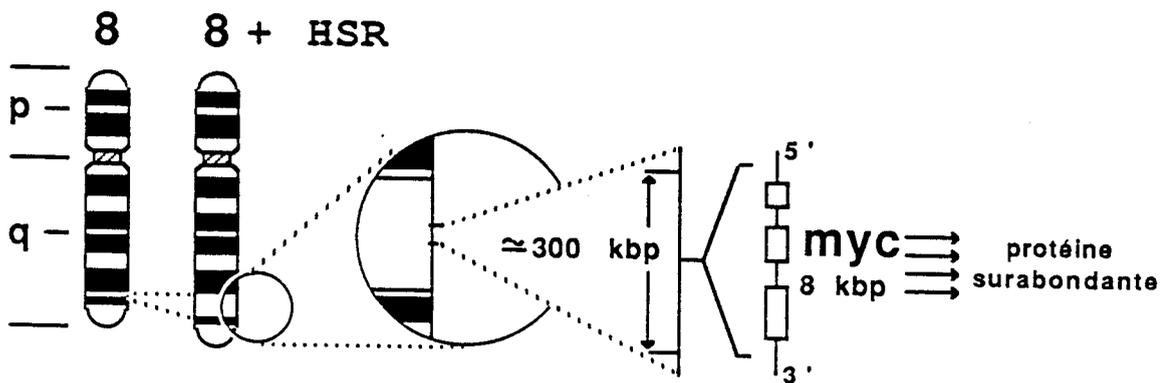


figure 10 : Amplification d'un proto-oncogène.

### Altération de la fonction.

Le chromosome Philadelphie, qui est caractéristique des leucémies myéloïdes chroniques, concrétise parfaitement ce type d'altération (Nowell et Hungerford, 1960). Par échange entre les chromosomes 9 et 22, le domaine catalytique (domaine kinase) du proto-oncogène *c-abl* a été tronqué puis accolé au gène *bcr* (break point cluster region) (Shtivelman *et al.*, 1985 ; Bartram *et al.*, 1983 ; Groffen *et al.*, 1984 ; Grosfeld *et al.*, 1986). Ce réarrangement est à l'origine de l'expression d'une protéine chimérique (*bcr-abl*) possédant une activité kinase très supérieure à celle du produit de traduction de *c-abl* (Konopka *et al.*, 1984 ; 1985 ; Ben Neriah *et al.*, 1986b).

### d) Amplification Génique.

Des amplifications géniques ont été décrites chez certaines espèces en tant que processus normal intervenant dans les étapes du développement embryonnaire (drosophile : Spradling et Mahowald, 1980) et aussi en tant que mutation accidentelle conférant un avantage sélectif (par exemple chez les insectes, un gène codant pour des enzymes dégradant certains pesticides ; Mouchès *et al.*, 1986).

Chez les mammifères, on a constaté que des amplifications géniques de nombreux proto-oncogènes étaient associées avec des développements malins (figure 10) : par exemple, *c-myc* dans des leucémies promyélocytiques humaines (Collins et Groudine, 1982 ; Dalla Favera *et al.*, 1982) et dans des carcinomes du colon (Alitalo *et al.*, 1983b).

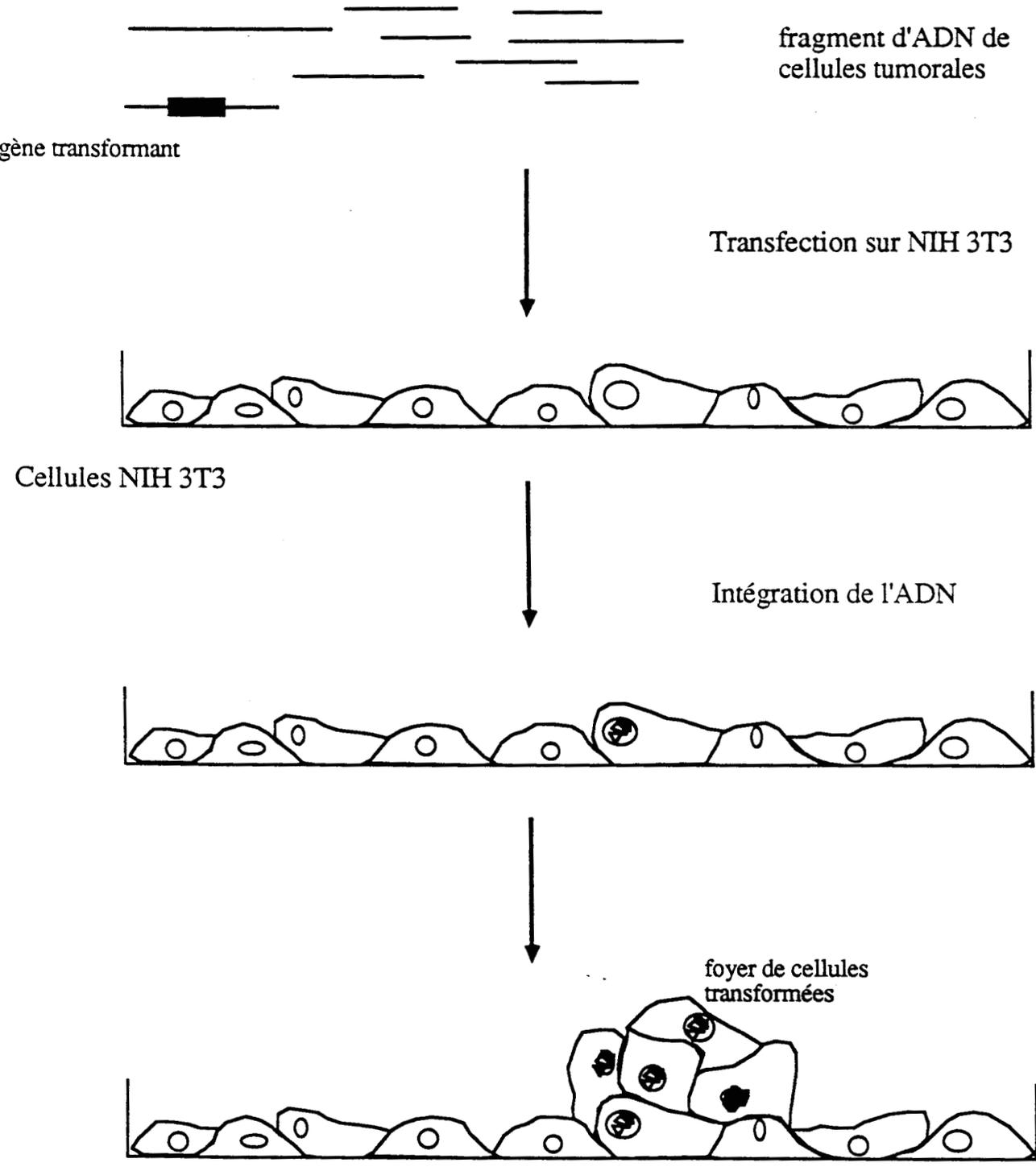
Au niveau du caryotype, l'amplification génique se manifeste sous deux formes :

- DM chromosomes (double minute chromosomes) : petits chromosomes acentriques et autonomes contenant les séquences amplifiées.

- HSR (homogeneously staining regions) : bandes, révélées sur des chromosomes, qui apparaissent beaucoup plus larges que la normale après coloration, localisant ainsi la zone amplifiée.

(Pour revue voir Schimke, 1984).

Nous avons vu qu'il y avait plusieurs façons de repérer les gènes dont les altérations sont probablement impliquées dans le développement de cancer. L'approche la plus utilisée est l'étude des rétrovirus oncogènes qui sont allés "pêcher" dans le génome de la cellule des proto-oncogènes et les ont transduits dans leur génome sous une forme activée. Deux autres techniques ont également contribué à la découverte de nouveaux oncogènes : ce sont les recherches de translocations et d'amplifications (détectées par étude caryotypiques). Cependant, il est possible que des proto-oncogènes activés aient échappé à la capture par des rétrovirus (ou que les rétrovirus qui les ont transduits n'aient pas encore été isolés ou étudiés) ou encore qu'ils ne puissent pas être mis en



**figure 11 : Principe du test NIH 3T3.**

évidence par les techniques dont nous venons de parler, c'est pourquoi de nouvelles méthodes ont été élaborées pour rechercher de nouveaux oncogènes.

#### 4) COMMENT TROUVER DE NOUVEAUX ONCOGENES ?

##### a) Test NIH 3T3.

L'hypothèse de départ est que l'ADN des cellules tumorales contient des gènes transformants. L'idée est de transférer l'ADN tumoral total sur des cellules : les plus utilisées étant les NIH 3T3. Une fois intégré, "le gène actif" devrait trahir sa présence par son aptitude à transformer les NIH 3T3 (figure 11).

Parmi les oncogènes isolés de cette façon on retrouve des gènes qui avaient déjà été isolés en tant que *v-onc* dans des rétrovirus. Entre autre, les gènes de la famille *ras*, que l'on retrouve souvent activés sur les AA 12 ou 61, ce qui les rend particulièrement réactifs dans le test NIH 3T3.

Le test NIH 3T3 a été beaucoup critiqué dans le sens où les cellules ne sont pas "normales". De plus, on a trouvé des gènes qui ont été activés au cours de la transfection (ex : *mas* ; D. Young *et al.*, 1986). Mises à part ces deux restrictions, le test NIH 3T3 reste, pour la détection de proto-oncogènes activés, un bon outil dont le principe a d'ailleurs été étendu à d'autres types cellulaires (Garcia *et al.*, 1986a).

##### b) Transfection d'ADN de LTR.

Tout au long du paragraphe précédent ("Modes d'activation des proto-oncogènes") nous avons décrit divers modes d'activation de proto-oncogènes. L'un d'entre eux, la LTR activation, a inspiré des chercheurs qui ont voulu forcer le destin en cotransfectant, sur des cellules NIH 3T3, l'ADN de cellules NIH 3T3 normales avec l'ADN de LTR de virus murins dans l'espoir que ces derniers (les LTR) s'intégreront près d'un oncogène encore inconnu (Müller et Müller, 1984). Théoriquement, une telle approche peut conduire à la transformation de plusieurs manières possibles :

- LTR activation d'un gène voisinant le site d'intégration du LTR.
- activation de séquences provenant de l'ADN transfecté par juxtaposition avec l'ADN d'un LTR murin.
- synthèse, à partir de l'ADN cotransfecté, de protéines "aberrantes", ou bien tronquées, ou bien réarrangées (exemple : protéines de fusion), ou encore mutées.

Quatre gènes, capables de transformer les NIH 3T3 et attachés à un LTR ont ainsi été trouvés (Müller et Müller, 1984). Parmi ceux-ci se trouvent trois nouveaux proto-oncogènes (ne



correspondant à aucun oncogène connu) dont la caractérisation est en cours. Le quatrième proto-oncogène correspond à une LTR activation de *c-raf* qui est un gène connu pour avoir été transduit dans un rétrovirus murin.

### c) Utilisation de sondes oligonucléotidiques.

La plupart des oncogènes sont classés au regard de leur fonction et présentent fréquemment des homologies. Souvent, de courtes séquences à l'intérieur même d'un des domaines, domaine catalytique par exemple (voir le chapitre sur les kinases), sont plus conservées que d'autres et peuvent être utilisées pour préparer des sondes oligonucléotidiques de synthèse qui serviront ensuite à cribler des banques d'ADNc. Cette technique a été pratiquée avec succès pour ajouter de nouveaux membres aux groupes des gènes *ras* (Chardin *et al.*, 1986) et des protéine-sérine-kinases (Hanks, 1987).

De façon très résumée nous avons vu que les proto-oncogènes peuvent agir essentiellement par 4 mécanismes biochimiques : la phosphorylation sur des résidus tyrosine ou sérine ou thréonine (cf II<sup>o</sup> partie: Protéine-Kinases), la régulation métabolique par des protéines qui lient le GTP à la manière des protéines G, le contrôle de l'expression génique (contrôle de la transcription) et la participation dans la réplication de l'ADN.

Nous avons également disserté sur le fait que les proto-oncogènes sont susceptibles de devenir des oncogènes à la suite d'événements génétiques tels que les translocations (activation constitutive d'un proto-oncogène, *c-myc* ; altération de la fonction biochimique, *c-abl*), les amplifications géniques (*c-myc*) ou les mutations somatiques (*c-ras*).

La cancérogénèse est décrite comme un processus multi-étape comprenant schématiquement initiation, promotion et progression/développement de cancer (Cairns et Logan, 1983) (figure 12). Il existe des indications pour dire que la transformation par un oncogène viral n'est peut être pas aussi indépendante et directe qu'il n'y paraît.

## 5) ONCOGENESE : PROCESSUS MULTI-ETAPE

En 1982, Grunwald *et al.* ont rapporté la description de cellules de lymphomes transformées par *v-abl*. Après une culture prolongée *in vivo* dans des ascites de souris, ces cellules ont perdu le gène transformant *v-abl* tout en conservant le phénotype malin (transformation, tumorigénicité). Cette observation suggère que l'expression de *v-abl* a peut-être été nécessaire pour l'initiation, mais n'est pas indispensable pour le maintien de la transformation. Selon toute vraisemblance, la

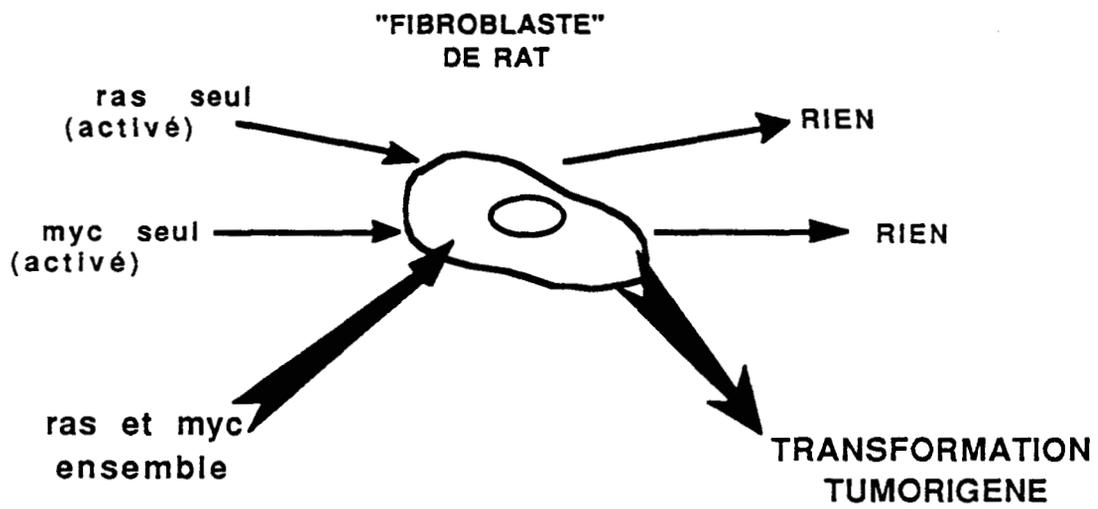


figure 13 : Coopération entre les oncogènes *ras* et *myc*.

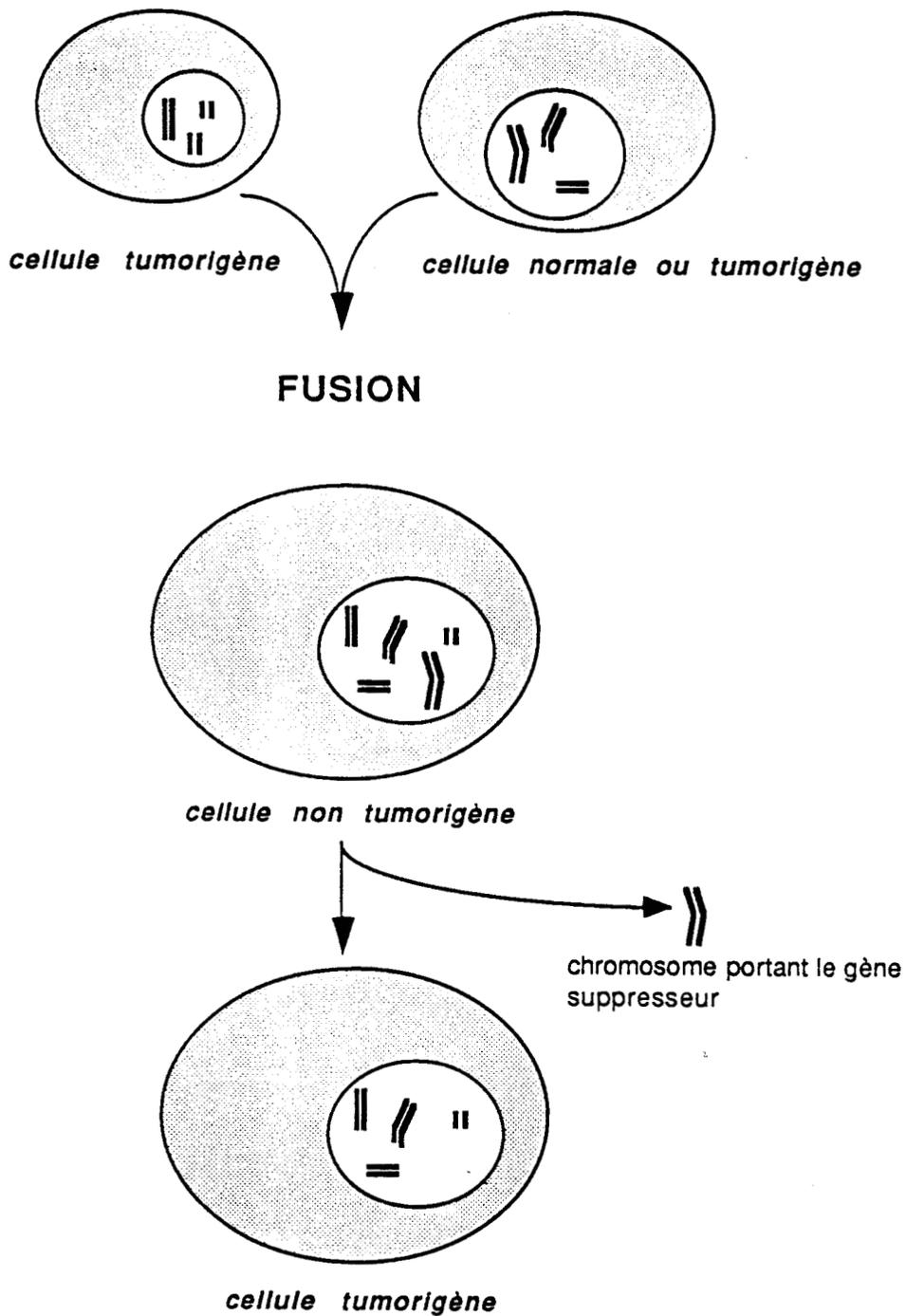
conservation du phénotype malin serait assurée par des gènes cellulaires induits par l'expression de *v-abl* au cours d'une étape d'initiation.

On ne connaît pas le gène cellulaire qui coopérerait avec le produit de *v-abl* dans l'exemple précédent, cependant on connaît un gène cellulaire dont le produit est un partenaire dans une coopération avec d'autres produits d'oncogènes : le gène qui code pour la p53, une protéine cellulaire qui est souvent trouvée de manière abondante dans les cellules transformées (Wolf *et al.*, 1984 ; Mowat *et al.*, 1985). Une démonstration de la participation de la p53 à la transformation a été faite par cotransfection d'un ADNc de la p53 avec un gène *ras* activé (*EJ-ras*) dans des fibroblastes embryonnaires de rat. Des cellules morphologiquement transformées et tumorigènes ont ainsi été obtenues. Ceci suggère une coopération entre les 2 gènes quand on sait que ni l'ADNc de p53 seul ni le gène *ras* seul ne sont capables d'induire la transformation de ces cellules (Eliyahu *et al.*, 1984 ; Parada *et al.*, 1984 ; Jenkins *et al.*, 1984).

Dans l'étude des synergies entre oncogènes, les rétrovirus aviaires ont souvent servi de modèles expérimentaux. En effet, certains d'entre eux ont transduit dans leur génome non pas un mais deux oncogènes : AEV (Avian érythroblastosis virus : *erbA* + *erbB*) ; E26 (Virus érythroblastosant : *myb* + *ets*) ; MH<sub>2</sub> (Mill Hill n°2 virus : *mil* + *myc*). Une coopération entre les 2 oncogènes d'un même rétrovirus peut se traduire *in vivo* par une augmentation de la pathogénicité (MH<sub>2</sub> qui contient les oncogènes *mil* et *myc* possède une pathogénicité plus aiguë que des rétrovirus qui ne contiennent que *myc*). C'est surtout le développement de systèmes biologiques *in vitro* qui a permis de disséquer plus finement la contribution de chaque oncogène au sein du rétrovirus. Tout ceci sera discuté plus longuement dans la III<sup>o</sup> partie qui est consacrée à l'un de ces rétrovirus "riches" : MH<sub>2</sub>.

Une coopération entre au moins deux proto-oncogènes a déjà été suggérée dans certaines tumeurs (Cooper et Neiman, 1981 ; Peters *et al.*, 1986). *In vitro*, la transfection des oncogènes *myc* ou *ras* seuls dans des fibroblastes embryonnaires de rat ne transforme pas ces cellules (figure 13) alors qu'elles deviennent transformées lorsque les deux oncogènes sont transfectés et exprimés simultanément dans les mêmes cellules (Land *et al.*, 1983a ; 1983b). Le même genre d'expérience a été réalisé avec *E1a* et *ras* (Ruley, 1983).

Finalement, il n'est pas exclu que même la tumorigénicité obtenue par coopération entre *myc* et *ras* puisse requérir des événements cellulaires en plus de l'action des oncogènes (par exemple la perte d'un chromosome spécifique comme cela a été vu dans un certain cas : Oshimura *et al.*, 1985) et qu'un même oncogène puisse jouer selon les circonstances tantôt un rôle d'initiation tantôt un rôle de promotion. C'est le cas de *c-myc* qui est considéré comme un initiateur dans certains



**figure 14** : Suppression de la tumorigénicité par formation d'hybrides somatiques et identification du chromosome porteur du gène suppresseur.

lymphomes aviaires (Hayward *et al.*, 1981) et comme un gène de progression (Little *et al.*, 1983) dans des SCLC (Small Cell Lung Carcinoma).

Les oncogènes représentent une classe de gènes dont la fonction semble jouer un rôle de régulation positive dans le développement tumoral ou plus simplement dans la transformation maligne. Cependant, depuis quelques années, une autre classe de gènes qui cette fois joueraient un rôle de régulation négative dans ces mêmes processus (développement tumoral) commence à émerger : ce sont les gènes suppresseurs (tumor suppressor genes) ou émerogènes qui sont capables d'inhiber l'expression de phénotype transformé et tumorigène.

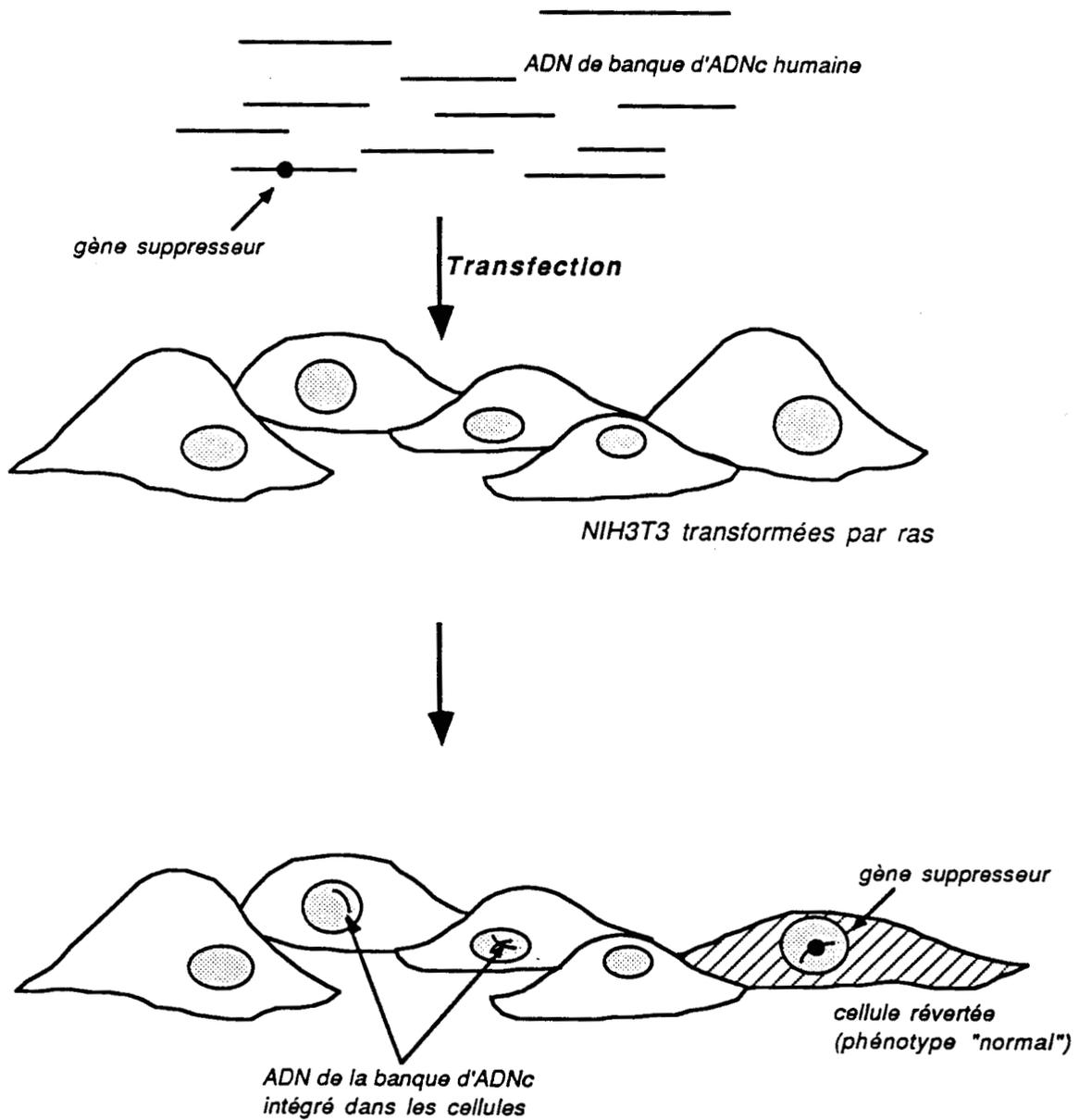
### **C-LES GENES SUPPRESSEURS : EMEROGENES.**

Le terme émerogène a été proposé par G. Todaro. La racine grecque *emero* qui signifie domestiquer, apprivoiser dévoile le rôle que l'on attribue à ces gènes qui est de maîtriser (domestiquer) l'action des (proto) oncogènes dans une cellule. Ces gènes, qu'on appelle parfois anti-oncogènes, sont capables de supprimer le phénotype transformé ou la tumorigénicité et ont sans doute des fonctions au moins aussi diverses que celles des oncogènes.

En effet, prenons l'exemple d'une production constitutive d'un facteur de croissance suite à l'expression d'un oncogène dans une cellule. Cet effet qui, selon la plus simple hypothèse, a pour but de faire proliférer la cellule, peut être bloqué par le produit de traduction d'un gène suppresseur qui inhiberait la synthèse du récepteur adéquat ou qui dérégulerait le fonctionnement de ce récepteur (altération de sa fonction par phosphorylation par exemple) ou bien encore qui agirait en modifiant les cibles du récepteur de telle façon qu'elles ne puissent plus être reconnues. Dans la suite de cet exposé, nous allons voir comment des gènes candidats à la fonction de suppression ont été mis en évidence.

#### **a) Suppression de la tumorigénicité par formation d'hybrides somatiques.**

L'idée d'utiliser cette technique pour la détection de gènes suppresseurs est basée sur le fait qu'un certain nombre de cellules transformées (chimiquement ou par des virus oncogènes) deviennent peu ou non tumorigènes après fusion avec des cellules normales (fibroblastes, lymphocytes, macrophages) (Klinger et Shows, 1983) (figure 14). Plusieurs hypothèses peuvent être émises à partir de cette observation. La première est que la transformation résulte de l'absence dans la cellule transformée d'un (ou de plusieurs) gène(s) qui serai(en)t apporté(s) par la cellule normale dans l'hybride somatique. La réapparition de la tumorigénicité à la suite de la perte d'un



**figure 15 : Recherche de gènes suppresseurs par sélection de révertants.**

chromosome apporté par la cellule normale permet dans certains cas d'identifier LE chromosome qui contient le gène "complémentaire-suppresseur". C'est ainsi qu'on a découvert que le chromosome 4 de la souris contenait un (ou des) gène(s) suppresseur(s) capable(s) de "supprimer" des cellules de carcinomes, de mélanomes ou de lymphomes originaires de différentes espèces (il faut prendre le terme "supprimer" dans le sens : suppression du phénotype transformé). Une deuxième hypothèse peut être que la transformation est le résultat d'un blocage de la maturation (différenciation). Dans ce cas, le retour au phénotype normal s'effectue grâce à la cellule normale qui impose son propre programme de différenciation à la cellule hybride.

Un exemple intéressant est celui de la fusion de deux cellules tumorigènes (HeLa et HT 1080) qui donne un hybride non tumorigène, résultat sans doute, d'une complémentarité génétique entre les cellules qui possèderaient chacune des lésions différentes dans leur génome (Weissman *et al.*, 1983).

La technique de recherche des gènes suppresseurs par hybrides somatiques est relativement lourde et commence à laisser place à une méthode plus directe qui consiste à transférer dans une cellule transformée un seul chromosome grâce à des minicellules. C'est ainsi qu'on a découvert que les cellules de tumeurs de Wilm's peuvent être supprimées par fusion avec une minicellule contenant le chromosome 11 (Weissman *et al.*, 1987).

### **b) Sélection de Révertants.**

Il s'agit cette fois, à partir de cellules transformées par un oncogène, de sélectionner des révertants c'est-à-dire des clones cellulaires phénotypiquement normaux, non tumorigènes et exprimant toujours la protéine oncogène fonctionnelle. En effet, trouver des révertants dont le produit de traduction de l'oncogène est altéré n'implique pas forcément l'expression d'un gène suppresseur.

Afin de diminuer la probabilité d'obtenir des révertants qui sont en fait des clones dans lesquels l'oncogène n'est plus actif, Noda *et al.*(1983) ont travaillé avec des NIH 3T3 qui ont intégré dans leur génome 2 gènes *ras* activés. Ils ont sélectionné des cellules ayant une apparence quasi-normale, non tumorigènes, où ils notaient cependant une augmentation du nombre de chromosomes. Une des conséquences de la transformation par *ras* est la production de manière autocrine d'un facteur de croissance : le TGF  $\alpha$  (Transforming Growth factor  $\alpha$ ). La production de TGF  $\alpha$  ainsi que l'expression de la p21<sup>ras</sup> dans les cellules dont le phénotype est réversé étant comparable à celle des cellules transformées de départ, on pourrait imaginer que la suppression résulte dans ce cas d'un problème au niveau des récepteurs de TGF  $\alpha$ .

Une approche beaucoup plus directe, proposée par Noda, consiste à transférer l'ADN d'une banque d'ADNc humaine sur des NIH 3T3 transformées par *ras* (figure 15).

L'histoire se complique lorsque l'on découvre que l'intersection entre l'ensemble des oncogènes et celui des anti-oncogènes n'est pas vide : un même gène peut agir en tant qu'oncogène ou anti-oncogène selon le système dans lequel il se trouve. Noda toujours (1985), avec son groupe, a montré en effet que si *ras* est capable de transformer des fibroblastes, il est également capable de supprimer le phénotype transformé des cellules PC 12 (cellules dérivées d'un phéochromocytome de rat)...

#### c) Court circuit (By Pass) du blocage de la différenciation (par un oncogène)

Les cellules transformées exhibent souvent des caractéristiques de cellules immatures peu ou non différenciées. En fait, elles sont souvent bloquées à un stade de maturation précoce qui leur donne un phénotype similaire à celui des cellules souches dont elles proviennent.

Des myoblastes infectés par un virus ts de RSV (Rous Sarcoma Virus) deviennent transformées et immortalisées. Lorsque ces cellules sont transférées, même pour un temps très court, à la température non permissive, des myotubes (cellules différenciées) apparaissent. A ce stade, les cellules ont été commises de façon permanente vers une différenciation terminale irréversible même si elles sont remises à température permissive (Fizmann et Fuchs, 1975).

On trouve dans la littérature d'autres exemples similaires. Ainsi, des cellules de type érythroïde, transformées par un virus thermosensible (ts) d'AEV (Avian Erythroblastosis Virus) et qui prolifèrent sous forme blastique à température permissive, commencent à exprimer à température non permissive des caractères d'érythrocytes matures (tels que l'hémoglobine) au bout de quelques jours. Elles sont alors commises dans une voie de différenciation irréversible indépendamment de la température à laquelle elles se trouvent (*ie* permissive ou non) (Weintraub *et al.*, 1981).

Certains oncogènes possèdent donc apparemment une fenêtre d'action très étroite. Lorsqu'un certain nombre de gènes de différenciation sont activés, ces derniers agissent en quelque sorte comme des gènes suppresseurs puisque, dès leur expression, l'oncogène n'est plus capable de transformer la cellule.

#### d) Description d'un candidat à la fonction de gène suppresseur : RB1.

La perte des deux allèles du même locus (RB1 sur le chromosome 13 en position 13q14) est associée à l'apparition d'un rétinoblastome. Dans des familles à risque, un enfant qui possède une délétion RB1 (sur un des allèles) est susceptible de développer un rétinoblastome, souvent au cours de la première année de sa vie. Heureusement, si le deuxième allèle n'est pas modifié avant l'âge de 5 ans, tous les rétinocytes étant différenciés, le risque de développer cette tumeur devient

statistiquement nul.

Récemment un ADNc hybridant avec la région 13q14 (Fung *et al.*, 1987) a été cloné. Il pourrait correspondre au gène dont l'absence est responsable du développement du rétinoblastome. En effet, il a été trouvé exprimé dans des cellules tumorales ne provenant pas de rétinoblastomes ainsi que dans des cellules de rétine foetale et il est absent ou alors exprimé sous une forme aberrante (tronquée), dans des cellules de rétinoblastomes ou d'ostéosarcomes (où RB1 semble également être impliquée ; Hansen *et al.*, 1985).

Il reste maintenant à démontrer que ce gène est capable de "supprimer" des rétinoblastomes ou des ostéosarcomes quand il est réintroduit dans la cellule sous une forme correcte (si le processus est réversible bien entendu).

Ces observations rejoignent l'hypothèse de Comings (1973) qui suggère que les cellules contiendraient des gènes "transformants", actifs pendant l'embryogénèse, qui seraient contrôlés au cours de la différenciation par des gènes dominants suppresseurs ou par des gènes régulateurs. Dans ce sens RB1 apparaît comme un gène dominant (puisque'un seul allèle suffit) participant à la différenciation des cellules de rétine et dont la présence est indispensable pour la suppression des gènes transformants actifs pendant le rétinogénèse.

#### e) Suppression par des produits diffusés par des cellules.

Des protéines impliquées dans la croissance cellulaire, capables d'inhiber la réplication de certaines cellules, ont été décrites dans différents systèmes expérimentaux. Une diminution de l'immunité cellulaire avait été observée par exemple chez des patients développant un glioblastome. Cette activité immunodépressive est présente dans les liquides d'ascites des sujets concernés et disparaît quand la tumeur est excisée (Roszmann et Brooks, 1980 ; Kikuchi et Neuwelt, 1983). En fait, la diminution de l'immunité est la conséquence de l'expression d'un peptide immunodépresseur produit par les cellules du glioblastome. Ce peptide a été récemment purifié et appelé G-TsF (Glioblastoma cell derived T suppressor Factor) (Wrann *et al.*, 1987). La séquence des 20 derniers acides aminés de G-TsF révèle une forte homologie avec TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ ) qui possède également selon les systèmes des propriétés anti-prolifératives (R. de Martin, 1987).

#### f) Oncosuppression par les parvovirus.

Les parvovirus figurent parmi les plus petits virus à ADN connus. Une condition obligatoire pour leur réplication virale est la prolifération cellulaire car les parvovirus sont dépendants de mécanismes cellulaires, en particulier de fonctions exprimées pendant la phase S (étape de synthèse

d'ADN au cours de la mitose). La propriété la plus intéressante et qui justifie la présence des parvovirus dans ce chapitre est leur capacité d'inhiber de façon spectaculaire la formation de tumeurs spontanées ou induites chez les rongeurs de laboratoire.

Des études épidémiologiques réalisées chez l'homme, suggèrent qu'une infection parvovirale latente pourrait être associée à une réduction de l'incidence de certains carcinomes. Bien que le mécanisme de cet oncosuppression ne soit pas connu, le fait que les parvovirus aient souvent été isolés de tumeurs a amené l'hypothèse que la transformation maligne pourrait être une condition pour rendre permissive des cellules qui étaient résistantes aux parvovirus.

Diverses expériences semblent suggérer que les parvovirus peuvent détruire préférentiellement les cellules cancéreuses. Cette hypothèse, dite d'oncolyse sélective, est compatible avec le fait que l'état de différenciation des cellules détermine leur permissivité au déroulement du cycle lytique des parvovirus. Si l'hypothèse d'oncolyse sélective est correcte, il est concevable d'imaginer que la transformation lève une (ou des) barrière(s) cellulaire(s) qui limite(nt) le développement de l'une ou l'autre étape du cycle viral et qui protège(nt) les cellules normales de l'effet lytique des parvovirus. Existerait-il dans les cellules normales des gènes suppresseurs vis à vis de l'expression des parvovirus ?...

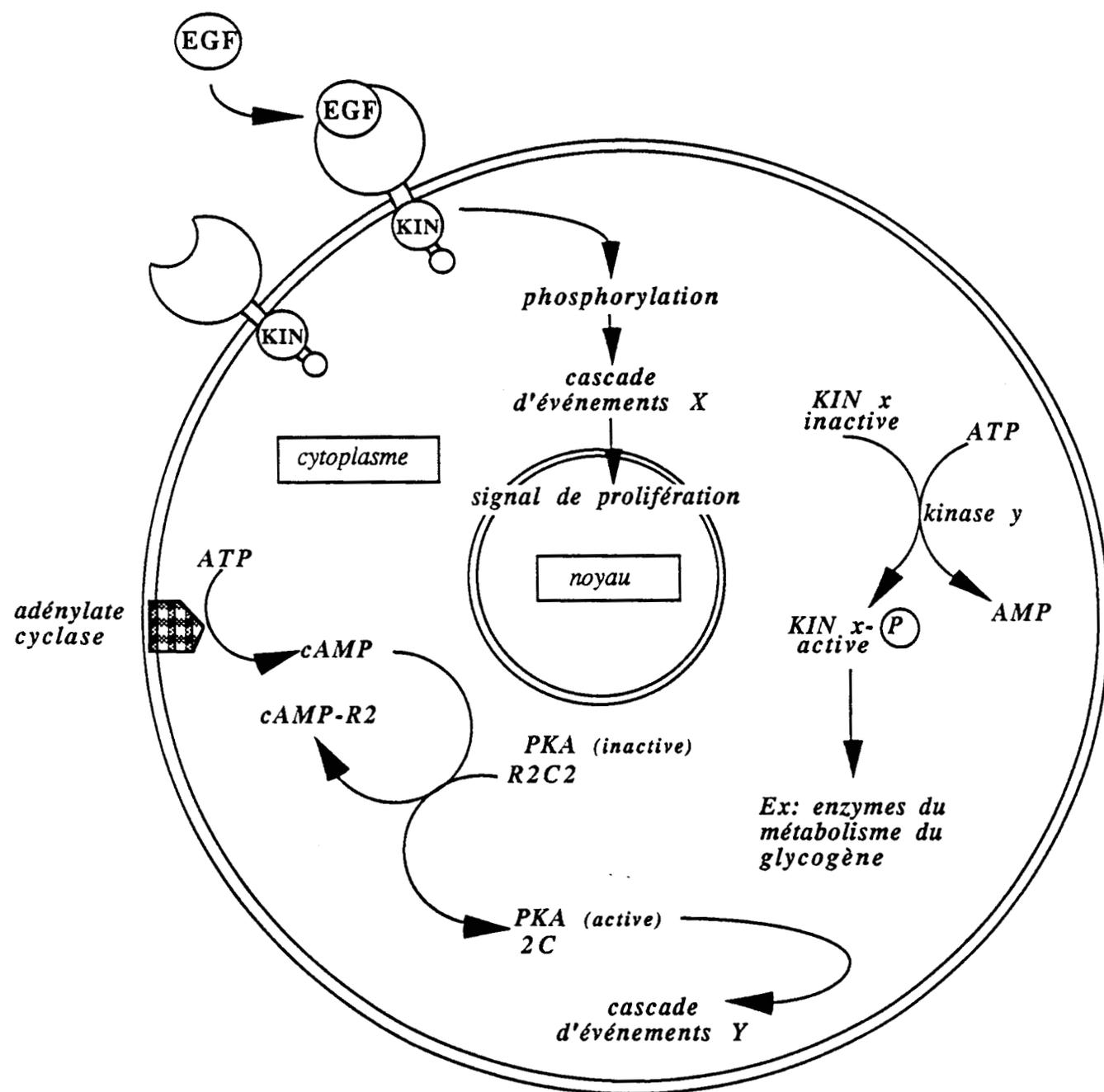


figure 16 : Importance de la phosphorylation dans les métabolismes cellulaires.

# PROTEINE-KINASES

## A - INTRODUCTION

Par définition les protéine-kinases (PK) sont des enzymes capables de transférer le phosphate  $\gamma$  d'un ATP (ou d'un GTP) sur un (ou des) substrat(s) polypeptidique(s). Les premières kinases qui ont été purifiées furent la phosphorylase kinase, un enzyme du métabolisme du glycogène, (Krebs *et al.*, 1959) et la protéine-kinase dépendante d'AMPc (PKA : Walsh *et al.*, 1968). Ce sont toutes deux des PK spécifiques de résidus sérine et il fallut attendre 1979 pour que la première kinase spécifique de résidus tyrosine (pp60<sup>v-src</sup>) soit isolée (Erikson *et al.*, 1979). Depuis, grâce à l'étude des rétrovirus et à l'amélioration des techniques de biologie moléculaire, nous assistons à une expansion rapide du groupe des protéine-kinases.

La phosphorylation de protéines (ou de substrats divers) par des kinases est un mécanisme biochimique très utilisé dans les régulations des métabolismes cellulaires. Cependant, pour qu'il puisse y avoir régulation il faut que la réaction soit réversible. Aussi, dans les chaînes métaboliques, les réactions contrôlées par des kinases (phosphorylation) sont également contrôlées par des phosphatases (déphosphorylation). Les facteurs capables d'activer une protéine-kinase peuvent avoir des localisations et des fonctions très diverses. Le facteur peut être un ligand qui se fixe sur son récepteur, c'est le cas par exemple de l'EGF (Epidermal Growth Factor) qui, lorsqu'il se fixe sur son récepteur (une protéine transmembranaire), stimule l'activité kinase de ce dernier et la prolifération cellulaire. Le facteur peut être lui même une kinase qui phosphoryle, pour l'activer, une autre kinase ou bien encore un régulateur de l'adénylate cyclase (figure 16).

La structure, les spécificités de substrats et la localisation cellulaire des protéine-kinases isolées et caractérisées sont hétérogènes. Cependant, la plupart de ces enzymes présentent une certaine homogénéité (des similitudes de séquences peptidiques) au niveau de ce qu'on a appelé le domaine catalytique, c'est à dire la région incluant le site actif de ces enzymes.

## B - CARACTERISATION DU DOMAINE CATALYTIQUE

Les premières recherches sur les sites potentiels de fixation d'ATP ont été faites sur la protéine-kinase dépendante d'AMPc (PKA). La PKA est composée de deux sous-unités régulatrices (R) et de deux sous-unités catalytiques (C) assemblées en tétramère lorsque l'enzyme est inactif. L'AMPc joue un rôle d'effecteur sur la PKA en provoquant une libération des sous-unités catalytiques selon le schéma suivant :





La sous-unité catalytique est capable de fixer de l'ATP (donneur de phosphate) et du magnésium (Mg : sans doute en tant que cofacteur). L'enzyme peut être inactivé par un analogue de l'ATP, le FSBA (p-fluorosulfonylbenzoyl-5'-adénosine), dont la structure est similaire à l'ATP à l'exception des trois phosphates qui sont remplacés par une chaîne de taille semblable contenant à la place du phosphate  $\gamma$  un groupement fluorosulfonyl. Ce groupement est réactif et peut se fixer de manière covalente sur une protéine : dans le cas de la PKA, il s'attache spécifiquement sur la lysine en position 71 de la sous-unité catalytique, ce qui a pour conséquence de bloquer l'activité enzymatique de la protéine. Cette expérience indique que la Lysine 71 de la sous-unité catalytique de la PKA est indispensable pour la fixation de l'ATP (Shoji *et al.*, 1981).

Après avoir comparé les séquences peptidiques de PKA et de *v-src*, Barker et Dayhoff (1982) montrèrent que le produit de l'oncogène *src* possède l'équivalent de la lysine 71 de la PKA : une lysine en position 295 se trouvant dans un environnement d'AA également conservé entre les deux protéines (figure 17). La preuve directe de la fixation d'ATP par la lysine 295 dans *src* fût apportée deux années plus tard par une expérience de fixation avec le FSBA (Kamps *et al.*, 1984).

Dans la séquence des protéine-kinases, la lysine impliquée dans la fixation de l'ATP est précédée par un groupe de glycines réparties de la manière suivante : (Gly X Gly X X Gly) (figure 17). Cette configuration de glycines est retrouvée dans des protéines qui lient des nucléotides et qui ne sont pas des kinases telles que la lactate deshydrogénase (qui fixe le NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide), la p21<sup>ras</sup> (qui fixe le GTP) (Wierenga *et al.*, 1983) ou des protéines bactériennes qui se lient à l'ADN et sont des facteurs d'élongation ou d'initiation (Rec A, Sancar *et al.*, 1980 ; Uvr D, Finch et Emmerson, 1984). Par cristallographie aux rayons X, la région contenant ce groupe de glycines dans la lactate deshydrogénase apparaît comme une charnière entre deux structures  $\beta$  plissées créant en quelque sorte une poche dans laquelle viendrait se nicher le NAD (Adams *et al.*, 1973). On peut alors penser que, dans les protéine-kinases, cette région riche en glycines intervient très probablement en synergie avec la lysine pour positionner l'ATP de manière à permettre le transfert du phosphate  $\gamma$  sur le substrat.

D'autres séquences très conservées sont retrouvées dans le domaine catalytique des kinases. Ce sont :

(Arg Asp Leu) ... (16AA) ... (Asp Phe Gly) ... (24AA) ... (Ala Pro Glu) soit selon le code lettre :  
(RDL) ... (16AA) ... (DFG) ... (24AA) ... (APE)

Les espaces qui séparent les différents triplets sont eux-mêmes relativement bien conservés dans tous les cas (figure 17) et il est vraisemblable que ces AA sont importants pour la catalyse. Des expériences, dont les conclusions vont dans ce sens, ont été faites pour pp60<sup>v-src</sup> (Bryant et Parsons, 1983; 1984)

## C - LES DIFFERENTES CLASSES DE PROTEINE-KINASES

### 1) CLASSIFICATION

Le nombre de kinases recensées dépasse aujourd'hui soixante dix. Elles sont regroupées

essentiellement dans deux sous-ensembles : les protéine-kinases spécifiques des résidus tyrosine qui connaissent leurs heures de gloire depuis la découverte des oncogènes et les protéine-kinases spécifiques des résidus sérine et thréonine que l'on connaissait déjà quand *src* a été isolée pour la première fois. Il existe d'autres kinases dont nous ne parlerons pas dans ce mémoire : ce sont, chez les procaryotes, des protéine-kinases qui ne possèdent pas la séquence canonique du domaine catalytique "classique" décrite plus haut (Ninfa et Magasanik, 1986 ; Nixon *et al.*, 1986) et chez les mammifères des protéine-kinases spécifiques des résidus lysine et histidine dont on ne connaît pas encore la structure (Smith *et al.*, 1974).

## 2) COMMENT DETECTER DE NOUVELLES KINASES ?

Nous avons vu dans la première partie de ce mémoire que, dans certaines tumeurs, de nouveaux proto-oncogènes avaient été repérés en raison de leur amplification (King *et al.*, 1985 ; Kohl *et al.*, 1983 ; Schwab *et al.*, 1983), identifiés à cause de leur ressemblance avec des oncogènes connus, puis rassemblés en familles (ex : famille des gènes *ras*). Dans le but d'ajouter aussi de nouveaux membres au club des protéine-kinases, des stratégies de clonage ont été élaborées sur la base des homologues de séquences décrites dans le paragraphe précédent.

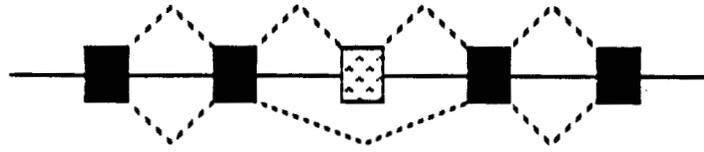
Une première stratégie consistait à faire une sonde radioactive avec l'ADN d'un des membres déjà reconnu de la famille (ex : *src*) pour cribler des banques d'ADNc dans des conditions d'hybridation non stringentes. Cette technique a été utilisée avec succès pour la découverte de nouvelles kinases (*syn* : Semba *et al.*, 1986 ; *slk* : Kawakami *et al.*, 1986 ; *abl*-related : Kruh *et al.*, 1986 ; *fps*-related : Foster *et al.*, 1986). Il est raisonnable de penser que le criblage de banques d'ADNc avec des sondes encore plus spécifiques du domaine catalytique ajoutera très certainement de nouveaux membres à la "famille kinase".

En fonction de leur spécificité de substrats les protéine-kinases présentent quelquefois un motif peptidique qui leur est propre. C'est le cas par exemple du groupe des protéine-kinases spécifiques des résidus sérine et thréonine dont les membres possèdent en particulier deux enchaînements peptidiques conservés de 6 et 9 AA (figure 25). Une stratégie consistait donc à utiliser ces deux séquences comme modèles pour la synthèse de deux sondes oligonucléotidiques. Ces dernières ont permis la détection de nouvelles kinases potentiellement spécifiques de résidus sérine et thréonine (Hanks, 1987).

## D - MODES DE REGULATION DES PROTEINE-KINASES

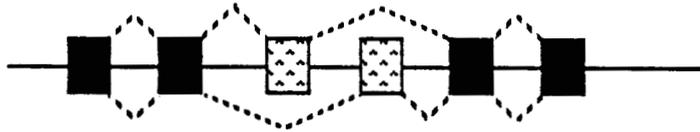
La régulation d'une enzyme (ou d'une protéine quelconque) dans une cellule peut s'effectuer à deux niveaux : soit au stade transcriptionnel (régulation au niveau des gènes) soit après la transcription, ce sont les modifications post-traductionnelles (régulation au niveau biochimique).

## SYSTEME CASSETTE

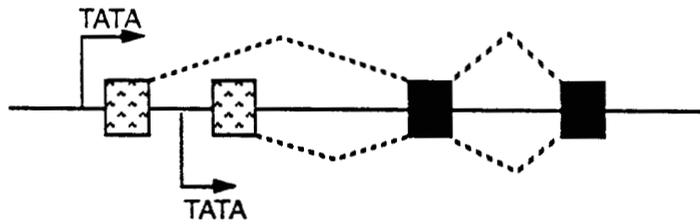


## MODELE DE MUTUELLE EXCLUSION

## Exons Internes



## Promoteurs Alternatifs



## Sites de polyadénylation alternatifs

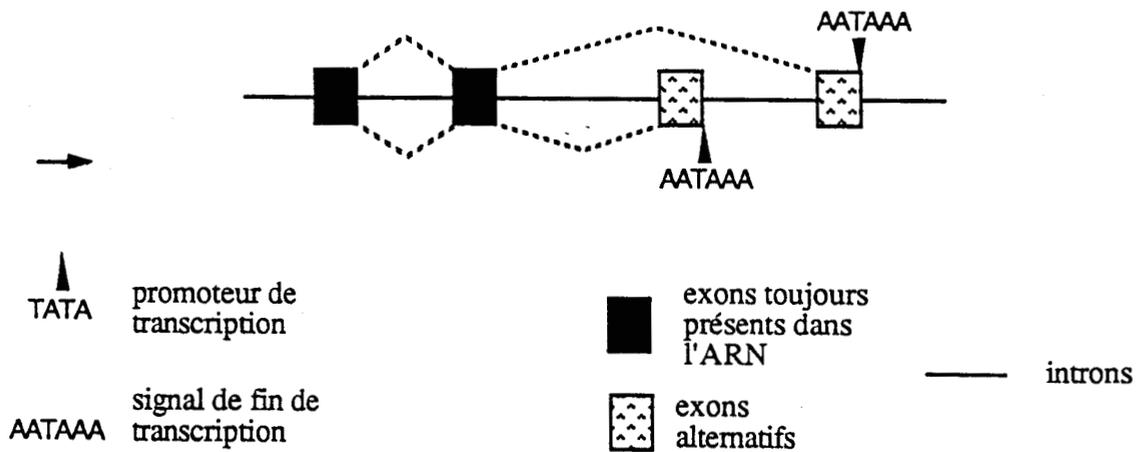


figure 18 : Mécanismes d'épissage alternatif.

## 1) REGULATION AU NIVEAU DES GENES

### a) "multi gene family"

Certaines protéine-kinases, que l'on imaginait être des entités enzymatiques uniques, sont en réalité des familles de protéines. C'est le cas de la protéine-kinase C (PKC) qui appartient au groupe des kinases spécifiques des résidus sérine et thréonine. En effet, ce que l'on appelle généralement la PKC, représente en réalité au moins 4 formes de polypeptides similaires, mais distincts, obtenus par traduction de 4 gènes différents (Knopf *et al.*, 1986).

Avoir, dans son génome, plusieurs copies de gènes apparentés codant pour des peptides similaires est à la portée des cellules procaryotes aussi bien que des cellules eucaryotes. Cependant, les cellules eucaryotes ont un mécanisme supplémentaire qui leur est exclusif puisqu'il faut que le gène soit en structure éclatée (présence d'introns) : c'est le mécanisme d'épissage alternatif.

### b) épissage alternatif

L'épissage alternatif est un mécanisme qui permet la maturation de plusieurs ARN messagers à partir d'un ARN pré-messager. Par ce mécanisme peuvent être générés plusieurs espèces d'ARN dont la traduction permettra la synthèse de protéines semblables mais différentes. Il existe plusieurs modèles d'épissage alternatif (figure 18). Dans le "système cassette", un exon (représenté en clair sur la figure) peut être alternativement épissé ou non selon les espèces d'ARN messagers. Dans le "modèle de mutuelle exclusion", la présence d'un exon dans une espèce d'ARN exclut la présence d'un autre exon au sein du même ARN et réciproquement. Ce dernier modèle s'applique aussi bien à des exons qui se trouvent à l'intérieur de l'ARN qu'à des exons contenant les signaux de promotion ou de polyadénylation (figure 18).

Un des 4 gènes de la PKC dont nous parlions dans le paragraphe précédent code, par un mécanisme d'épissage alternatif, pour deux protéines qui diffèrent seulement dans leur domaine carboxyterminal (Ohno *et al.*, 1987), ce qui amène à au moins 5 le nombre d'isoenzymes PKC.

La synthèse de plusieurs protéine-kinases, à partir d'un seul gène par un mécanisme d'épissage alternatif, a été observée également pour le gène *c-abl* (Ben Neriah *et al.*, 1986a ; Shtivelman *et al.*, 1986) et pour le gène *c-src* (Martinez *et al.*, 1987). Toutefois, ce mécanisme n'est pas une exclusivité des gènes qui codent pour des PK mais a déjà été décrit pour d'autres gènes, par exemple celui qui code pour la calcitonine (Amara *et al.*, 1982).

## 2) REGULATION AU NIVEAU BIOCHIMIQUE

Les protéine-kinases sont souvent des protéines oligomériques (constituées de plusieurs sous-unités). Généralement les sous-unités sont spécialisées dans une fonction soit régulatrice soit

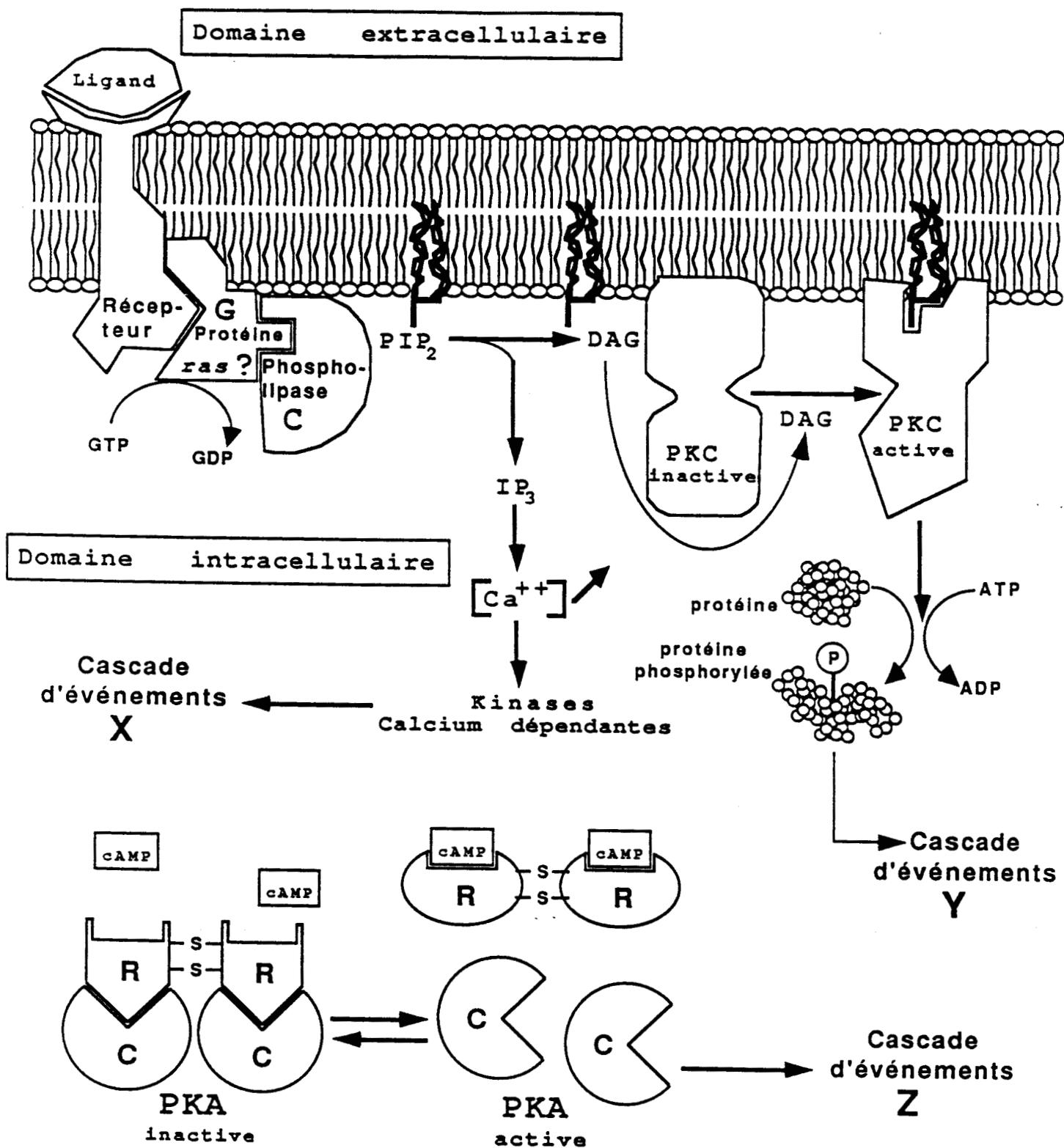


figure 19: Les seconds messagers.

catalytique. Par extension, on peut penser que les protéines monomériques (constituées d'une seule chaîne peptidique) possèdent, en plus de leur domaine catalytique, un domaine de régulation.

Parmi les kinases, certaines, telles que des récepteurs transmembranaires comme le récepteur de l'EGF, voient leur activité (tyrosine-kinase) stimulée par la fixation du ligand (EGF) ; d'autres sont activées par ce qu'on appelle des seconds messagers :

#### a) les seconds messagers

Ce sont des molécules qui servent de relais entre les signaux extracellulaires et l'intérieur de la cellule (figure 19). L'un d'eux, l'AMPc, régule directement l'activité de la PKA en se fixant sur la sous-unité régulatrice.

La PKC est stimulée par le diacylglycerol (DAG) et la concentration de calcium ( $Ca^{++}$ ). Le DAG est l'un des deux seconds messagers produit par l'hydrolyse enzymatique du phosphatidyl inositol biphosphate (PIP<sub>2</sub> = phospholipide membranaire) par une phospholipase C, en réponse à un signal transmembranaire. L'autre messenger, l'inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>) a probablement un rôle dans la mobilisation du calcium intracellulaire dont la concentration régule un ensemble de kinases calcium-dépendantes.

#### b) Régulation par phosphorylation/déphosphorylation

La présence de phosphates sur certaines protéines est connue depuis plus de 100 ans mais son importance n'a vraiment été comprise que depuis la découverte de la régulation de certains enzymes par des mécanismes réversibles de phosphorylation. Le premier modèle du genre fut établi dans les années 1955-70 par Krebs, Fisher et Larner. C'est à cette époque qu'ils découvrirent que le contrôle neuronal et hormonal du métabolisme du glycogène dans le muscle squelettique est régi par des modifications de phosphorylation des enzymes que sont la glycogène phosphorylase, la phosphorylase kinase et la glycogène synthétase. Sur la figure 20 (très simplifiée), on peut voir que la synthèse et la dégradation du glycogène sont contrôlées par les enzymes que nous venons de citer, que celles-ci sont contrôlées par des kinases et des phosphatases et que ces dernières sont elles-mêmes contrôlées par des métabolites du métabolisme du glycogène (pour revue voir Cohen, 1982).

Ce modèle était à peu près unique dans les années 1960 mais il s'est très rapidement généralisé après la découverte de la PKA. La phosphorylation des protéines est probablement le mécanisme le plus usité pour des événements intracellulaires en réponse à des stimuli externes.

### E - LES PROTEINE-TYROSINE-KINASES

La pp60<sup>v-src</sup> fut la première protéine pour laquelle une activité kinase spécifique de résidus tyrosine a été démontrée (Brugge et Erikson, 1977 ; Collett et Erikson, 1978 ; Levinson *et al.*, 1978). Alors que la phosphorylation sur des résidus tyrosine est un événement rare dans une



cellule normale (moins de 1 % de la phosphorylation sur des AA), on s'est aperçu, au cours d'un recensement des protéines oncogènes, que près de la moitié possède cette activité. Toutes ces protéine-tyrosine-kinases (PTK) ont en commun un domaine d'environ 30 kd qui contient le domaine catalytique dont nous avons parlé dans un paragraphe antérieur.

Selon leur localisation on peut séparer les membres de cette famille en 2 groupes :

- \* les protéines associées à la face interne de la membrane cytoplasmique.
- \* les protéines transmembranaires (dont les homologues cellulaires sont souvent des récepteurs de facteurs de croissance).

## 1) LES PROTEINES CYTOPLASMIQUES

Un exemple : *src*

### a) Synthèse et modifications post-traductionnelles de la protéine virale

Les capacités du virus RSV à transformer des fibroblastes *in vitro* et à être tumorigène *in vivo* résident dans l'expression de la PTK virale : pp60<sup>v-src</sup>. pp60<sup>v-src</sup> est un polypeptide de 526AA qui s'associe aux membranes (Courtneidge et Bishop, 1982) et ceci grâce à une modification post-traductionnelle que subit la protéine : la myristylation du résidu glycine 2 (Sefton *et al.*, 1982 ; Buss et Sefton, 1985) (figure 21). Par diverses techniques, il a été constaté que la fraction des protéines qui sont associées aux membranes est concentrée aux points de contact entre deux cellules (tight junctions) (Rohrschneider, 1980 ; Willingham *et al.*, 1979 ; Krueger *et al.*, 1980 ; Nigg *et al.*, 1982).

La substitution de la glycine 2 par un autre AA (alanine, acide glutamique) empêche la myristylation de la molécule (Kamps *et al.*, 1985). Cette mutation n'altère pas la fonction biochimique de la protéine *in vitro* (activité kinase) pourtant, elle supprime les propriétés transformantes de l'oncogène (Kamps *et al.*, 1986a) indiquant que la présence de pp60<sup>v-src</sup> à la surface interne de la membrane plasmique est indispensable pour la transformation par RSV.

La plupart des autres protéine-kinases de ce groupe sont des polypeptides de fusion *gag-onc*. Certaines (provenant de rétrovirus mammifères) sont myristylées, d'autres (provenant de rétrovirus aviaires) sont acétylées. On ne connaît pas encore les conséquences de ces modifications post-traductionnelles et il n'est pas évident que l'importance que revêt la myristylation pour pp60<sup>v-src</sup> puisse être étendue à d'autres kinases. En effet, prenons l'exemple de l'oncogène *v-fps* : selon les isolats viraux, ce gène est traduit soit sous la forme d'une protéine de fusion qui est myristylée et associée aux membranes (P140<sup>gag-fps</sup> ; FVS (Fujinami Sarcoma Virus) ; Feldman *et al.*, 1983 ; Moss *et al.*, 1984) soit sous la forme d'une protéine cytoplasmique (p91<sup>fps</sup> ; virus F36 ; Foster et Hanafusa, 1983). Dans les deux cas, les protéines sont transformantes *in vitro* et les virus tumorigènes *in vivo*. De plus, l'addition des 14 premiers AA de *v-src* (site de myristylation) à la p91<sup>fps</sup> modifie sa localisation mais n'altère pas de manière détectable l'activité biologique de la protéine (Pellman *et al.*, 1985).

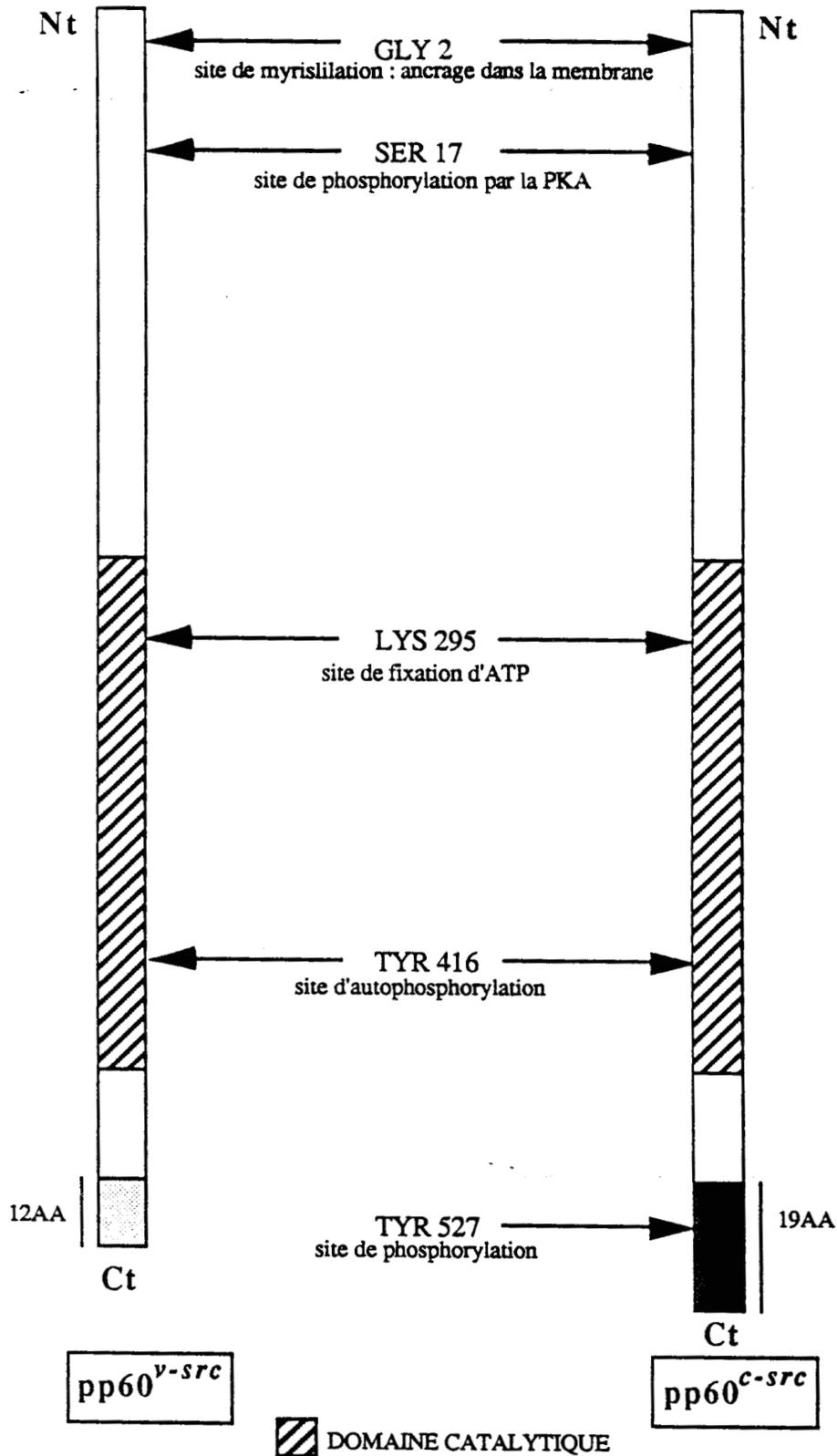


figure 21 : Organisation des protéines *src* virale et cellulaire.

En plus de la myristylation pp60<sup>v-src</sup> subit une autre modification post-traductionnelle : la phosphorylation. Deux sites majeurs de phosphorylation ont été identifiés : l'un sur la sérine 17 l'autre sur la tyrosine 416 (figure 21).

#### b) sites de phosphorylation de pp60<sup>v-src</sup>

##### Tyrosine 416 :

Il est plus que probable que la phosphorylation de la tyrosine 416 soit catalysée par pp60<sup>v-src</sup> elle-même puisque des mutants de pp60<sup>v-src</sup>, dépourvus d'activité kinase (par mutation du site de fixation d'ATP : lysine 295 ; Snyder *et al.*, 1985 ; Kamps et Sefton, 1986b), ne sont pas phosphorylés sur ce résidu que ce soit *in vivo* ou *in vitro*.

En fait, la tyrosine 416 fait partie des AA conservés caractéristiques des PTK. Elle se retrouve dans toutes les PTK connues, quelque soit leur classe (Neil *et al.*, 1981), entourée du même contexte peptidique que dans pp60<sup>v-src</sup>.

Pour comprendre le rôle et l'importance de ce site d'autophosphorylation de pp60<sup>v-src</sup>, un mutant, dans lequel le résidu tyrosine 416 a été remplacé par un résidu phénylalanine (non phosphorylable), a été construit (Snyder *et al.*, 1983). Alors que *in vitro*, la protéine mutée possède une activité kinase comparable à celle d'une protéine sauvage, vis à vis d'un substrat exogène, et qu'elle est toujours capable de transformer des fibroblastes (Snyder *et al.*, 1983), *in vivo*, elle n'est plus tumorigène (Snyder et Bishop, 1983). La même mutation a également été introduite dans la protéine virale P140<sup>gag-fps</sup> (Tyr 1073: Weinmaster *et al.*, 1984). Dans ce cas l'activité kinase observée *in vitro* est réduite par rapport à celle d'une protéine sauvage et la transformation des fibroblastes est plus longue à obtenir qu'avec un virus sauvage.

Il apparaît donc que la phosphorylation de la tyrosine 416 (ou de son équivalent dans d'autres protéine-kinases) joue très certainement un rôle de régulation positif. Ce rôle n'est pas détecté (pp60<sup>v-src</sup> : Snyder *et al.*, 1983), ou peu détecté (P140<sup>gag-fps</sup> : Weinmaster *et al.*, 1984), au cours d'un test kinase *in vitro* ou dans un système de culture cellulaire (transformation de fibroblastes embryonnaires) mais est entrevu dans des systèmes plus complexes comme le test de tumorigénicité.

##### Sérine 17 :

pp60<sup>v-src</sup> est également phosphorylée sur des résidus sérine. Le site majeur de ce type de phosphorylation est localisé sur la sérine 17 qui se trouve dans une séquence peptidique possédant toutes les caractéristiques d'un site de phosphorylation de la PKA (Collett *et al.*, 1979 ; Cross et Hanafusa, 1983). Dans ce sens, le traitement de cellules transformées par RSV par des agents qui augmentent la concentration intracellulaire de cAMP (stimulation de la PKA) accroît la phosphorylation de cette sérine (Roth *et al.*, 1983). Dans des expériences réalisées *in vitro*, la PKA est capable de phosphoryler pp60<sup>v-src</sup> précisément sur cette sérine (Collett *et al.*, 1979).

On ne comprend pas encore le rôle de cette phosphorylation dans pp60<sup>v-src</sup> puisque des

mutations dans cette région n'altèrent ni les propriétés biochimiques (activité kinase) ni les propriétés biologiques (transformation et tumorigénicité) de pp60<sup>v-src</sup> (Cross et Hanafusa, 1983).

### c) organisation de la protéine pp60<sup>v-src</sup>

On peut distinguer deux domaines dans pp60<sup>v-src</sup> : une partie carboxyterminale, qui correspond au domaine catalytique, et un domaine aminoterminal, qui n'est pas indispensable pour l'activité kinase, puisque des mutants de délétion de cette région possèdent toujours une activité kinase (Oppermann *et al.*, 1981). De même, le domaine carboxyterminal (26 kd) obtenu par digestion protéolytique est toujours capable de s'autophosphoryler *in vitro* (Levinson *et al.*, 1981).

Dans le domaine catalytique, on retrouve tous les AA typiques dont nous parlions dans le paragraphe "caractérisation du domaine catalytique" (figure 17) :

\* un groupe de glycines suivi d'une lysine en position 295.

Cette dernière a été remplacée par mutation dirigée par différents AA (arginine ou histidine : Kamps et Sefton, 1986b ; méthionine : Snyder *et al.*, 1985). Cette mutation entraîne la perte concomitante de l'activité kinase et des propriétés biologiques de pp60<sup>v-src</sup> (transformation et tumorigénicité).

\* les groupes Arg Asp Leu (position 385 à 387), Asp Phe Gly (Résidus 404 à 406) et Ala Pro Glu (résidus 430 à 432).

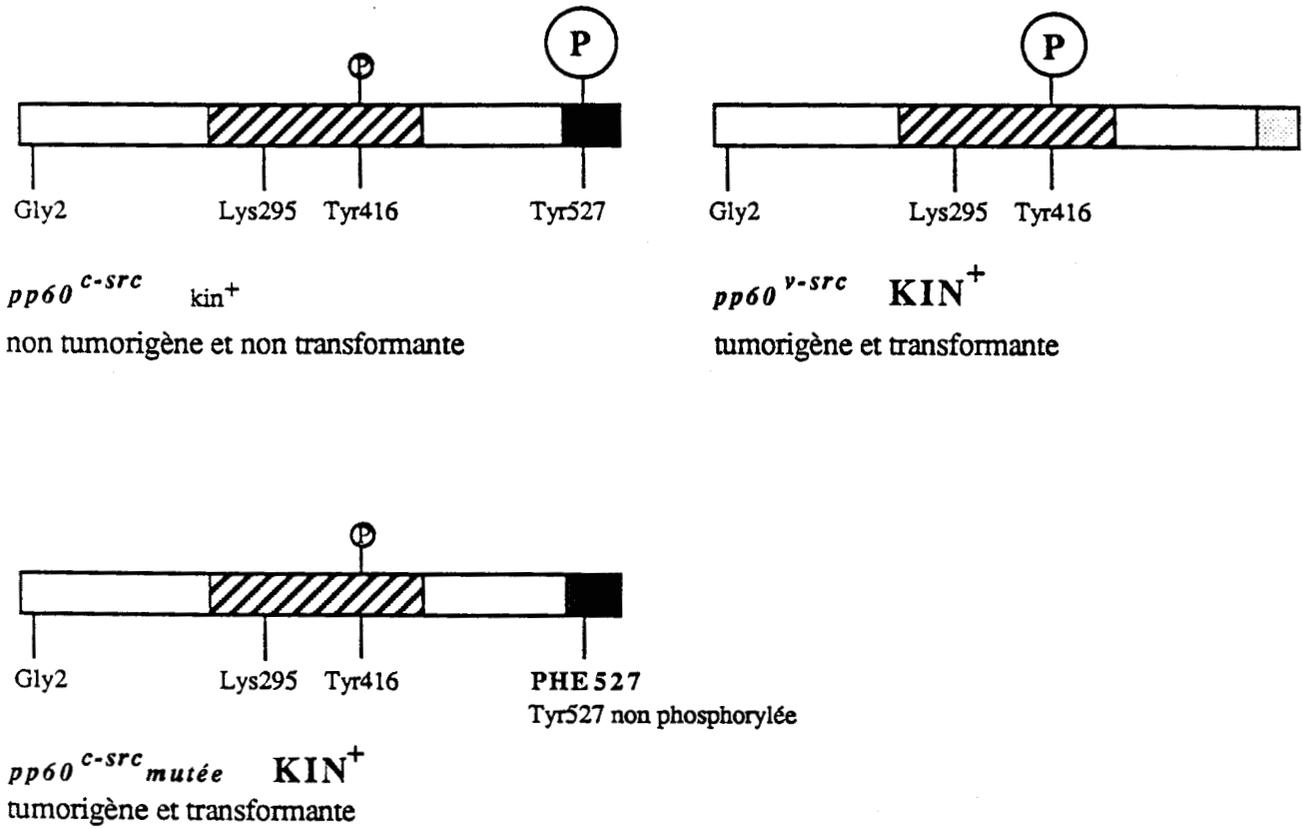
Des mutations indépendantes (Ala 430-->Val ; Pro 431-->Ser ; Glu 432-->Lys ; Ala 433-->Thr) suppriment la tumorigénicité et diminuent fortement l'activité kinase de pp60<sup>v-src</sup> (Bryant et Parsons, 1983 ; 1984).

L'organisation de pp60<sup>v-src</sup> peut être généralisée à toutes les PTK de cette famille. Elles présentent toutes une région carboxyterminale contenant le domaine catalytique et une région aminoterminal dont l'élimination ne supprime pas l'activité kinase de la protéine (Brugge et Darrow, 1984 ; Weinmaster *et al.*, 1983). La région aminoterminal des protéines cellulaires posséderait peut-être un rôle de régulation qui serait absent dans les protéines virales puisqu'elles en sont dépourvues.

### d) la protéine cellulaire src

La protéine cellulaire pp60<sup>c-src</sup> est structurellement proche de pp60<sup>v-src</sup> (Collett *et al.*, 1978 ; Opperman *et al.*, 1979). pp60<sup>c-src</sup>, comme pp60<sup>v-src</sup>, est une protéine-kinase spécifique des résidus tyrosine (Hunter et Sefton, 1980). Les deux protéines (virale et cellulaire) sont phosphorylées sur des résidus serine (Collett *et al.*, 1979) et tyrosine (Hunter et Sefton, 1980 ; Karess et Hanafusa, 1981). Cependant pp60<sup>c-src</sup> est incapable de transformer des cellules même lorsqu'elle est exprimée à un taux qui est suffisant à pp60<sup>v-src</sup> pour induire la transformation (Parker *et al.*, 1984 ; Iba *et al.*, 1985).

La séquence peptidique de pp60<sup>c-src</sup> est quasiment identique à celle de pp60<sup>v-src</sup> (Takeya et



**figure 22 :** Importance de la phosphorylation de la Tyr 527 de *pp60<sup>c-src</sup>*.

Hanafusa, 1983) (figure 21), pourtant l'activité kinase de pp60<sup>c-src</sup> est environ 10 fois plus faible que celle de pp60<sup>v-src</sup> (Iba *et al.*, 1985) (figure 22). La plus grande différence, entre la protéine virale et la protéine cellulaire, se situe dans la partie carboxyterminale des protéines où les 19 derniers AA de pp60<sup>c-src</sup> ont été remplacés par 12 AA différents dans pp60<sup>v-src</sup> (Takeya et Hanafusa, 1983). Chez le poulet, pp60<sup>c-src</sup> et pp60<sup>v-src</sup> sont phosphorylées sur la même sérine 17 (Collett *et al.*, 1979 ; Karess et Hanafusa, 1981 ; Cross et Hanafusa, 1983). Au contraire, les sites de phosphorylation des résidus tyrosine *in vivo* sont différents (Karess et Hanafusa, 1981). pp60<sup>v-src</sup> est phosphorylée principalement sur la tyrosine 416, à la fois *in vivo* et *in vitro* (Smart *et al.*, 1981) alors que la tyrosine 416 de pp60<sup>c-src</sup> peut être phosphorylée *in vitro* mais l'est très peu *in vivo* (Iba *et al.*, 1985).

Le principal site de phosphorylation de pp60<sup>c-src</sup> est une tyrosine en position 527 qui est absente de pp60<sup>v-src</sup> (Cooper *et al.*, 1986a ; 1986b) (figure 22). Pour analyser le rôle de régulation qui avait été proposé pour la phosphorylation de la tyrosine 527 (Courtneidge, 1985 ; Cooper *et al.*, 1986a ; 1986b), ce résidu a été remplacé par un résidu phénylalanine (Piwnicka-Worms *et al.*, 1987 ; Cartwright *et al.*, 1987 ; Kmiecik et Shalloway, 1987). La pp60<sup>c-src</sup> ainsi mutée devient capable de transformer des fibroblastes embryonnaires et de les rendre tumorigènes. De plus, son activité kinase est considérablement augmentée et devient comparable à celle de la protéine virale (figure 22).

Dans le but de supprimer son activité kinase, la lysine 295 de la protéine cellulaire a été mutée en méthionine (Jove *et al.*, 1987). Cette mutation n'empêche pas la tyrosine 527 d'être phosphorylée *in vivo*. Il est donc probable que ce résidu est phosphorylé *in trans* par une protéine-kinase cellulaire autre que *c-src*.

## 2) LES PROTEINES TRANSMEMBRANAIRES

### un exemple *erbB*

#### a) la protéine virale

Le produit de traduction de l'oncogène *v-erbB* est une protéine transmembranaire (Privalsky *et al.*, 1983) de 74 kd phosphorylée et glycosylée (Hayman *et al.*, 1983). La séquence peptidique de *v-erbB* présente les séquences consensus des protéine-kinases (Yamamoto *et al.*, 1983 ; Privalsky et Bishop, 1984) : la protéine est d'ailleurs associée à une activité kinase spécifique de résidus tyrosine (Gilmore *et al.*, 1985 ; Kris *et al.*, 1985).

D'après sa séquence peptidique, la protéine *v-erbB* correspond à une version tronquée du récepteur de l'EGF auquel il manquerait le domaine aminoterminal qui lie l'EGF (Downward *et al.*, 1984b) ainsi qu'une portion du domaine carboxyterminal. Les deux protéines possèdent en commun le domaine transmembranaire et le domaine carboxyterminal (domaine catalytique) (Ullrich *et al.*, 1984b). C'est pourquoi il a été suggéré que *v-erbB* pourrait correspondre à une version activée de manière constitutive du récepteur de l'EGF (figure 23).

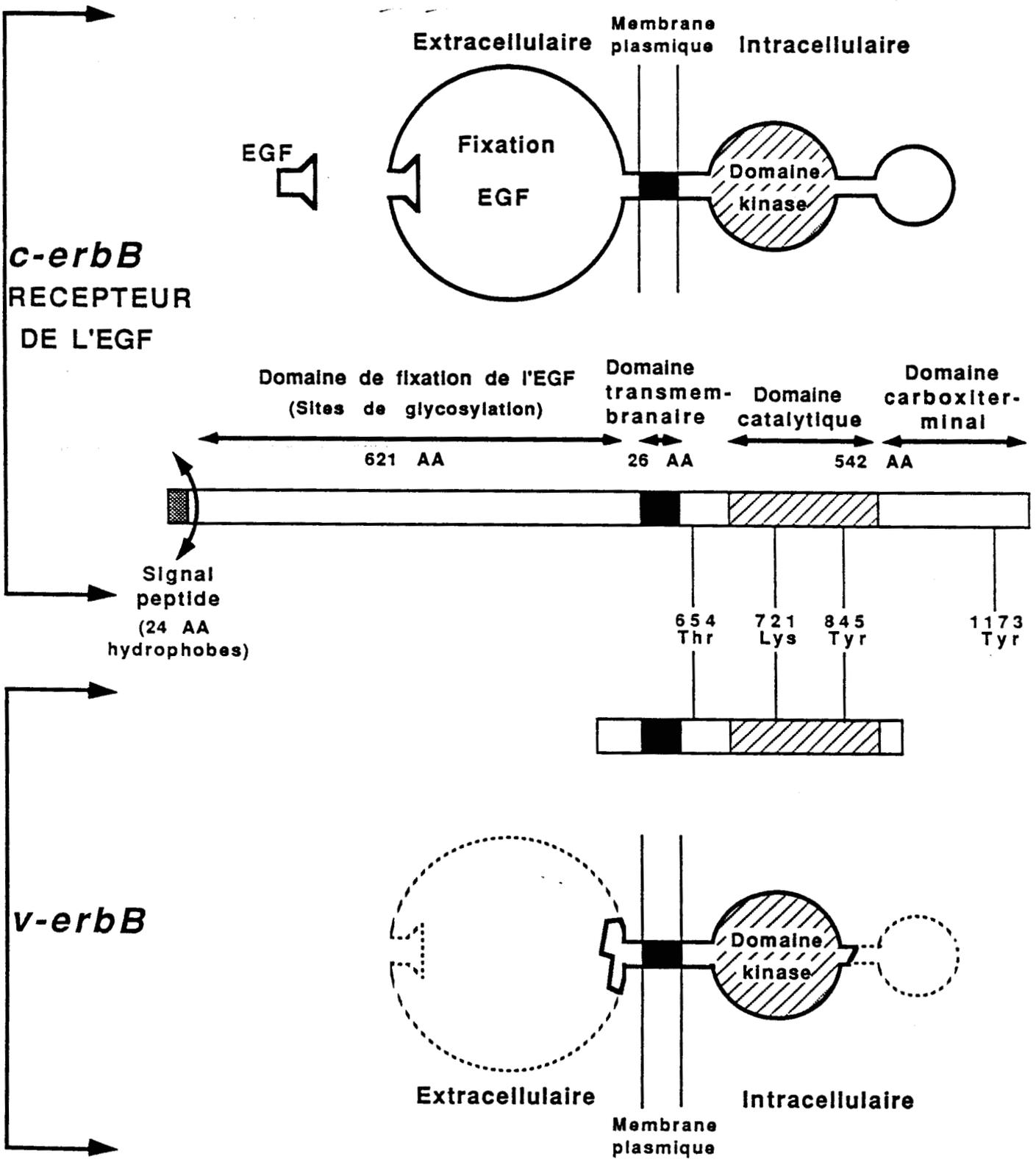


figure 23: Comparaison de *c-erbB* et *v-erbB*.

## b) la protéine cellulaire

Comme la protéine virale *erbB*, le récepteur de l'EGF est une glycoprotéine transmembranaire qui possède une activité tyrosine-kinase (Kris *et al.*, 1985). Sa séquence peptidique a été déduite de la séquence nucléotidique de différents ADNc (Ullrich *et al.*, 1984 ; Xu *et al.*, 1984 ; Lin *et al.*, 1984) et montre que la protéine commence par un signal peptidique hydrophobe de 24 AA qui est éliminé de manière post-traductionnelle (figure 23).

Dans la protéine *c-erbB* se distinguent deux domaines, séparés par une séquence hydrophobe de 26 AA (domaine transmembranaire).

\* un domaine aminoterminal riche en cystéines qui correspond au domaine qui fixe l'EGF. On peut présumer que le rôle des cystéines est de former des ponts disulfures et de stabiliser le domaine extracellulaire.

\* un domaine carboxyterminal qui reste à l'intérieur de la cellule. Ce domaine contient le domaine catalytique et un peptide carboxyterminal supplémentaire de 28 AA par rapport à la protéine virale. Ce peptide contient une tyrosine (en position 1173) dont nous discuterons l'importance ultérieurement.

Le récepteur de l'EGF est une molécule qui est phosphorylée *in vivo* à la fois sur des résidus sérine, thréonine et tyrosine. Aucune kinase connue n'étant capable d'avoir une telle diversité de substrat, il est probable que l'accomplissement de la phosphorylation du récepteur de l'EGF passe par l'intermédiaire de plusieurs kinases.

## c) Phosphorylation du récepteur de l'EGF

*In vivo*, l'utilisation d'agents chimiques qui activent la PKC, tel que le TPA, inhibe l'induction de la prolifération en dépit de la présence d'EGF. L'activité kinase du récepteur de l'EGF est diminuée et l'analyse biochimique de la protéine dévoile une augmentation de la phosphorylation sur un résidu thréonine en position 654 (Hunter *et al.*, 1984). Cette thréonine se trouve dans la portion de la molécule qui reste à l'intérieur de la cellule, à 9 résidus du domaine transmembranaire, dans une région très basique (figure 23). Elle pourrait donc être dans une position où elle peut moduler le signal entre le domaine interne et le domaine externe du récepteur. Ceci est bien corrélé avec la diminution de l'activité tyrosine-kinase du récepteur observée après phosphorylation de la thréonine 654. La phosphorylation de la thréonine 654 pourrait être un mécanisme physiologique faisant partie d'une régulation négative.

Au contraire de ce qui a été décrit pour pp60<sup>v-src</sup>, le récepteur de l'EGF ne semble pas s'autophosphoryler sur la tyrosine 845 (l'équivalent de la tyrosine 416 dans pp60<sup>v-src</sup>). Ceci est peut-être dû à l'environnement de la tyrosine 845 qui est basique et différent de celui de la tyrosine 416. Par contre, la fixation de l'EGF sur son récepteur induit une phosphorylation de ce dernier

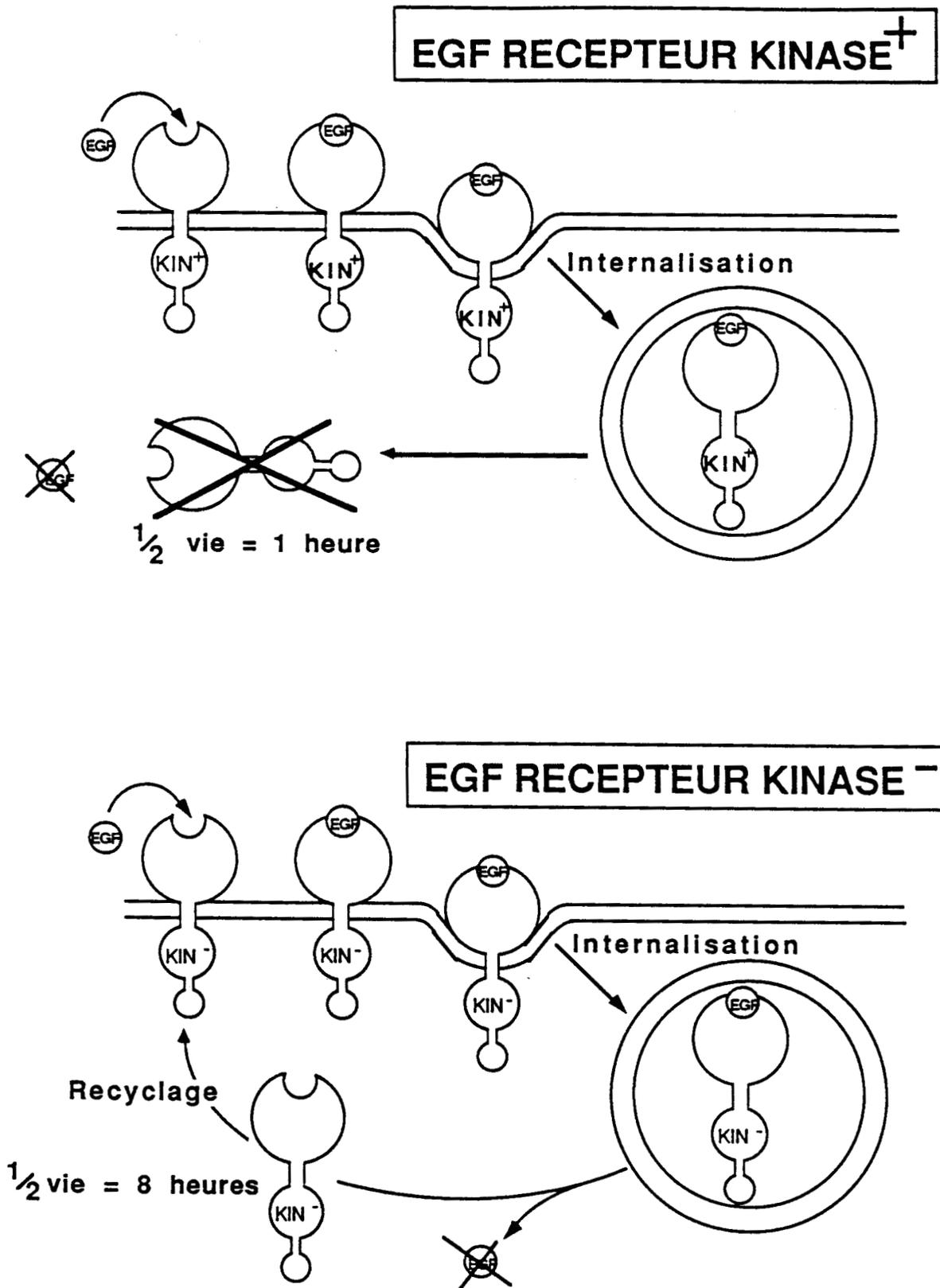


figure 24: Importance de la fonction Tyrosine-Kinase pour la régulation négative du récepteur de l'EGF.

dans son domaine carboxyterminal sur des résidus tyrosine (Downward *et al.*, 1984a), le site majeur étant une tyrosine en position 1173 (absente de la protéine virale : figure 23). La signification de cette phosphorylation a longtemps été débattue (Downward *et al.*, 1984a). Il a été suggéré que son rôle pouvait être d'augmenter l'activité tyrosine-kinase du récepteur vers des substrats exogènes comme cela a déjà été montré pour le récepteur de l'insuline (Ellis *et al.*, 1986).

#### d) Le domaine catalytique du récepteur de l'EGF

Le domaine catalytique du récepteur de l'EGF présente toutes les caractéristiques des protéine-tyrosine-kinases : la séquence (Gly X Gly X X Gly) suivie d'un résidu lysine en position 721 et des autres séquences dont nous avons déjà parlé. Il y a tout de même une petite exception : le résidu proline (en position 431 dans pp60<sup>v-src</sup>) qui est remplacé par une leucine (figure 17).

Pour connaître l'importance de la fonction kinase en tant qu'intermédiaire entre la fixation de l'EGF, qui est le message, et la prolifération cellulaire, qui est la réponse, a été créé un mutant dont l'activité kinase a été abolie par substitution de la lysine 721 en alanine (Honegger *et al.*, 1987). Cette mutation n'empêche pas la fixation de l'EGF sur son récepteur mais a des conséquences sur le devenir de la molécule dans la cellule comme cela est représenté sur la figure 24. La fixation de l'EGF sur son récepteur (non muté) augmente l'activité kinase de ce dernier qui phosphoryle divers substrats dans la cellule qui interviennent probablement dans une cascade d'événements qui conduisent à la mitose. Une régulation négative intervient alors par internalisation du couple EGF/Récepteur dans le compartiment intracellulaire où les deux protagonistes sont dégradés. Dans ce cas, la demi-vie d'un récepteur est d'environ 1 heure. Lorsque ce récepteur est dépourvu d'activité kinase, le mécanisme d'internalisation reste le même (bien qu'il n'y ait pas d'induction de la prolifération cellulaire), mais une fois internalisés, seul l'EGF est dégradé tandis que le récepteur, dont la demi-vie est de maintenant 8 heures (comme celle d'un récepteur qui n'a pas fixé de molécule d'EGF), peut être recyclé à la surface de la cellule (figure 24).

### 3) GENERALISATION

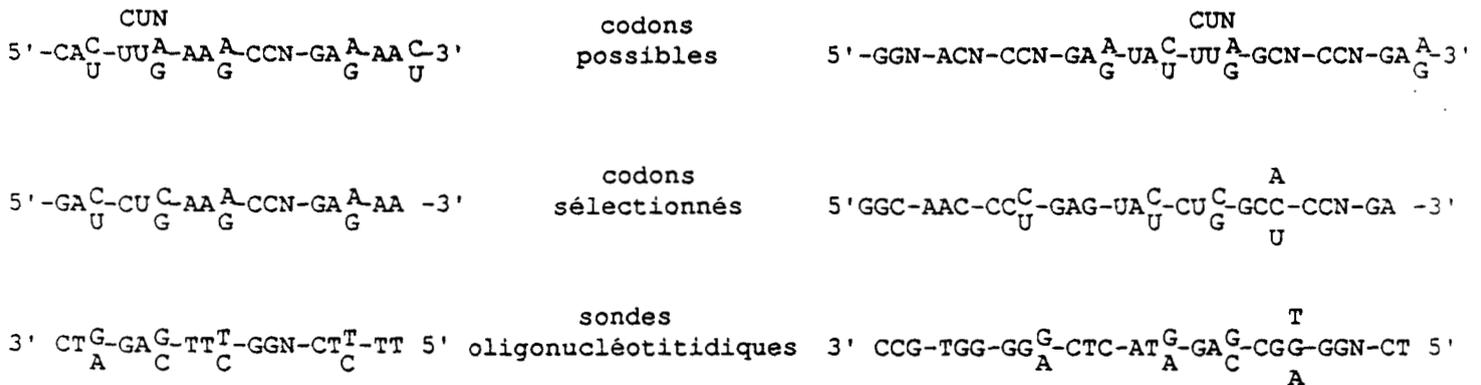
Quelque soit leur localisation (cytoplasmiques ou transmembranaires), les protéine-tyrosine-kinases présentent des propriétés communes :

- \* un domaine catalytique qui caractérise leur état de kinase.
- \* une tyrosine qui est présente dans la protéine virale comme dans la protéine cellulaire. Elle correspond souvent à un site d'autophosphorylation (Tyr 416 : pp60<sup>v-src</sup>) bien qu'elle ne soit pas toujours usitée (Tyr 845 : récepteur de l'EGF). Utilisée ou non, elle est la signature que la kinase qui la possède est spécifique de résidus tyrosine.
- \* une tyrosine dans le domaine carboxyterminal de la protéine cellulaire qui est absente de la protéine virale soit parce que la protéine est tronquée (gp 74<sup>v-erbB</sup>) soit parce qu'elle possède une autre séquence à la place (pp60<sup>v-src</sup>). Cette tyrosine possède très certainement un rôle de régulation négative qui est supprimée pour les protéines virales.

### PROTEINE-SERINE-KINASES

161	DLIYRDLKPENLLIDQ...	PKA	...195	TWTLOGTPEYLAPETIILSK
478	GIIYRDLKPENLILDH...	cGMP PK	...514	TWTFCGTPEYVAPEIILNK
144	NIVHRDLKPENILLDD...	Phosphorylase Kinase $\gamma$	...180	LREVCGTSPSYLAPETIECS
177	RVLHIDLKPENILLDD...	MLCK Myosin Light Chain Kinase	...215	LKVNFGTPEFLSPEVVNYD

<b>DLKPEN</b>	<b>Sequences consensus</b>	<b>GTPEYLAPET</b>
Asp-Leu-Lys-Pro-Glu-Asn		Gly-Thr-Pro-Glu-Tyr-Leu-Ala-Pro-Glu



### PROTEINE-TYROSINE-KINASES

1039	HCIHFDLAARNCLVTE...	v-fps	...1077	GGMKQIPVKWTAPETILKGE
665	NYIHFDLRAANILLVGD...	v-yes	... 703	RQGARFPKWTAPETAAALYG
381	NYVHFDLRAANILLVGE...	v-src	... 419	RQGARFPKWTAPETAAALYG
252	RLVHFDLAARNVLVKT...	v-erbB	... 290	AEGGRVPIKWMALLESILHR

<b>DLRAAN</b>	<b>Sequences consensus</b>	<b>KPIKWTAPET</b>
DLAARN		

figure 25: Régions peptidiques des protéine-kinases "caractérisant" leur spécificité.

Il n'y a apparemment pas de généralisations possibles sur les phosphorylations des résidus sérine ou thréonine qui semblent appartenir à des métabolismes spécifiques de chaque protéine (qu'elle soit virale ou cellulaire).

## F- LES PROTEINE-SERINE-KINASES

Les protéine-sérine-kinases sont sans doute l'espèce de kinases la plus représentée dans une cellule. Pourtant, il n'y a que 3 oncogènes possédant cette activité qui ont été décrits et isolés jusqu'alors : *v-mos*, chez le poulet (Kloetzer *et al.*, 1983 ; 1984), *v-mil*, chez le poulet et son homologue murin, *v-raf* (Moelling *et al.*, 1984). Nous discuterons de *v-mil* et *v-raf* dans les chapitres réservés au rétrovirus MH2 et aux résultats.

On connaît assez peu de choses sur l'oncogène *v-mos* mis à part le fait que c'est un gène transformant dont le produit de traduction possède un domaine catalytique typique de protéine-kinase entourant une lysine en position 121.

Pour connaître l'importance de cet AA dans la transformation, des mutants de *p37<sup>mos</sup>* dans lesquels la lysine 121 a été remplacée (par un acide aspartique ou une arginine) ont été construits (Hannink et Donoghue., 1985). Cette substitution, étant toujours accompagnée de la perte de la transformation, démontrait que l'activité kinase de *p37<sup>mos</sup>* est indissociable de la transformation.

L'analyse de la séquence peptidique des protéines *mos*, *mil* et *raf* d'ailleurs, ne révèle aucun des résidus tyrosine qui caractérisent la famille des tyrosine-kinases. A l'exception du domaine catalytique les protéine-sérine-kinases ne semblent présenter qu'assez peu d'homologies entre-elles et apparaissent comme un groupe plus hétérogène que celui des PTK.

Cependant, il existe deux régions conservées de 6 et 9 AA dans la famille des sérine-kinases se trouvant au voisinage des séquences (RDL)... (16AA)... (DFG)... (24AA)... (APE) (figure 17). Ces régions ont été utilisées pour préparer des sondes oligonucléotidiques (Hanks *et al.*, 1987) (figure 25). Ces sondes ont servi à cribler des banques d'ADNc et à isoler des ADNc : PSK-C3 (Putative protein Serine Kinase C3), PSK-H1, PSK-J3 et PSK-K5.

La première sonde est un mélange d'oligonucléotides codant pour les AA ; Asp-Leu-Lys-Pro-Glu-Asn (DLKPEN). Cette séquence commence à la position 166 dans PKA et est aussi présente dans 3 autres protéine-sérine-kinases : la PK cGMP dépendante, la sous-unité  $\alpha$  de la phosphorylase kinase et la MLCK (myosin light chain kinase). Dans les protéine-tyrosine-kinases, ce sont les séquences Asp-Leu-Arg-Ala-Ala-Asn (DLRAAN) ou Asp-Leu-Ala-Ala-Arg-Asn (DLAARN) qui sont caractéristiques de cette région (figure 25).

La seconde sonde est un mélange d'oligonucléotides correspondant à la séquence Gly-Thr-Pro-Glu-Tyr-Leu-Ala-Pro-Glu (GTPEYLPE). Cette région se trouve à environ 29 résidus (AA) du côté carboxyterminal de la première séquence. Cette région est un peu moins conservée que la séquence (DLKPEN). Dans les tyrosine-kinases, cette séquence est complètement divergente et est caractérisée par la séquence Lys-Pro-Ile-Lys-Trp-Thr-Ala-Pro-Glu (KPIKWTAPE) (figure 25).

Table 1. Mammalian, Drosophila, and Yeast Protein Kinases

Mammals (total = 79)	
<u>Protein-serine/threonine kinases (50)</u>	<u>Protein-tyrosine kinases (29)</u>
Cyclic nucleotide-regulated	src gene family
cAMP-dependent protein kinases (C <sub>α</sub> , C <sub>β</sub> )	pp60 <sup>c-src</sup> (fibroblast, neuronal forms)
cGMP-dependent protein kinase	pp62 <sup>c-yes</sup> , pp56 <sup>c-kt</sup>
Calmodulin-regulated	<i>fgr, hck, lyn, lyn</i> proteins
Phosphorylase kinase (distinct liver and muscle forms?)	abl gene family
Myosin light chain kinases (skeletal, smooth muscle)	p150 <sup>c-abl</sup> (Type I and Type II N-terminus)
Type II-calmodulin dependent protein kinase	arg protein
(brain α, β, β' subunits; liver α, α' subunits; muscle β, β' subunits)	fps gene family
Calmodulin-dependent protein kinases I and III	p98 <sup>c-fps</sup>
Diacylglycerol-regulated	NCP94
Protein kinase Cs (α, β and β', γ, δ [RP14])	c-fps-related proteins (TKR11 and TKR16)
Others	Growth factor receptors
Casein kinases I and II	EGF receptor family
Nuclear protein kinases N1 and N2	EGF receptor (c-erbB protein)
Protease-activated kinases I and II	neu protein (erbB2 protein)
Glycogen synthase kinases 3 and 4	Insulin receptor family
Heme-regulated protein kinase	Insulin receptor
Double-stranded RNA regulated protein kinase	IGF-1 receptor
Double-stranded DNA regulated protein kinase	c-ros, met, trk proteins
S6 kinase	PDGF receptor family
β-adrenergic receptor kinase	PDGF receptor
Rhodopsin kinase	CSF-1 receptor (c-fms protein)
Histone H1 kinase	c-kit protein
Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase kinase	c-sea, ret proteins
Pyruvate dehydrogenase kinase	Others
Branched chain ketoacid dehydrogenase kinase	p75 (liver)
Polypeptide-dependent protein kinase	p120 (brain)
Polyamine-stimulated protein kinase	
<i>c-mos, c-raf, A-raf, pks, pim-1</i> proteins	
CDC-R (PSK-J3), CDC2Hs, PSK H1, PSK-C3	
<u>Drosophila (total = 18)</u>	
<u>Protein-serine/threonine kinases</u>	<u>Protein-tyrosine kinases</u>
Cyclic nucleotide-regulated	Dsrc64B protein
cAMP-dependent protein kinase-related (C0, C1, C2)	Dsrc28C protein
cGMP-dependent protein kinase-related (G0 [2 genes], G1)	Dash protein
Diacylglycerol-regulated	fps-related protein
Protein kinase C	EGF receptor (Types I, II, III N-terminus)
Others	Insulin receptor
Casein kinase II	sevenless protein
raf protein	
<u>Yeast (total = 14)</u>	
Cyclic nucleotide-regulated	
cAMP-dependent protein kinase-related	
TPK1, TPK2, TPK3, SRA3 (S. cerevisiae)	
Others	
CDC28 (S. cerevisiae (=cdc2* in S. pombe))	
CDC7 (S. cerevisiae)	
KIN28 (S. cerevisiae)	
wee1* (S. pombe)	
nim1* (S. pombe)	
STE7, STE11 (S. cerevisiae)	
KIN1, KIN2 (S. cerevisiae)	
SNF1 (S. cerevisiae)	
ran1* (S. pombe)	

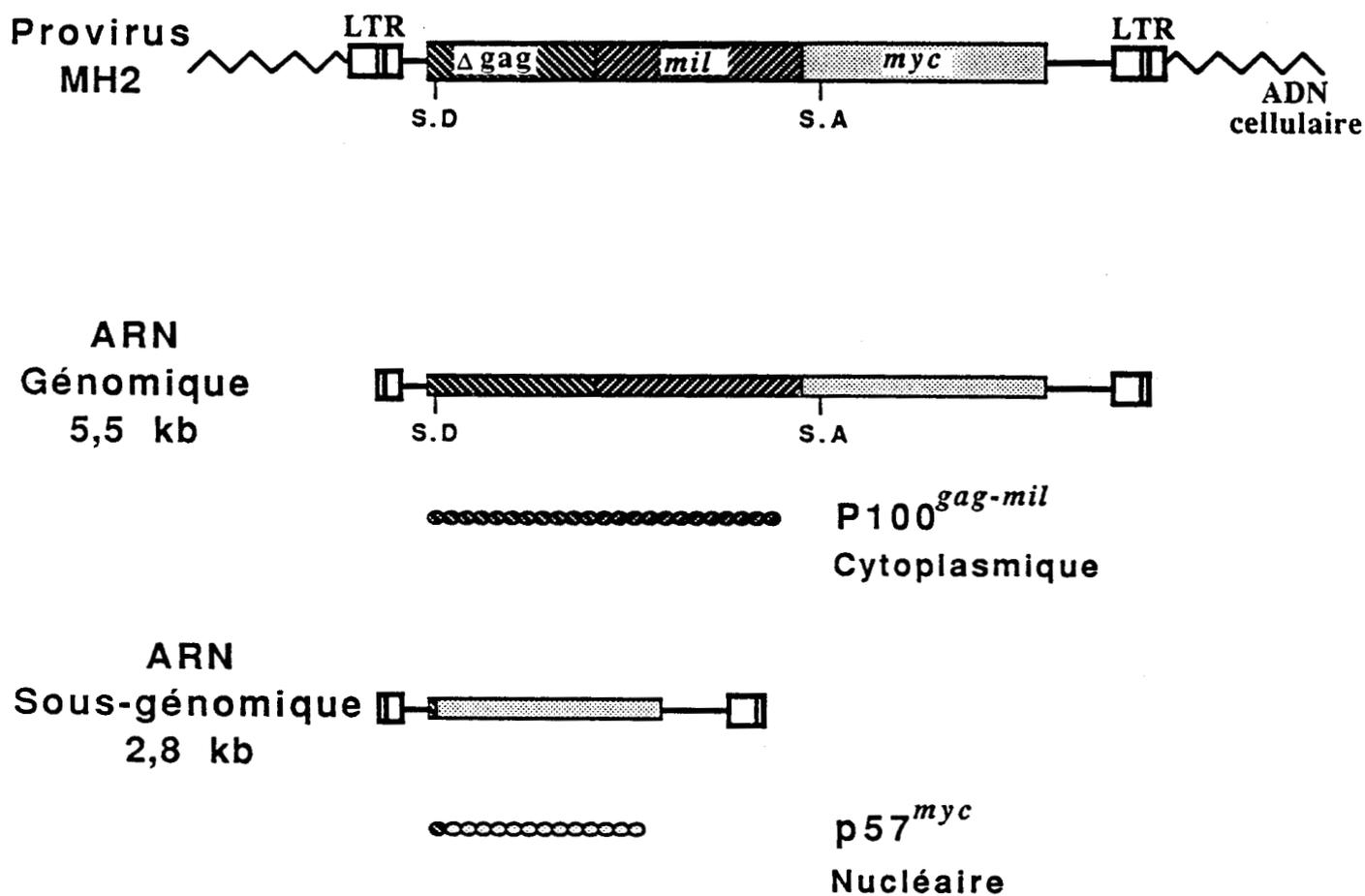
**figure 26 : protéine-kinases qui on été isolées chez la levure, la drosophile et l'homme**

extrait de "A thousand and one Protein Kinases" T.HUNTER , (1987) , Cell , vol 50 , 821-822

## G- CONCLUSION

A l'heure actuelle une vingtaine de protéine-sérine-kinases ont été isolées chez la levure (figure 26). Cependant, bien qu'une activité tyrosine-kinase puisse être détectée dans des extraits de levure (Schieven *et al.*, 1986), aucun enzyme ayant cette spécificité de substrat n'a été isolé en dépit des efforts poursuivis dans ce sens. Chez la drosophile, quelques protéine-tyrosine-kinases ont été isolées. Sur la base de ces observations, on peut penser que les protéine-tyrosine-kinases sont une famille de gènes qui est apparue plus tard que celle des protéine-sérine-kinases. Ces dernières pourraient, d'ailleurs, très bien être à l'origine de ce nouvel embranchement.

Dans les organismes supérieurs (métazoaires), un certain nombre de protéine-tyrosine-kinases sont utilisées en tant que récepteurs d'hormones peptidiques ou de facteurs de croissance (quelques fois produits par d'autres cellules de l'organisme). Chaque cellule de cet organisme doit avoir une croissance qui s'harmonise avec celle de ses congénères dans le même tissu ou dans les tissus avoisinants. Alors que, même si leur croissance dépend quelques fois des autres cellules avec lesquelles ils vivent, des organismes unicellulaires comme la levure, n'ont très certainement pas besoin de régulations aussi sophistiquées. Dans ce cas, on peut imaginer que la présence de tyrosine-kinases et leur nombre dans le génome d'une cellule pourraient définir son niveau d'évolution.



S.D et S.A: signaux d'épissage nécessaires à la formation de l'ARN sous-génomique.

figure 27: Structure et expression du provirus MH2.

# LE RETROVIRUS AVIAIRE MH2

## A- STRUCTURE et EXPRESSION du PROVIRUS.

Le rétrovirus aviaire MH2 fait partie des rétrovirus leucémogènes défectifs (DLV) qui ont transduit l'oncogène *v-myc* dans leur génome et dont le prototype est MC29. Les deux autres membres de cette famille sont CMII (myelocytomatosis virus) et OK 10 (Oker Blom's isolate). En plus de l'oncogène *v-myc*, le génome de MH2 héberge un second oncogène (qui a été baptisé deux fois) : *v-mil* (ou *v-mht*) (Saule *et al.*, 1983 ; Kan *et al.*, 1983 ; Coll *et al.*, 1983 ; Jansen *et al.*, 1983).

L'expression des oncogènes *v-mil* et *v-myc* (schématisée par la figure 27) passe par l'intermédiaire de 2 ARN distincts (Pachl *et al.*, 1983 ; Saule *et al.*, 1983). *v-mil* est traduit à partir d'un ARN génomique de 5,5 kb sous la forme d'une protéine de fusion de 100 kd contenant des déterminants *gag* dans sa partie aminoterminal : la P100*gag-mil* (Hu *et al.*, 1978 ; Haymann *et al.*, 1979) qui est cytoplasmique. C'est à partir d'un ARN sous-génomique (de 2,8 kb) que *v-myc* est exprimé en une protéine nucléaire de 57 kd (Pachl *et al.*, 1983 ; Hann *et al.*, 1983) qui se lie à l'ADN dans des expériences réalisées *in vitro* (Bunte *et al.*, 1983).

Les propriétés biologiques de MH2 étant quelque peu différentes des propriétés biologiques des rétrovirus qui ne contiennent que *v-myc* dans leur génome, on pouvait supposer que cette différence était due à l'expression de *v-mil* seul ou alors à l'expression de *v-mil* en coopération avec celle de *v-myc*.

## B- PROPRIETES BIOLOGIQUES de MH2.

*In vivo*, la présence de *v-mil* confère à MH2 une pathogénicité plus aiguë que celles des autres rétrovirus qui ne contiennent que *v-myc* dans leur génome (Linial, 1982) : l'infection de cailles japonaises âgées de 2 à 3 semaines par le virus MC29 ne provoque l'apparition de tumeurs que dans 2 cas sur 29 (7%) tandis qu'avec le rétrovirus MH2, 50 sur 67 (75%) des oiseaux infectés présentent des développements de cellules malignes (au moins aux sites d'injections).

*In vitro*, les modèles cellulaires les plus couramment étudiés pour l'étude de MH2 sont les macrophages, les neurorétines et les fibroblastes. La construction de mutants de délétion soit dans *v-mil* soit dans *v-myc* a permis d'étudier le rôle de chacun des deux oncogènes dans ces différents systèmes.

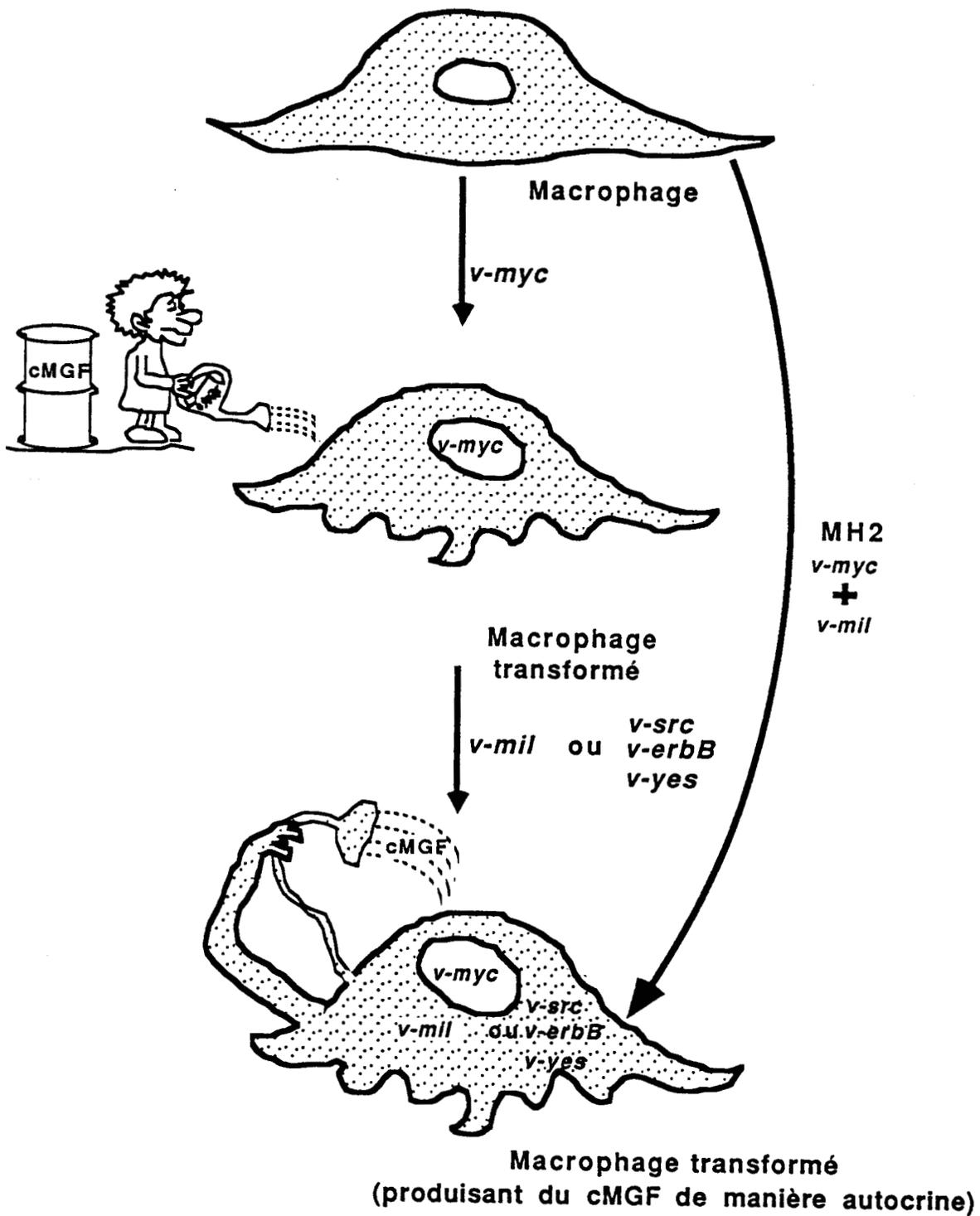


figure 28: Système macrophages.  
(schéma)

## 1) LES MACROPHAGES.

### a) Le système.

Des cellules myéloïdes de poulet transformées par l'oncogène *v-myc* exigent pour proliférer *in vitro* la présence d'un facteur de croissance : le cMGF (chicken Myelomonocytic Growth Factor). Cette dépendance disparaît si les cellules transformées sont surinfectées par un rétrovirus qui contient un oncogène de la famille des protéine-kinases dont le représentant est *v-src* (*v-erbB*, *v-yes*, *v-src*) (Adkins *et al.*, 1984) (figure 28). Dans cette situation, un facteur similaire (biologiquement et immunologiquement) au cMGF est relargué dans le milieu et utilisé de façon autocrine. Le milieu conditionné de telles cultures est d'ailleurs capable d'induire la prolifération, sans addition exogène de cMGF, de cellules transformées seulement par *v-myc*.

Le rétrovirus MH2 est capable de transformer des macrophages de poulet *in vitro* et de les faire proliférer en absence de cMGF (figure 28). Les mutants de délétion n'exprimant que l'un ou l'autre des 2 oncogènes de MH2 ont permis de démontrer que *v-myc* transforme les macrophages alors que *v-mil*, qui a été classé par homologie de séquence dans la famille *src* (Galibert *et al.*, 1984), est l'inducteur de l'indépendance vis à vis du cMGF (Graf *et al.*, 1986 ; Weizsaeker *et al.*, 1986). Il faut noter toutefois que *v-mil* seul est incapable de faire proliférer ce type de cellules et qu'il faut que les cellules soient transformées par *v-myc* pour que *v-mil* puisse jouer son rôle.

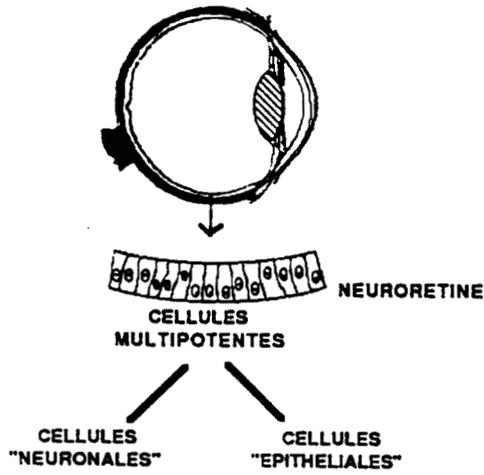
Nous avons donc, avec les macrophages, un modèle biologique *in vitro* où la présence à la fois de *v-mil* et de *v-myc* au sein d'un même rétrovirus "se justifie" puisqu'il montre une coopération entre deux oncogènes dans l'établissement d'un système autocrine de croissance de cellules de type myéloïde, système dans lequel *v-myc* stimule la transformation cellulaire tandis que *v-mil* induit la production de facteur(s) de croissance(s) (en l'occurrence le cMGF).

### b) Le cMGF.

Le cMGF est un facteur de croissance hématopoïétique qui stimule la prolifération de cellules de type myéloïde transformées par *v-myc* (ou par *v-myb*) et de cellules myéloïdes normales mais pas celle de cellules de type érythroblastique ou fibroblastique (Beug *et al.*, 1982). Après purification, le cMGF apparaît dans des conditions réductrices (*ie* en présence de  $\beta$  mercapto-éthanol) sous la forme d'une protéine de 25 kd ou de 29 kd (respectivement en présence ou en absence d'inhibiteur de la glycosylation : tunicamycine) et dans des conditions non dénaturantes sous la forme d'une protéine de 23 kd ou de 27 kd (en présence ou en absence de tunicamycine) (Leutz *et al.*, 1984).

Le cMGF est donc composé d'une seule chaîne peptidique glycosylée présentant une structure compacte due à la présence de ponts disulfures.

œil d'embryon de poulet de 7 jours



courbes de croissance

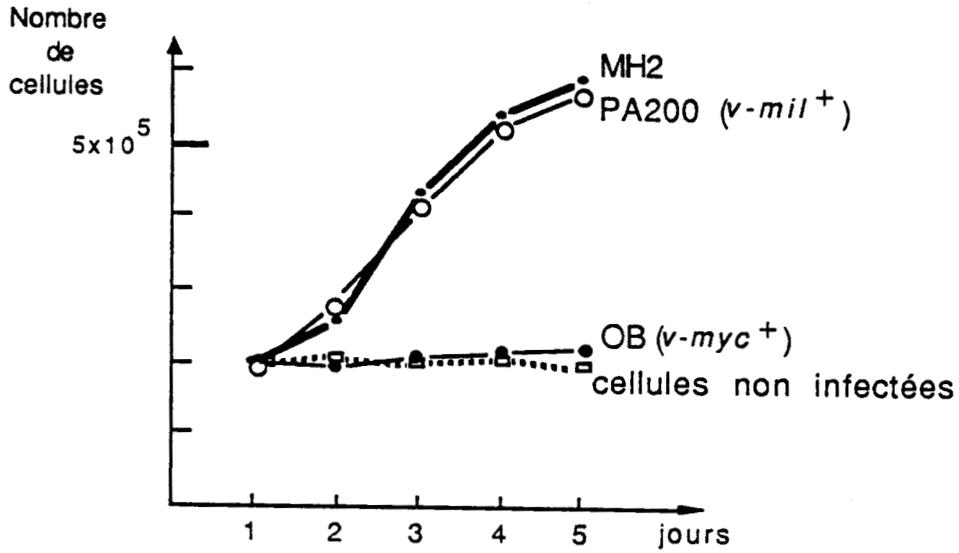


tableau récapitulatif

	FEP Transformation	CNR	
		Prolifé- ration	Transfor- mation
MH2 wt	+	+	+
<i>myc</i> <sup>+</sup> mutants MH2 C116 MH2 OB	+	-	-
<i>mil</i> <sup>+</sup> mutants MH2 PA200 MH2 LI200	-	+	-

figure 29: Système neurorétines.

## 2) LES NEURORETINES.

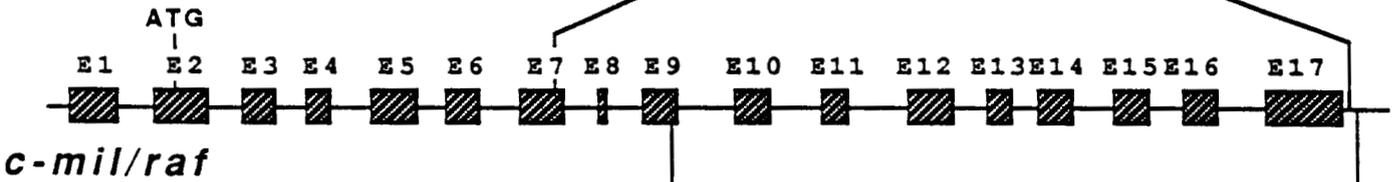
Le système de neurorétines (NR) mis au point par Georges Calothy à Paris (pour le rétrovirus MH2 ; Béchade *et al.*, 1985) est constitué de cellules prélevées dans l'oeil d'un embryon de caille (QNR : quail embryo neuroretina cells) ou de poulet (CNR : chicken embryo neuroretina cells) âgé de 7 jours (figure 29). Il s'agit essentiellement de cellules gliales et neuronales qui, à ce stade de développement embryonnaire, sont quasiment quiescentes : cultivées en BEM (Basal Eagle Medium) complété avec 5 % de sérum de veau foetal, elles ne sont plus capables que de 1 à 3 divisions *in vitro* (figure 29).

Suite à une infection par MH2, les NR se mettent à proliférer et sont même transformées selon certains critères (formation de colonies en agar semi-solide). Des virus mutants de délétion, (obtenus par biologie moléculaire *in vitro* ou spontanément *in vivo*), n'exprimant que l'un ou l'autre des oncogènes de MH2, ont été utilisés afin de déterminer l'implication de chacun des deux oncogènes dans la prolifération et la transformation. Les résultats résumés sur le tableau de la figure 29 montrent que l'expression de *v-mil* est nécessaire et suffisante pour faire proliférer les NR sans toutefois les transformer alors que *v-myc* seul n'est capable d'induire ni la transformation ni la prolifération (dans les conditions de culture décrites ci-dessus). Cependant, dans une expérience de reconstitution, *v-myc* peut par surinfection transformer les NR lorsqu'elles sont au préalable induites à proliférer par *v-mil*.

Nous disposons donc, avec les NR, un second système biologique mettant en évidence une coopération entre *v-mil* et *v-myc*. Il est intéressant de noter qu'une fois encore (comme pour les macrophages), *v-myc* est impliqué dans la transformation et *v-mil* dans la prolifération. Cependant, la chronologie des événements semble différente : dans le système macrophage, il faut que les cellules soient transformées par *v-myc* pour qu'on puisse observer l'action de *v-mil* tandis que dans le système NR, présenté ici, il faut apparemment que les cellules soient induites à proliférer sous l'effet de *v-mil* pour qu'on puisse observer la transformation par *v-myc*. Des études sont en cours dans l'équipe de Georges Calothy afin de savoir si le mécanisme d'induction de la prolifération des NR par *v-mil* est comparable à celui que cet oncogène utilise dans le système macrophage, c'est à dire la production d'un facteur de croissance particulier.

Toutes les considérations sur les propriétés biologiques de MH2 sur le système NR que nous venons de voir dans ce paragraphe ne sont valables que dans les conditions de culture décrites ci-dessus (ie BEM contenant 5 % de sérum de veau foetal). En effet, dans d'autres conditions, un groupe de chercheurs italiens (Casalbore *et al.*, 1987) montre que l'oncogène *v-myc* seul peut transformer des NR de poulet. Dans leurs expériences les boîtes de culture sont pré-traitées au collagène et les cellules sont mises dans un milieu plus riche : DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) contenant 10 % de sérum de veau foetal, 1 % de sérum de poulet et 10 % de bactotryptose. Au premier abord, les conclusions de Casalbore *et al.* semblent en contradiction avec les résultats qui ont été obtenus par Béchade *et al.* Cette différence peut cependant s'expliquer si on imagine que dans les conditions de culture utilisées par l'équipe italienne, le milieu étant plus "riche" il contient peut-être des facteurs (de croissance ?) que l'expression de *v-mil* induit dans les conditions de culture de l'équipe française.

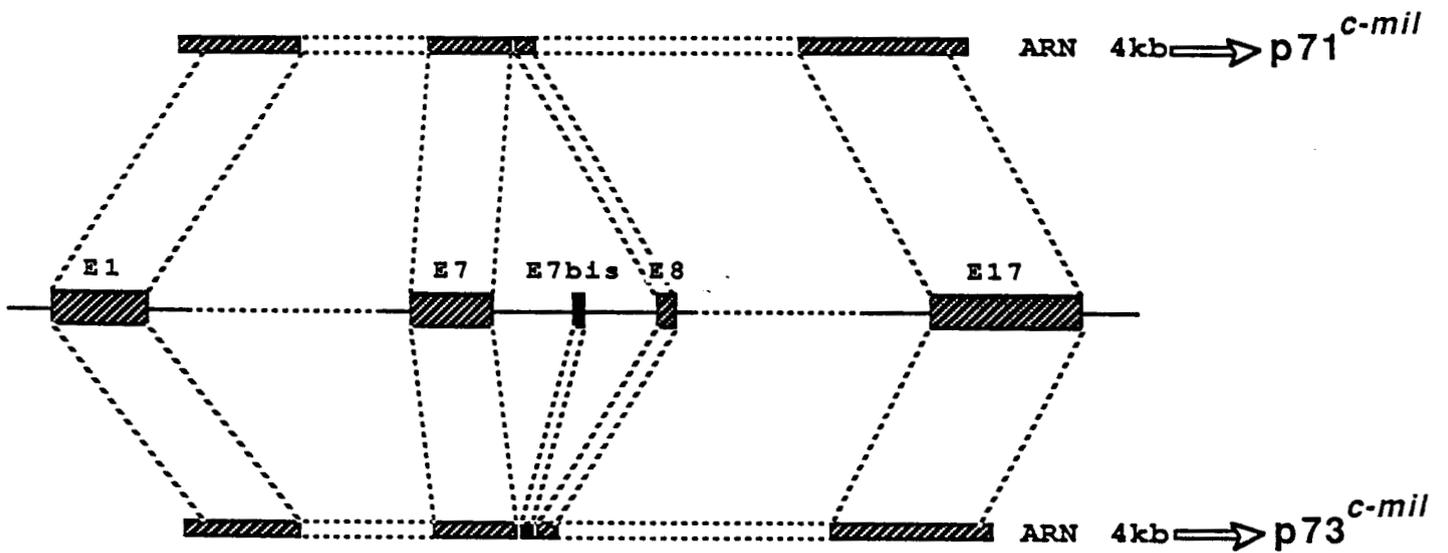
Provirus  
MH2



Provirus  
MSV 3611



**A:** Organisation génomique de *c-mil/raf*.



**B:** Transcription de *c-mil*: mise en évidence d'un épissage alternatif.

figure 30

### 3) LES FIBROBLASTES.

*v-myc* est capable de transformer *in vitro* des fibroblastes embryonnaires de poulet (clonage en agar mou). Pour connaître les propriétés de *v-mil*, il fallait disposer d'un mutant de MH2 n'exprimant pas *v-myc*. Ceci est le cas du virus PA 200 qui est un mutant de délétion du gène *myc*. Ce mutant a été obtenu spontanément sur NR et n'exprime que *v-mil*. C'est précisément ce virus qu'ont utilisé Palmieri et Vogel (1987) pour étudier l'action de *v-mil* sur les fibroblastes.

Des fibroblastes embryonnaires de poulet infectés par PA 200 présentent une morphologie altérée (les cellules sont plus réfringentes que des cellules normales et, n'ayant plus d'inhibition de contact, elles se chevauchent). Cette altération s'explique par une désorganisation des câbles d'actine et une diminution de la quantité de fibronectine à la surface des cellules. Ces dernières sont capables de pousser avec de faible quantité de sérum, néanmoins elles sont quasiment incapables de cloner en agar mou.

Ces résultats ont été récemment confirmés par Béchade *et al.* (1988) dont les conclusions sont cependant plus modérées sur le pouvoir transformant de l'oncogène *v-mil* que Palmieri *et al.*. En effet, les fibroblastes infectés par le virus PA200 présentent bien une désorganisation des câbles d'actines mais qui est beaucoup moins marquée que lorsque les cellules sont infectées par MH2 où la désorganisation est totale. Les auteurs en concluent que le pouvoir transformant de *v-mil* est limité et que le principal gène de transformation dans MH2 est *v-myc*.

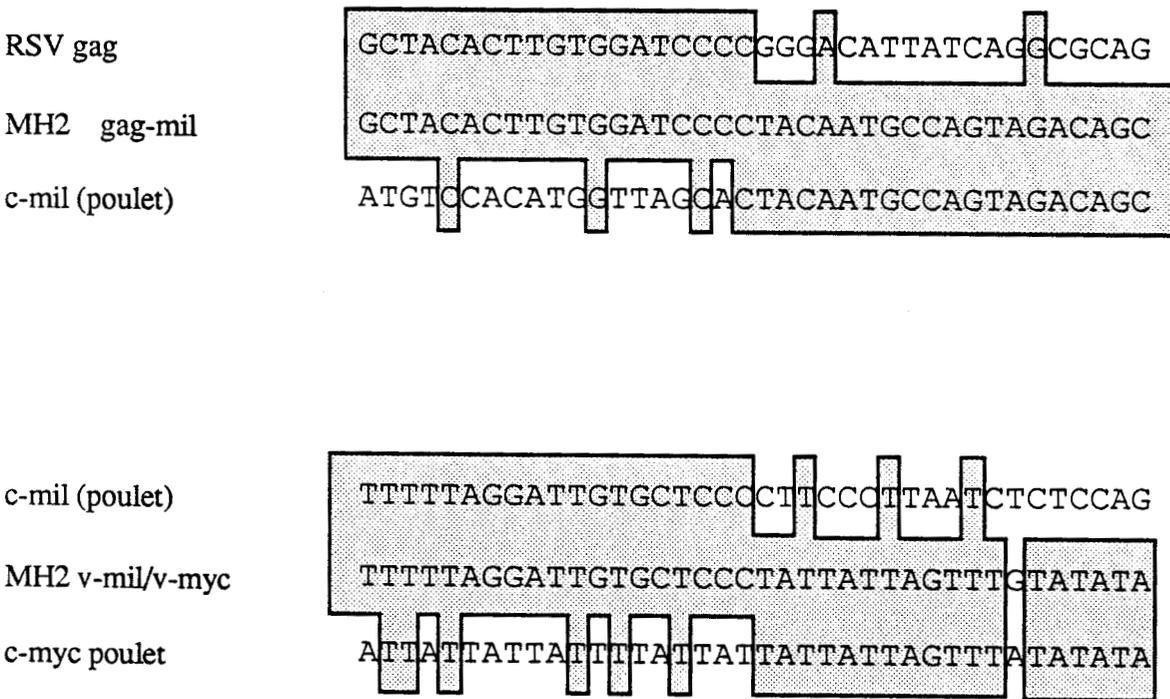
*v-mil* se distingue donc de son homologue murin, *v-raf*, qui est capable de transformer des fibroblastes de souris (transformation morphologique et clonage en milieu semi-solide) et dont nous parlerons dans un paragraphe ultérieur

### C- ORGANISATION GENOMIQUE DE L'EQUIVALENT CELLULAIRE DE *v-mil* : *c-mil*.

Le génome de l'équivalent cellulaire de *v-mil* (*c-mil*) est organisé en 17 exons (figure 30A). Le gène *c-mil* est exprimé (chez le poulet) à partir d'un ARN de 4 kb que l'on retrouve dans la plupart des tissus. Les régions homologues à la séquence de *v-mil* sont réparties sur 14 kbp et correspondent aux 11 derniers exons de *c-mil* (E7 à E17: domaine carboxyterminal).

En 1983, plusieurs groupes (Kan *et al.*, 1984a, 1984b ; Jansen *et al.*, 1984 ; Suttrave *et al.*, 1984) ont montré que *v-mil* était l'équivalent chez le poulet d'un oncogène qui avait été isolé dans un virus de souris (3611 MSV) : *v-raf*. L'organisation génomique complète (structure exons/introns) de *c-raf* à la fois chez l'homme et chez la souris présente une configuration exonique semblable à celle du poulet (Bonner *et al.*, 1985; Jansen et Bister, 1985).

Deux ADNc hybridant avec *v-mil* ont été isolés au laboratoire (Dozier *et al.*, 1988). L'un d'eux est colinéaire à *v-mil* et hybride avec l'ARN de 4 kb décrit chez le poulet. L'autre ADNc présente une insertion d'un exon supplémentaire de 60 bp entre ce qui correspond aux exons 7 et 8 sur la figure 30B. Cet ADNc hybride avec un ARN de 4 kb également. Ceci explique qu'une seule



**figure 31:** Sites de recombinaisons impliqués dans la transduction de *c-mil* au sein de MH2.

espèce d'ARN ait été décrite jusqu'alors sans que l'on puisse soupçonner l'existence d'un mécanisme d'épissage alternatif pour l'expression du gène *c-mil*. Grâce à une sonde radioactive de ces 60 bp nous avons constaté que cet exon est phylogénétiquement conservé chez la caille, le rat ou l'homme. Les deux ADNc mis sous contrôle d'un promoteur fort de transcription et de traduction (pSV2 : Knopf *et al.*, 1986) dirigent la synthèse de 2 protéines de respectivement 71 et 73 kd (Dozier *et al.*, 1988). De la comparaison de la séquence du peptide supplémentaire (20 AA) avec différentes banques de données (Genbank, EMBL) ne ressort aucune homologie avec des protéines connues.

Le mécanisme d'épissage alternatif avait déjà été décrit pour des gènes tels que la calcitonine (Amara *et al.*, 1982) mais aussi pour les équivalents cellulaires des oncogènes *abl* (Shtivelman *et al.*, 1986), *Ki-ras* (Shimizu *et al.*, 1983b) et *src* (Martinez *et al.*, 1987 ; Wang *et al.*, 1987).

#### D- HYPOTHESES SUR LA GENESE DE MH2.

La séquence nucléotidique de *c-mil* a permis l'étude des sites de recombinaison impliqués dans la transduction de *c-mil* au sein du rétrovirus MH2. La comparaison de la séquence de *gag* et de *c-mil* entourant le point de jonction  $\Delta gag-mil$  ne montre aucune homologie significative (figure 31). Ceci rend peu probable l'hypothèse que la transduction de *mil* dans le virus MH2 soit le résultat d'une recombinaison légitime comme cela avait été observée dans certains cas de transduction d'oncogène comme *fos* dans le virus FBJ-MuSV (Van Beveren *et al.*, 1983) ou *myc* dans le virus CMII (Walther *et al.*, 1985). De même, aucune homologie entre les gènes *c-mil* et *c-myc* n'a été mise en évidence au point de recombinaison *v-mil/v-myc* (figure 31).

Le fait que *v-mil* et *v-myc* soient directement adjacents dans le génome de MH2 (qu'il n'y ait donc pas de séquence virale entre les 2 gènes) suggère que l'un des 2 oncogènes est venu "s'encastrier" dans l'information génétique de l'autre. Ceci aurait pu se passer, par exemple, au cours d'une translocation chromosomique qui se serait peut-être même produite dans la tumeur à partir de laquelle MH2 a été isolé. Une autre hypothèse pourrait être qu'il s'agit en fait de 2 événements successifs et indépendants. Dans ce cas, on pourrait imaginer qu'un rétrovirus contenant déjà l'un des deux oncogènes ait dérobé à la cellule (par un mécanisme de recombinaison illégitime) le deuxième oncogène, ou alors, imaginer qu'il y ait recombinaison entre deux rétrovirus possédant chacun un des protagonistes.

#### E- PROTEINES *mil* VIRALE ET CELLULAIRES.

La protéine virale *mil* est une protéine de fusion de 100 kd : la P100<sup>gag-mil</sup> qui, par immunofluorescence, a été localisée dans le cytoplasme. Une des propriétés biochimiques de cette protéine est d'être capable de se lier *in vitro* à de l'ADN ou à de l'ARN (Bunte *et al.*, 1983). La séquence, réalisée en 1983 par F.Galibert, révèle que *v-mil* possède des homologies avec la famille des protéine-kinases dont le représentant est *src* (figure 32). En particulier, après la séquence

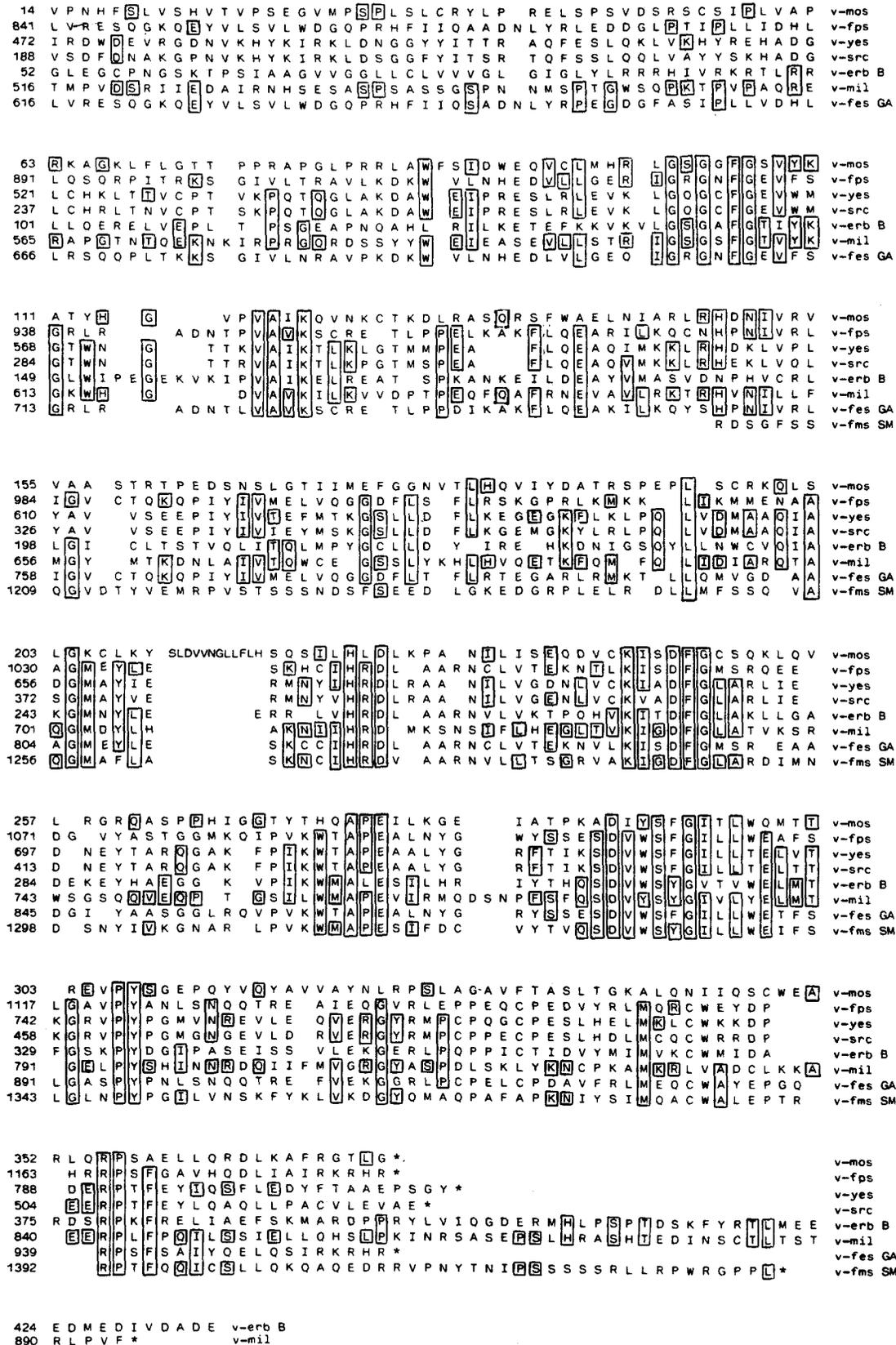


Figure 32 : Comparaison de la séquence peptidique de la protéine mil avec celles de protéine-kinases oncogènes.

consensus [Gly X Gly X X Gly], se trouve un résidu lysine en position 622 qui est équivalent au résidu lysine 295 de la tyrosine-kinase *src* (figure 32). Alors que la plupart des oncogènes de la famille *src* (excepté *mos* : Kloetzer *et al.*, 1983; 1984) sont associés à une activité tyrosine-kinase *in vitro*, la phosphorylation de la protéine *v-mil in vitro* (Sutrave *et al.*, 1984 ; Moelling *et al.*, 1984) ainsi qu'*in vivo* (Ramsay *et al.*, 1982) se fait sur des résidus sérine et thréonine.

Assez peu d'informations sont connues sur les protéines cellulaires *mil*. Par immunoprécipitation avec un anticorps monoclonal dirigé contre la partie carboxyterminale de *v-raf* (homologue murin de *v-mil*) un doublet de protéines de 71 et 73 kd a été décrit (Patchinsky *et al.*, 1986). *In vivo*, ce doublet est capable d'incorporer du phosphate radioactif et sur la base de cette observation Patchinsky a émis l'hypothèse que le doublet de protéines peut représenter divers degré de phosphorylation de la même protéine. Nous avons des raisons de penser que cette différence de taille peut s'expliquer avec les 2 ADNc (résultant d'un épissage alternatif du gène *c-mil*) que nous avons mis en évidence au laboratoire (Dozier *et al.*, 1988).

La séquence complète d'un ADNc *mil* de poulet est maintenant disponible (Koenen *et al.*, 1988). En se basant sur des comparaisons de séquences avec la séquence d'autres protéines on peut distinguer deux domaines dans la protéine *c-mil* : un domaine carboxyterminal qui contient le domaine kinase et qui correspond en fait à l'information génétique prise par MH2 (*v-mil*) et dans la partie aminoterminal de *c-mil*, un domaine qui contient une séquence riche en cystéines [Cys X<sub>2</sub> Cys X<sub>9</sub> Cys X<sub>2</sub> Cys X<sub>7</sub> Cys X<sub>7</sub> Cys] présentant une très forte similitude avec une région répétée deux fois dans la PKC [Cys X<sub>2</sub> Cys X<sub>13</sub> Cys X<sub>2</sub> Cys X<sub>7</sub> Cys X<sub>7</sub> Cys] (Parker *et al.*, 1986 ; Coussens *et al.*, 1986 ; Knopf *et al.*, 1986 ; Ohno *et al.*, 1987). De telles séquences, riches en cystéine, ont été trouvées dans des protéines qui peuvent attacher un ion métallique, ce sont en général des protéines qui interagissent avec l'ADN *via* la formation d'une "structure en doigt". Les plus connues sont le facteur de transcription III A, les récepteurs d'hormones stéroïdes ou thyroïdiennes et des protéines qui se lient à l'ADN (Miller *et al.*, 1985 ; Weinberger *et al.*, 1985, 1987 ; Greene *et al.*, 1986 ; Berg, 1986 ; Sap *et al.*, 1986 ; Mc Donnell *et al.*, 1987).

Les protéines cellulaires *mil* seraient-elles des protéines nucléaires ? Ce n'est pas évident car des résultats préliminaires obtenus au laboratoire sont en faveur d'une localisation cytoplasmique. On peut cependant essayer de comprendre pourquoi une protéine qui serait cytoplasmique posséderait une telle séquence (qui est apparemment la signature de protéines nucléaires) en prenant l'exemple de la PKC qui est une enzyme un peu plus connue. La PKC a été décrite essentiellement dans le cytoplasme ; toutefois elle a déjà été vue nucléaire dans des cellules du cerveau (Wood *et al.*, 1986). Une première hypothèse sur le rôle de la région cystéine peut donc suivre le modèle classique, c'est à dire lier la protéine à l'ADN lorsqu'elle est dans le noyau. Une autre explication, qui n'exclut pas la première, pourrait être que cette région, riche en cystéine, a un rôle à jouer en dehors du noyau, par exemple dans la fixation de l'ion divalent calcium (Ca<sup>++</sup>) qui est indispensable à la PKC pour s'associer à la membrane cytoplasmique et être active. Une dernière possibilité est que cette région possède tout simplement un rôle structural dans la protéine qui pourrait être un vestige du rôle qu'elle pouvait avoir dans des organismes peu évolués, sans compartimentation cellulaire, dans lesquels les protéines étaient multifonctionnelles, tantôt

## A- REGION AMINOTERMINALE

c-mil poulet	1----61	LPNKQRTVVNVRNGMTLHNCLMKALKVVRGLQPECCA	98
c-raf humain	1----61	LPNKQRTVVNVRNGMSLHDCLMKALKVVRGLQPECCA	98
c-raf rat	1----61	LPNKQRTVVNVRNGMSLHDCLMKALKVVRGLQPECCA	98
D-raf drosophile	1-----73	LPNQRTISVEMISGVRLCDALMKALKLRQITPDDMC	109
A-raf humain	1--24	LPNKQRTVVTVRFDGMSVYDSLQKALKVVRGLNQDCCV	61
A-raf rat	1--24	LPNKQRTVVTVRFDGMSVYDSLQKALKVVRGLNQDCCV	61
A-raf souris	.....		
pks humain	.....		

## B- REGION RICHE EN CYSTEINES

c-mil poulet	151	CDICQKFLNNGFRCCQTCGTFKFEHCSTKVPTMC	185
c-raf humain	151	CDICQKFLNNGFRCCQTCGTLFHEHCSTKVPTMC	185
c-raf rat	151	CDICQKFLNNGFRCCQTCGYKFHEHCSTKVPTMC	185
D-raf drosophile	162	CEGCRLLFTGFYCSQCNRFRHQRCANRVPMLC	196
A-raf humain	111	CDFCLKFLFHGFRCCQTCGYKFHQHCSSKVPTVC	145
A-raf rat	111	CDFCLKFLFHGFRCCQTCGYKFHQHCSSKVPTVC	145
A-raf souris	.....		
pks humain	.....		

## C- DOMAINE CATALYTIQUE

c-mil poulet	354	IGSGSEFGT-12AA-K-90AA-HRDML-14AA-GDFGL-22AA-MAPEV-...	647
c-raf humain	354	IGSGSEFGT-12AA-K-90AA-HRDML-14AA-GDFGL-22AA-MAPEV-...	648
c-raf rat	354	IGSGSEFGT-12AA-K-90AA-HRDMK-14AA-GDFGL-22AA-MAPEV-...	648
D-raf drosophile	361	IGSGSEFGT-12AA-K-90AA-HRDLK-14AA-GDFGL-22AA-MAPEV-...	666
A-raf humain	315	IGIGSEFGT-12AA-K-90AA-HRDLK-14AA-GDFGL-22AA-MAEEV-...	606
A-raf rat	313	IGIGSEFGT-12AA-K-90AA-HRDLK-14AA-GDFGL-22AA-MAEEV-...	604
A-raf souris	...	IGIGSEFGT-12AA-K-90AA-HRDLK-14AA-GDFGL-22AA-MAEEV-...	
pks humain	...	IGIGSEFGT-12AA-K-90AA-HRDLK-14AA-GDFGL-22AA-MAEEV-...	

GXGXG
K
RDI
DFG
APE

figure 33 : Famille des gènes *raf*.

associées aux membranes cytoplasmiques pour une fonction X (kinase, par exemple), tantôt liées à l'ADN pour une fonction Y (régulateur de transcription, par exemple).

### **F- *raf* : HOMOLOGUE MURIN DE *mil*.**

#### 1) 3611 MSV.

3611 MSV est un rétrovirus murin qui transforme les fibroblastes embryonnaires et les cellules épithéliales de souris *in vitro* (Rapp *et al.*, 1983). *In vivo*, il induit des fibrosarcomes avec une efficacité de 100 % en moins de 4 semaines après infection. 3611 MSV a transduit dans son génome l'oncogène *v-raf* (version tronquée en 5' de son homologue cellulaire *c-raf* : figure 30A) dont l'expression se concrétise sur un gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) sous la forme de 2 protéines: une P75*gag-raf* (myristylée, donc membranaire, mais non glycosylée) qui est associée à une activité sérine-thréonine-kinase *in vitro* (Moelling *et al.*, 1984) et une gp90*gag-raf* (glycosylée mais non myristylée) qui n'est sans doute pas indispensable pour la transformation puisqu'il n'est pas rare de la voir disparaître quelques temps après infection (Schultz *et al.*, 1985). Ces deux modifications post-traductionnelles (myristylation et glycosylation) correspondent à une maturation classique des protéines *gag* des rétrovirus murins et n'ont par conséquent rien de surprenant dans la mesure où *raf* est traduit sous la forme d'une protéine de fusion *gag-raf*. La myristylation a été proposée comme un important facteur dans la transformation par les protéines *gag-onc* des rétrovirus oncogènes mammifères (Schultz *et al.*, 1984) ainsi que pour le produit de traduction de l'oncogène *v-src* du rétrovirus aviaire RSV (Kamps *et al.*, 1985; 1986a) qui n'est plus transformant si la pp60<sup>v-src</sup> n'est plus myristylée donc plus membranaire.

#### 2) FAMILLE DES GENES *raf*.

Différents ADNc hybridant avec une sonde *v-raf* ont été isolés dans différentes espèces (homme, *A-RAF* : Beck *et al.*, 1986 ; *pks* : Mark *et al.*, 1986 ; rat, *A-raf* : Ishikawa *et al.*, 1987b ; souris, *A-raf* : Huleihel *et al.*, 1986 ; drosophile, *D-raf* : Mark *et al.*, 1987). C'est ainsi qu'on a découvert que *c-raf* était le représentant d'une famille de protéines possédant toutes un domaine carboxyterminal (domaine catalytique : figure 33C) quasiment identique.

Les gènes de la famille *raf* se répartissent en deux classes : celle des gènes *A-raf* et celle des gènes *c-raf*. Les protéines, correspondant à ces différents gènes, diffèrent essentiellement dans leur domaine aminoterminal mais possèdent des séquences conservées dans leur domaine carboxyterminal. Toutefois, elles possèdent une séquence très semblable d'une trentaine d'acides-aminés du côté aminoterminal des molécules (figure 33A) à environ 50 AA en aval d'une région présentant un motif particulier de cystéines également très conservée (figure 33B).

ESPECE	NOM DU GENE	CHROMOSOME	ARN	REMARQUES
HOMME	c-raf 1	3		protéine 648 AA Bonner et al., 1983
	c-raf 2	4		se trouve au voisinage du gène responsable de laChorée de Hutington - pseudogène
	pks	X	2, 7 kb	
	pks-related	7		
	A-raf 1	X	2, 6 kb	protéine 606 AA Huebner et a., 1983
	A-raf 2	?		pseudogène
RAT	c-raf 1	?		protéine 648 AA
	A-raf	?	2, 3 kb	protéine 604 AA
SOURIS	c-raf 1	6	3, 1 kb	Kozak et al., 1984
	A-raf 1	X	2, 4 kb	Huebner et al., 1986
	A-raf 2	7		pseudogène
DROSOPHILE	D-raf 1	X	3, 2 kb	protéine 656 AA Mark et al., 1987
	D-raf 2	2		pseudogène Mark et al., 1987

figure 34: Localisations chromosomiques des gènes de la famille *raf*.

### 3) LOCALISATIONS CHROMOSOMIQUES.

La localisation chromosomique des gènes et des pseudogènes de la famille *raf* est résumée sur la figure 34. Signalons que chez la souris il n'y a pas de pseudogène *c-raf 2* ce qui situe donc son apparition après la divergence phylogénétique entre les rongeurs et les primates. Chez l'homme *c-raf 2* se trouve sur le chromosome 4 au voisinage avec le locus du gène impliqué dans la Chorée de Huntington.

Connaissant la structure du gène *c-mil (c-raf)* ainsi que les différents membres de la famille, il est maintenant possible d'étudier quels peuvent être les modes d'activation du gène *mil (raf)*.

## G - MODES D'ACTIVATION DES GENES *mil/raf*

### 1) LTR ACTIVATION

Chez le poulet, les exons 10 à 17 du gène cellulaire *mil* ont été placés sous le contrôle des LTR de MH2 (figure 35 ; Dozier *et al.*, 1987). Cette construction dirige la synthèse d'une protéine de 35 kd qui contient tout le domaine kinase et dont l'expression permet la prolifération des NR alors que dans les mêmes conditions (mise sous contrôle de LTR) aucun des 2 ADNc *mil* isolés au laboratoire n'est capable d'induire la prolifération des NR (C.Dozier, communication personnelle). Ces résultats suggèrent d'une part, que le domaine aminoterminal de *c-mil* doit être supprimé pour que le gène soit actif et d'autre part, que les séquences *gag* présentes dans la P100*gag-mil* ne sont pas nécessaires pour les propriétés biologiques associées à *v-mil*, dans le système NR tout au moins. Le même genre d'observations avait été faite chez certaines protéines de fusion *gag-onc* pour lesquelles l'amputation des séquences *gag* n'altère pas leurs propriétés transformantes (*v-fps* : Foster et Hanafusa, 1983 ; *v-myc* : Shaws *et al.*, 1985 ; *v-fms* : Wheeler *et al.*, 1986).

Chez la souris, plusieurs clones de cellules NIH 3T3 transformées ont été obtenus par cotransfection d'ADN de NIH3T3 avec l'ADN de LTR de MoMuLV (Moloney Leukemia Virus) (Müller et Müller, 1984 ; Mölders *et al.*, 1985). Dans un de ces clones les auteurs se sont aperçus qu'au cours de la transfection un LTR s'était intégré entre les exons 5 et 6 du gène cellulaire *raf* (figure 35) prenant ainsi le contrôle des exons 6 à 17 et dirigeant la synthèse d'une protéine *mil* tronquée d'environ 45 kd.

Le gène *A-RAF* (humain) qui correspond en quelque sorte à une version tronquée de *c-raf* contenant le domaine kinase avec en 5' une séquence différente a été placé sous le contrôle de LTR (Beck *et al.*, 1987). Cette construction est capable de transformer les fibroblastes embryonnaires de souris alors que le ADNc complet de *c-raf* mis sous contrôle de LTR en est incapable (Ishikawa *et al.*, 1987a).

MÖLDERS et al., 1985

MÜLLER et al., 1984

activation par PROMOTION INSERTION

Transfection de LTR de MoMULV :

expression d'une protéine *c-raf* tronquée de 45kd

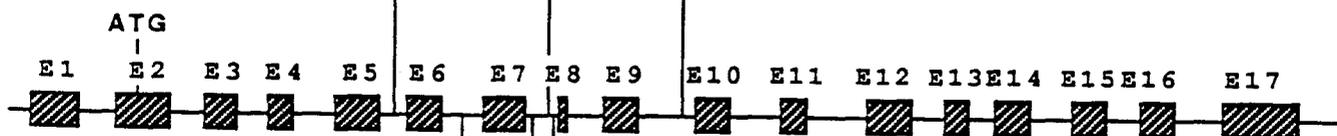
FUKUI et al., 1985;1987

transfection d'ADN de glioblastome  
humain sur NIH3T3

(activation au cours de la transfection)

DOZIER et al., 1987

EX10 à EX17 mis sous le  
contrôle des LTR de MH2



ISHIKAWA et al., 1986;1987

transfection d'ADN d'un carcinome du  
foie (rat) sur NIH3T3

(activation au cours de la transfection)

STANTON et al., 1987

transfection d'ADN de tumeurs

humaines sur NIH3T3 : Carcinome du sein

Carcinoïde du poumon

Carcinome du rein

SHIMIZU et al., 1985

transfection d'ADN d'un cancer de

l'estomac humain sur NIH3T3

figure 35: Activation du gène *c-mil/RAF*.

## 2) ACTIVATION AU COURS DU TEST NIH3T3

Différents ADN de tumeurs (humaines et de rat) ont été transfectés sur NIH3T3 afin de rechercher des oncogènes activés. Dans ce paragraphe, nous allons décrire 6 cas d'activation où l'oncogène qui a été caractérisé est *raf*. Cependant il faut noter que dans ces 6 cas, l'activation a eu lieu pendant la transfection ; par conséquent, le locus *raf* n'est pas modifié dans les tumeurs d'origine.

Ishikawa (1986 ; 1987a) a montré, au cours d'une transfection d'ADN de carcinome du foie de rat, un réarrangement de *c-raf* (de rat) dans l'intron entre les exons 7 et 8 (figure 35) en 5' desquels est venue se greffer une séquence inconnue de rat.

Des transfections d'ADN de tumeurs humaines cette fois, d'un carcinome du sein, d'un carcinoïde du poumon, d'un carcinome du rein (Stanton et Cooper, 1987) et d'un glioblastome (Fukui *et al.*, 1985 ; 1987) montrent également le même modèle d'activation, c'est à dire, réarrangement dans l'intron situé entre les exons 7 et 8 (figure 35), avec en 5' la présence d'une séquence d'origine humaine.

Une dernière description est celle de la transfection d'ADN d'un cancer primaire de l'estomac (humain) (Shimizu *et al.*, 1985) qui donne également une activation du *c-RAF* (humain) avec réarrangement, mais autour des exons 6 ou 7 (cf figure 35).

## 3) MODELE

En résumé, nous avons vu qu'il n'existe, à l'heure actuelle, aucune description d'activation de *c-raf* sans réarrangement en 5', la présence d'une séquence en 5' n'étant d'ailleurs pas indispensable (Mölder *et al.*, 1985 ; Dozier *et al.*, 1987). Tout porte donc à croire que le domaine aminoterminal de *c-mil* a un rôle de régulation qu'il faut éliminer pour que le gène soit activé.

## H - IMPLICATION DU LOCUS *RAF* DANS DES CANCERS HUMAINS

Chez l'homme, le gène cellulaire *RAF* se trouve sur le chromosome 3 (3p25). Son locus a été impliqué dans une tumeur mixte de la parotide dans laquelle a été repérée une translocation t(3;8) (p25;q21). En 1985, Drabkin décrivit un carcinome du rein apparemment héréditaire dans une famille dont l'étude du caryotype révèle une translocation du gène *myc* (chromosome 8) sur le chromosome 3.

Une autre description de carcinome de rein, retrouvé sur 3 générations, avec une translocation cette fois (3:11) a été faite par Pathak en 1982. Curieusement, cette fois-ci, la translocation n'existait que dans la tumeur. Ceci fût un peu moins surprenant à la lumière du signalement d'un site fragile en 3p14, inductible par des agents chimiques.

Enfin, des carcinomes du poumon à petites cellules (SCLC) ont été associés de manière

caractéristique avec une délétion de la région (3p14--->3p23) (Whang Peng *et al.*, 1982).

Il apparait donc que des altérations du petit bras du chromosome 3 semblent critiques pour le développement de carcinomes de rein ou de SCLC. Peut-être avons nous là les prémices d'un diagnostic précoce (tout au moins pour les familles à risque). Cette recherche de diagnostic est d'autant plus importante que l'on sait pertinemment que les chances de guérison sont étroitement liées à la précocité du dépistage. En fait, des expériences récentes suggèrent que ce ne sont probablement pas des altérations du gène *RAF* lui-même qui seraient responsables des cancers décrits ci-dessus mais l'élimination, par réarrangement chromosomique, d'un gène suppresseur se trouvant dans le voisinage très proche du locus *RAF* (Seizinger *et al.*, 1988).

# RESULTATS

## PRESENTATION du TRAVAIL.

Mon travail a essentiellement porté sur l'oncogène *v-mil*. Cet oncogène a été mis en évidence au laboratoire (Coll *et al.*, 1983) ainsi que dans deux autres groupes (Jansen *et al.*, 1983 ; Kan *et al.*, 1983) au sein du génome du rétrovirus aviaire MH2. Thomas Graf à Heidelberg (Allemagne), Georges Calothy à Paris et leurs équipes respectives, ont élaboré des modèles de culture cellulaire *in vitro*, respectivement le système macrophage et le système neurorétine, que nous avons déjà évoqué au cours de l'introduction de ce mémoire. A la suite de collaborations avec notre laboratoire, nous pouvons maintenant associer l'expression de *v-mil* avec des propriétés biologiques particulières dans ces différents systèmes cellulaires. Ces propriétés sont respectivement :

- \* l'indépendance de manière autocrine, vis à vis du cMGF (chicken Myeloid Growth Factor), de macrophages transformés par *v-myc* (Graf *et al.*, 1986).

- \* la prolifération de cellules de neurorétines d'embryons de poulet de 7 jours, cellules normalement quiescentes à ce stade (Béchade *et al.*, 1985).

Francis Galibert et son groupe ont montré que la séquence de l'oncogène *v-mil* avait une homologie avec la famille des tyrosine-kinases (Galibert *et al.*, 1984). Plus tard, le groupe de Karin Moelling (1984) montrait que, *in vitro*, la P100gag-*mil* semblait bien être associée avec une activité kinase mais dont la spécificité se porte sur les résidus sérine et thréonine. *v-mil* venait alors rejoindre *v-mos* dans les exceptions : ce sont les deux seuls oncogènes décrits jusqu'ici pour lesquels la fonction kinase qui leur est associée n'est pas spécifique des résidus tyrosine mais des résidus sérine/thréonine.

Nous avons voulu répondre à la question : l'activité kinase de la P100gag-*mil*, observée par Moelling et al. *in vitro*, est-elle seulement associée à la protéine ou bien est-elle intrinsèque ? Et, si la propriété est intrinsèque, l'activité de cette protéine-kinase est-elle importante dans les propriétés biologiques qui sont associées à l'expression de l'oncogène *v-mil* ?

La description de ce travail comporte deux parties :

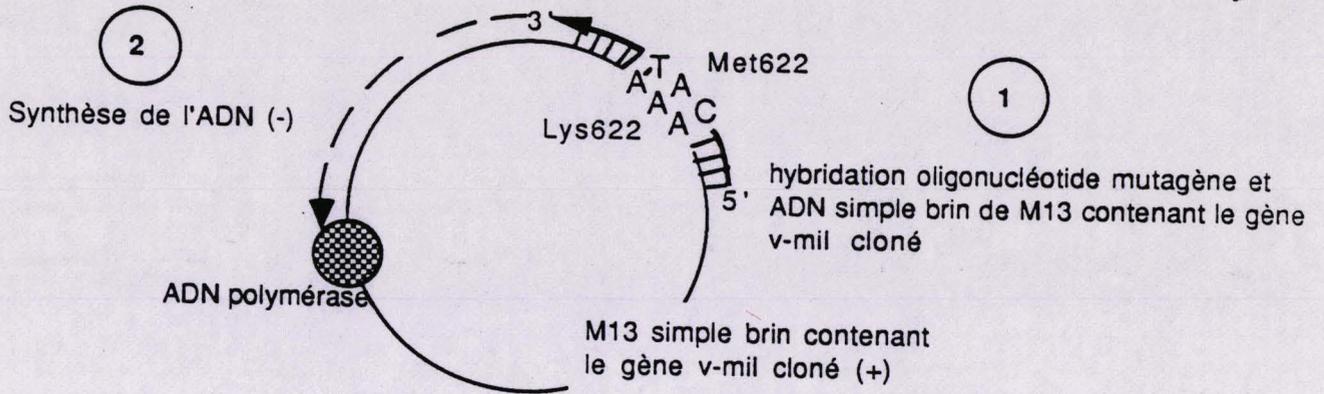
Dans la première partie, nous démontrons la nature intrinsèque de la fonction biochimique de la P100gag-*mil* : l'activité protéine-kinase. Nous démontrons également que cette activité kinase est indispensable aux propriétés biologiques qui sont classiquement associées à l'expression de l'oncogène *v-mil* : l'indépendance, vis à vis du cMGF, de macrophages transformés par *v-myc* et la prolifération de cellules de neurorétine.

Finalement, dans cette partie, nous mettrons en évidence que la phosphorylation de la

P100*gag-mil* *in vivo* ne résulte probablement pas d'une autophosphorylation mais de la phosphorylation par d'autres protéine-kinases cellulaires.

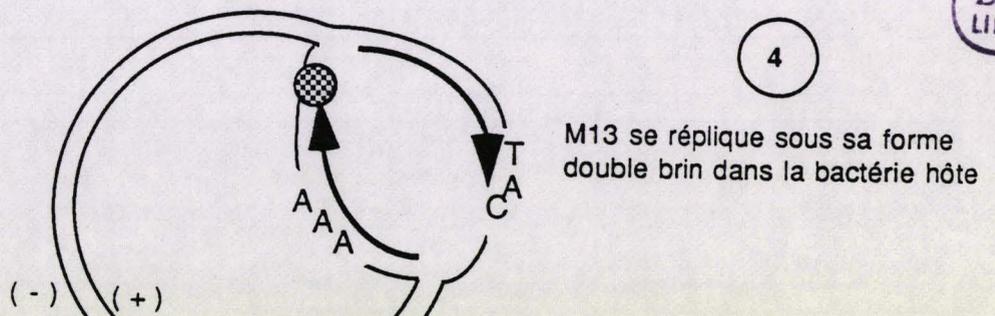
Dans la seconde partie, nous décrivons un mutant de MH2, MH2-Hd (Coll *et al.*, 1983), dont l'activité kinase du produit de traduction de son gène *v-mil*, la P100*gag-mil*, est considérablement diminuée. Pourtant, les propriétés biologiques associées à l'expression de *v-mil*, dans les systèmes macrophages et neurorétines, sont conservées. Ces résultats montrent qu'un haut taux d'activité kinase dans les cellules infectées par un virus MH2 n'est pas requis pour obtenir les effets biologiques associés à l'expression du gène *v-mil*.

Ce mutant, MH2-Hd, nous a permis de mettre en évidence, dans toutes les phosphotransférases, une région très conservée qui joue probablement un rôle dans la fixation de l'ATP (donneur de phosphate dans la réaction de phosphotransfert).



3

Transfection de la forme double brin



5

la bactérie peut produire deux types de M13 :

(-) (+)

Lys622

certains avec une lysine en position 622 dans v-mil,

(-) (+)

Met622

d'autres, avec une méthionine en position 622.

figure 36 A : Principe de la mutagenèse dirigée

I<sup>ère</sup> PARTIE.DEMONSTRATION DE LA NATURE INTRINSEQUE DE  
L'ACTIVITE KINASE DE LA P100gag-mil.ETUDE DE SON ROLE DANS LES PROPRIETES BIOLOGIQUES  
ASSOCIEES A L'EXPRESSION DE v-mil.

(Résumé de l'Article 1).

## INTRODUCTION

En 1983, la séquence nucléotidique de *v-mil*, réalisée en collaboration avec le groupe de Francis Galibert (Paris), révélait l'affiliation de ce gène à la famille des protéine-kinases. En particulier, en position 720 dans *v-mil* se trouve un résidu lysine équivalent au résidu lysine 295 de *v-src* connu pour être le site de fixation de l'ATP dans la protéine-kinase pp60<sup>v-src</sup> (figure 17) (Kamps *et al.*, 1984). Cette lysine 720 est précédée par la séquence consensus [Gly X Gly X X Gly] que l'on retrouve dans presque toutes les protéine-kinases connues.

En 1984, Karin Moelling et son groupe (Berlin) montraient que des préparations partiellement purifiées de P100gag-mil étaient associées à une (des) activité(s) kinase(s) spécifique(s) de résidus sérine/thréonine.

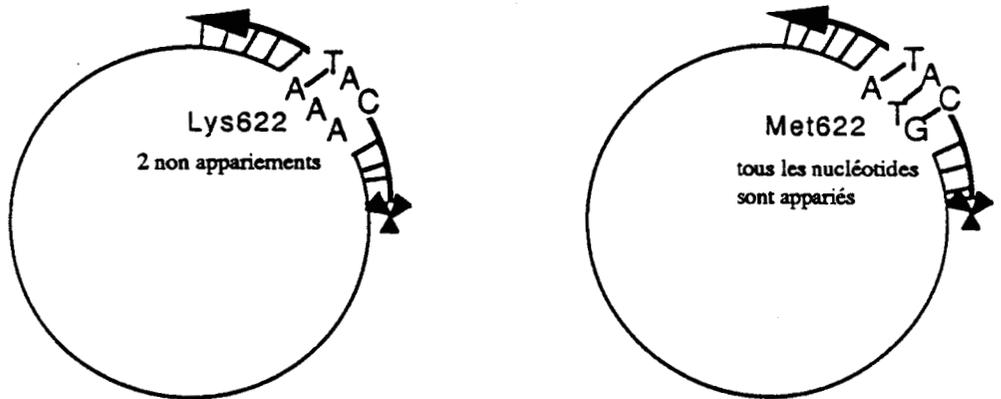
## OBJECTIF

Sachant que la phosphorylation de résidus sérine/thréonine représente plus de 99 % de la phosphorylation sur des protéines dans une cellule, nous avons voulu analyser si l'activité kinase détectée *in vitro*, dans cette expérience, représentait bien une propriété intrinsèque à la protéine *mil*. En effet, il n'était pas exclu que, dans les travaux de K. Moelling *et al.*, une (ou plusieurs) protéine-kinase(s) cellulaire(s) puisse(nt) être présente(s) dans leur préparation de P100gag-mil. Un précédent de cette nature s'est déjà produit pour *middle T* de SV40 qui a longtemps été considéré comme une kinase alors qu'il n'en est rien. En effet, *middle T* forme un complexe avec la protéine-kinase cellulaire *src* lorsqu'on le purifie par immunoprécipitation.

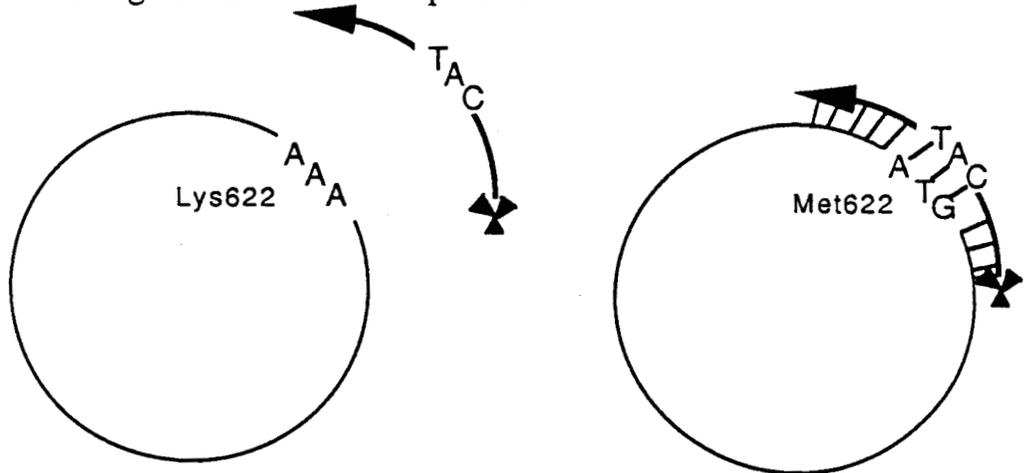
L'activité kinase démontrée, nous avons étudié l'importance de cette activité dans les propriétés biologiques classiquement associées à l'expression du gène *v-mil*.

1) préparation des simples brin M13 contenant le gène v-mil muté ou non muté

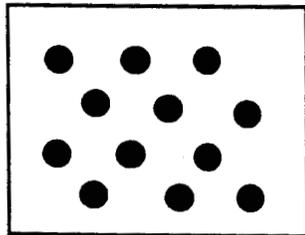
2) hybridation avec l'oligonucléotide mutagène marqué radioactivement en 5'



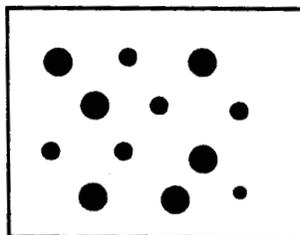
3) lavages accompagnés d'une augmentation de la température



Feuille de nitrocellulose sur laquelle sont déposés l'ADN de différents clones. Ces ADN ont été hybridés avec la sonde oligonucléotidique marquée radioactivement.



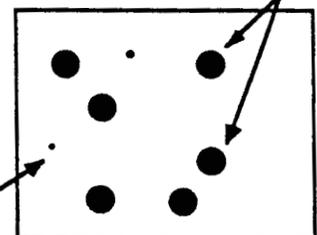
lavage à la température d'hybridation



phage contenant probablement la lysine en position 622, donc non muté

lavage à la température d'hybridation +4°C

phage contenant probablement la mutation méthionine en position 622



lavage à la température d'hybridation +8°C

**figure 36 B : Principe de repérage des phages possédant la mutation désirée**

## CONSTRUCTION DES MUTANTS

Si la P100*gag-mil* est bien une kinase et que la lysine 622 fait partie du site de fixation de l'ATP, alors, on peut imaginer que la substitution de cette lysine par un autre AA (en l'occurrence, une méthionine) doit abolir l'activité kinase de la protéine. Si cette mutation n'abolissait pas l'activité kinase de la P100*gag-mil in vitro*, cela voudrait dire soit, que la lysine 622 n'est pas le site de fixation de l'ATP ou alors, que l'activité kinase observée *in vitro* résulte d'une protéine-kinase associée contaminant les préparations de P100*gag-mil* purifiées.

Nous avons donc construit un mutant dans lequel la lysine 622 (site présumé de fixation de l'ATP) a été remplacée par une méthionine. Le choix de la méthionine en tant qu'acide aminé de remplacement pour la lysine a été guidé par le fait que cet acide aminé ne porte pas de charge dans une protéine et possède quasiment le même encombrement stérique que la lysine. De plus, il a déjà été utilisé dans d'autres mutations du même style sans affecter la stabilité de la protéine mutée (Snyder *et al.*, 1985). Pour réaliser ce mutant, nous avons utilisé la technique de mutation dirigée à l'aide d'oligonucléotides de synthèse (Zoller et Smith, 1982). Dans ce but, la région du gène *v-mil* contenant le codon de la lysine 622 a été introduit dans un phage M13 (figure 36).

M13 est un phage à ADN simple brin (virus bactérien) dont le génome se réplique sous la forme double brin dans les bactéries. Les deux brins d'ADN ne sont pas équivalents : l'un est de polarité positive, l'autre de polarité négative. C'est toujours le brin d'ADN de polarité positive qui est pris par les particules infectieuses lorsqu'elles quittent la bactérie par extrusion.

Nous avons préparé une quantité importante d'ADN simple brin de M13 contenant la partie du gène *v-mil* que nous y avons introduite. Un oligonucléotide de synthèse a ensuite été préparé. Cet oligonucléotide de synthèse est complémentaire de la région entourant le codon lysine sauf au niveau précisément de cette lysine où l'oligonucléotide possède les nucléotides codant pour une méthionine (figure 36A). Après hybridation, l'oligonucléotide a servi d'amorce à une ADN polymérase pour la synthèse de l'ADN de polarité négative du M13. Nous avons obtenus ainsi des ADN double brin de M13 que nous avons transfectés dans des bactéries. Après la répllication de l'ADN double brin du phage M13 dans les cellules, les bactéries étaient capables de produire deux sortes de M13 : certains possédaient dans leur génome un codon lysine (AAA) en position 622, les autres, un codon méthionine (ATG) (figure 36A). Pour identifier les phages, dont le génome présentait un codon méthionine en position 622 dans *v-mil*, nous avons marqué l'oligonucléotide de synthèse au phosphate radioactif en 5' en utilisant une préparation purifiée de la polynucléotide kinase du phage T4. Environ deux cents clones ont été hybridés avec cette sonde dans des conditions où l'oligonucléotide hybride avec l'ADN sauvage et l'ADN muté (figure 36B). Par la suite, nous avons réalisé des lavages en augmentant la température. La complémentarité de l'oligonucléotide avec l'ADN possédant le codon méthionine étant totale (tous les nucléotides sont complémentaires), cette structure est plus stable que celle de l'oligonucléotide avec l'ADN possédant la lysine (où il y a deux paires de nucléotides non appariés). Ainsi, les clones dont l'hybridation semble plus stable en fonction de la température devraient être ceux qui possèdent un codon méthionine. Nous avons sélectionné de tels phages et vérifié, par séquence nucléotidique,

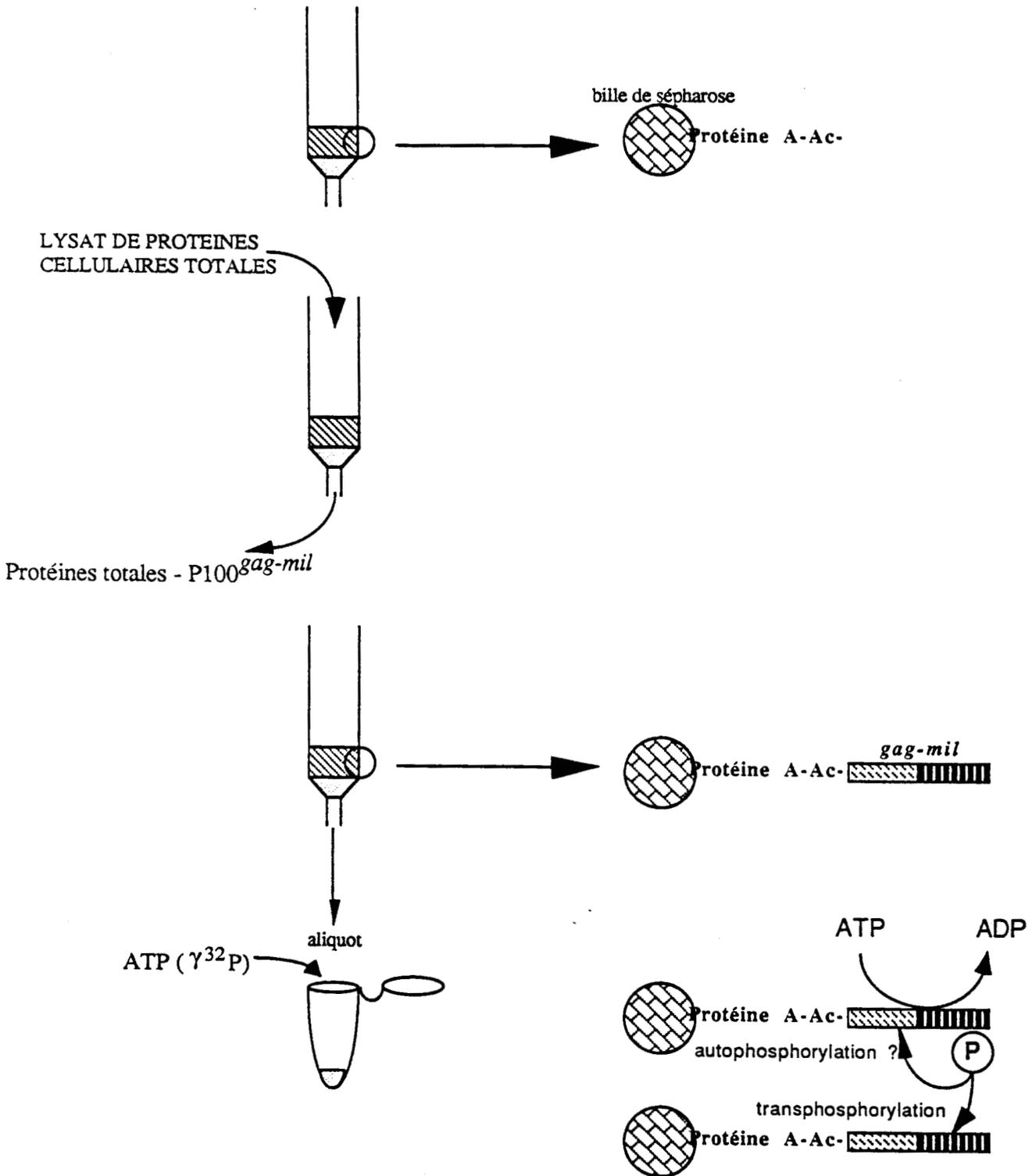


figure 37: Principe du test kinase.

que ceux-ci contenaient bien la mutation voulue, c'est à dire, un codon méthionine en position 622 dans le gène *v-mil*.

Le fragment d'ADN contenant la mutation (lysine/méthionine) a été réintroduit dans le gène *v-mil* du provirus de MH2. Nous avons ainsi obtenu deux types de provirus MH2 : un provirus sauvage avec une lysine en position 622, MH2 (K622), et un provirus muté avec une méthionine en position 622, MH2 (M622).

Nous avons transfecté l'ADN des deux provirus sur des fibroblastes embryonnaires de poulet. Les fibroblastes, ainsi transfectés, ont été sélectionnés sur le critère de transformation par l'oncogène *v-myc*. Les virus MH2, sauvage et muté, ont été directement récupérés dans des surnageants de fibroblastes et utilisés pour infecter des cellules de neurorétines et des macrophages.

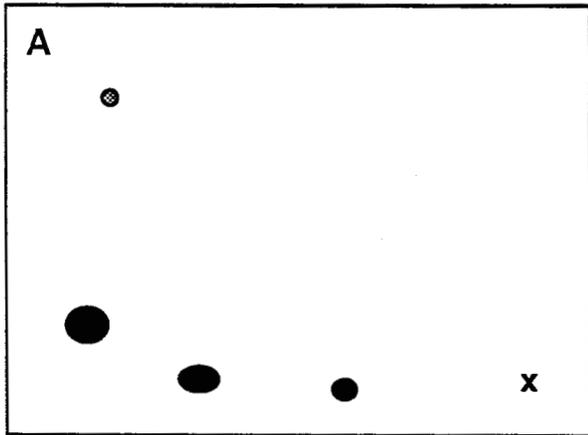
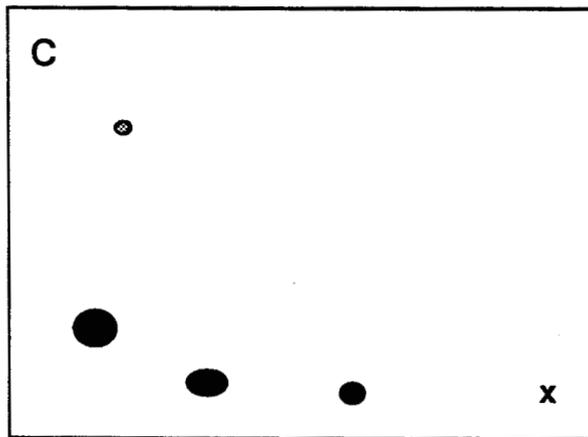
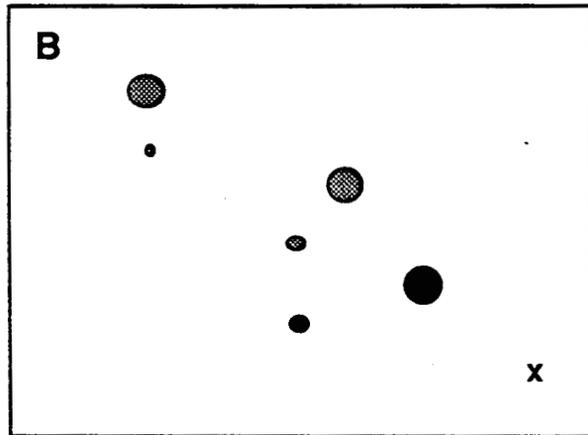
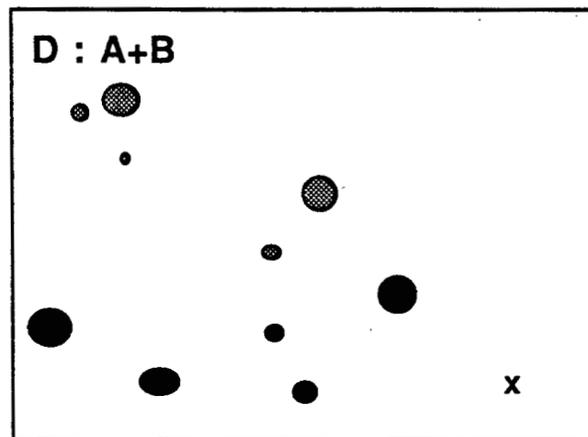
## RESULTATS

### Au niveau biochimique :

A partir de fibroblastes, dans lesquels étaient exprimés les produits du gène *v-mil*, soit sauvage, soit muté, nous avons purifié la P100*gag-mil*, par immunoprécipitation avec un anticorps dirigé contre le domaine *gag* aminoterminal de la molécule. Nous avons comparé l'activité kinase des produits de traduction des gènes *v-mil* sauvage et muté, en ajoutant aux préparations de P100*gag-mil* purifiées de l'ATP radioactif marqué sur le phosphate  $\gamma$  (figure 37). Le principe de l'expérience consiste à analyser la capacité des deux P100*gag-mil* purifiées à s'utiliser comme substrat de leur propre activité kinase. Les détails de cette expérience peuvent être trouvés en annexe dans l'article 1 : "Replacement of Lys 622 in the ATP binding domain of P100*gag-mil* abolishes the *in vitro* autophosphorylation of the protein and the biological properties of the *v-mil* oncogene of the MH2 retrovirus". Dans cette expérience d'autophosphorylation *in vitro*, nous n'avons observé aucune incorporation de radioactivité dans les préparations de P100*gag-mil* possédant une méthionine en position 622 alors que dans les préparations de P100*gag-mil* sauvage (avec une lysine en position 622) nous avons constaté une forte incorporation de phosphate radioactif sur les protéines *mil*. Dans chaque test, la quantité de P100*gag-mil* engagée dans la réaction d'autophosphorylation est quantifiée par la technique de "Western Blot".

Nous avons vérifié dans des expériences de transphosphorylation que la P100*gag-mil* dépourvue d'activité kinase pouvait être phosphorylée par une P100*gag-mil* sauvage. En effet, il était important de vérifier que la mutation lysine/méthionine affectait seulement la protéine en tant qu'enzyme et non en tant que substrat dans la réaction d'autophosphorylation.

En résumé, ces expériences montrent que la substitution lysine/méthionine abolit totalement l'activité autophosphorylante *in vitro* de la P100*gag-mil* (figure 39) démontrant ainsi que la réaction d'autophosphorylation reflète bien la nature intrinsèque de l'activité kinase de P100*gag-mil*.

P100<sup>*gag-mil*</sup> sauvage , IN VIVOP100<sup>*gag-mil*</sup> sauvage , IN VITROP100<sup>*gag-mil*</sup> mutée , IN VIVOChroma-  
tographie

2

1

Electrophorèse

x point de dépôt des hydrolysats peptidiques

● peptides *mil* spécifiques⊙ peptides *gag*

figure 38 : Schéma des cartes phosphopeptidiques à deux dimensions de la P100<sup>*gag-mil*</sup>.

D'autres résultats (non publiés) indiquent cependant que la phosphorylation de substrats exogènes, par les préparations partiellement purifiées de P100gag-mil décrites par Moelling *et al.*, ne résultent pas de la phosphorylation par P100gag-mil mais résultent effectivement de l'activité d'une ou plusieurs protéine-kinases cellulaires contaminantes. Il n'existe donc pas, à l'heure actuelle, même *in vitro*, de substrats connus pour la P100gag-mil, à part elle-même.

Avant de poursuivre nos expériences de phosphorylation et de biologie *in vivo*, nous avons vérifié que la mutation lysine/méthionine n'affectait pas la stabilité de la protéine dans la cellule. Pour cela, nous avons effectué des marquages radioactifs de 24 heures (marquages longs), qui donnent des informations sur la stabilité dans le temps d'une protéine, et des "Western Blots" qui donnent des informations sur la quantité de protéines présente à un moment donné dans une cellule. Les deux techniques ont confirmées que la mutation lysine/méthionine ne semblait pas affecter de manière détectable la stabilité de la protéine *in vivo*.

### ***In vivo*, la P100gag-mil s'autophosphoryle-t-elle ?**

Nous avons démontré, d'autre part que P100gag-mil est phosphorylée dans les cellules transformées par MH2 sur des résidus sérine et thréonine. Cette phosphorylation affecte les mêmes sites indépendamment du type cellulaire transformé (macrophages ou fibroblastes). Les sites phosphorylés *in vivo* sont différents de ceux phosphorylés *in vitro*. Par des cartes phosphopeptidiques à deux dimensions, nous avons constaté que la P100gag-mil mutée (Kinase -) est toujours phosphorylée *in vivo* à la même intensité et aux mêmes sites que la P100gag-mil sauvage (Kinase +) (figure 38). Nous en avons déduit que le produit de traduction de *v-mil* ne s'autophosphoryle vraisemblablement pas *in vivo* mais se trouve être la cible d'autres protéine-kinases cellulaires.

### **Au niveau biologique :**

Dans les systèmes macrophages et neurorétines dont nous avons parlé dans l'introduction de ce mémoire, la substitution lysine/méthionine supprime les propriétés biologiques associées à l'expression de *v-mil* :

A l'inverse des macrophages transformés par MH2 (K622) (virus sauvage), les macrophages infectés par MH2 (M622) (virus MH2 dont le gène *mil* est muté) requièrent pour leur prolifération l'addition de cMGF exogène. Ils possèdent en cela un comportement similaire à celui de macrophages qui auraient été infectés par un virus ne contenant que l'oncogène *v-myc*.

Nous avons également étudié la prolifération de cellules de neurorétines après infection avec les virus MH2 (K622) (sauvage) et MH2 (M622) (muté). Alors que les neurorétines infectées par le virus sauvage sont induites à proliférer, les neurorétines infectées par le virus MH2 (M622) restent quiescentes.

<div style="text-align: right;">VIRUS</div> <div style="text-align: left;">Activités</div>	MH2 (K622)	MH2 (M622)
Autophosphorylation IN VITRO	+	-
Prolifération des NR	+	-
cMGF indépendance de macrophages transformés par v-myc	+	-

figure 39 : Résumé des résultats de la 1<sup>ère</sup> Partie.

Ces résultats, résumés sur la figure 39, indiquent que les propriétés biologiques de *v-mil* dépendent de la phosphorylation, par P100*gag-mil*, de substrats dont la nature reste à déterminer.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Nous avons démontré que le produit de traduction de l'oncogène *v-mil* est une kinase et que cette fonction est indispensable aux propriétés biologiques associées à l'expression de *v-mil*. Il serait maintenant intéressant d'essayer de trouver des substrats pour la P100*gag-mil* et tenter de comprendre par quelle voie biochimique agit l'oncogène *v-mil*. Un autre axe de recherche serait d'identifier précisément les sites de phosphorylation et de regarder si la phosphorylation de ces sites se fait par des kinases déjà connues. Dans une étude ultérieure, ces sites pourront être à leur tour mutés afin d'étudier leur rôle dans un éventuel mécanisme de régulation de la P100*gag-mil*.

Il est courant de constater une différence d'activité entre la protéine oncogène et celle de son équivalent cellulaire. Etant donné que nous possédons au laboratoire deux ADNc *c-mil* ainsi que les moyens de les exprimer dans des cellules, notre prochain objectif est donc de transposer, sur les protéines cellulaires, l'étude que nous avons réalisée sur la protéine virale. En particulier, il sera intéressant d'étudier le rôle du peptide supplémentaire (résultat d'un épissage alternatif) présent dans une des deux protéines.

<b>VIRUS</b> <b>PROPRIETES</b>	<b>MH2(K622)</b>	<b>MH2-Hd</b>
transformation de fibroblastes	+	+
prolifération des NR	+	+
cMGF indépendance de macrophages transformés par v-myc	+	+
Activité autophosphorylante de la P100 <sup><i>gag-mil</i></sup>	Haute	Basse

**figure 40** : Comparaison des propriétés des produits de traduction des gènes v-mil des virus MH2-Hd et MH2(K622)

II<sup>ème</sup> PARTIE.ETUDE D'UN "MUTANT " DE MH2 : MISE EN EVIDENCE D'UNE  
REGION CONSERVEE DANS LES PROTEINE-KINASES.

(Résumé de l'Article 2).

## INTRODUCTION

Nous possédons au laboratoire deux isolats du virus sauvage MH2 : MH2-Hd et MH2 (K622). Les produits de traduction de leur gène *v-mil* respectif sont phosphorylés, *in vivo*, sur les mêmes sites peptidiques et possèdent des propriétés biologiques classiques (indépendance vis à vis du cMGF et prolifération des neurorétines) (figure 40). MH2-Hd, présente cependant une singularité. En effet, le produit de traduction du gène *v-mil* de ce virus possède *in vitro* une capacité d'autophosphorylation considérablement réduite si on la compare à celle de la P100*gag-mil* du virus MH2 (K622) (figure 40). *In vivo*, la présence des mêmes sites de phosphorylation sur les produits de traduction des gènes *v-mil* des deux virus (MH2 (K622) et MH2-Hd) indique que la P100*gag-mil* du virus MH2-Hd n'est pas mutée en tant que substrat mais en tant qu'enzyme.

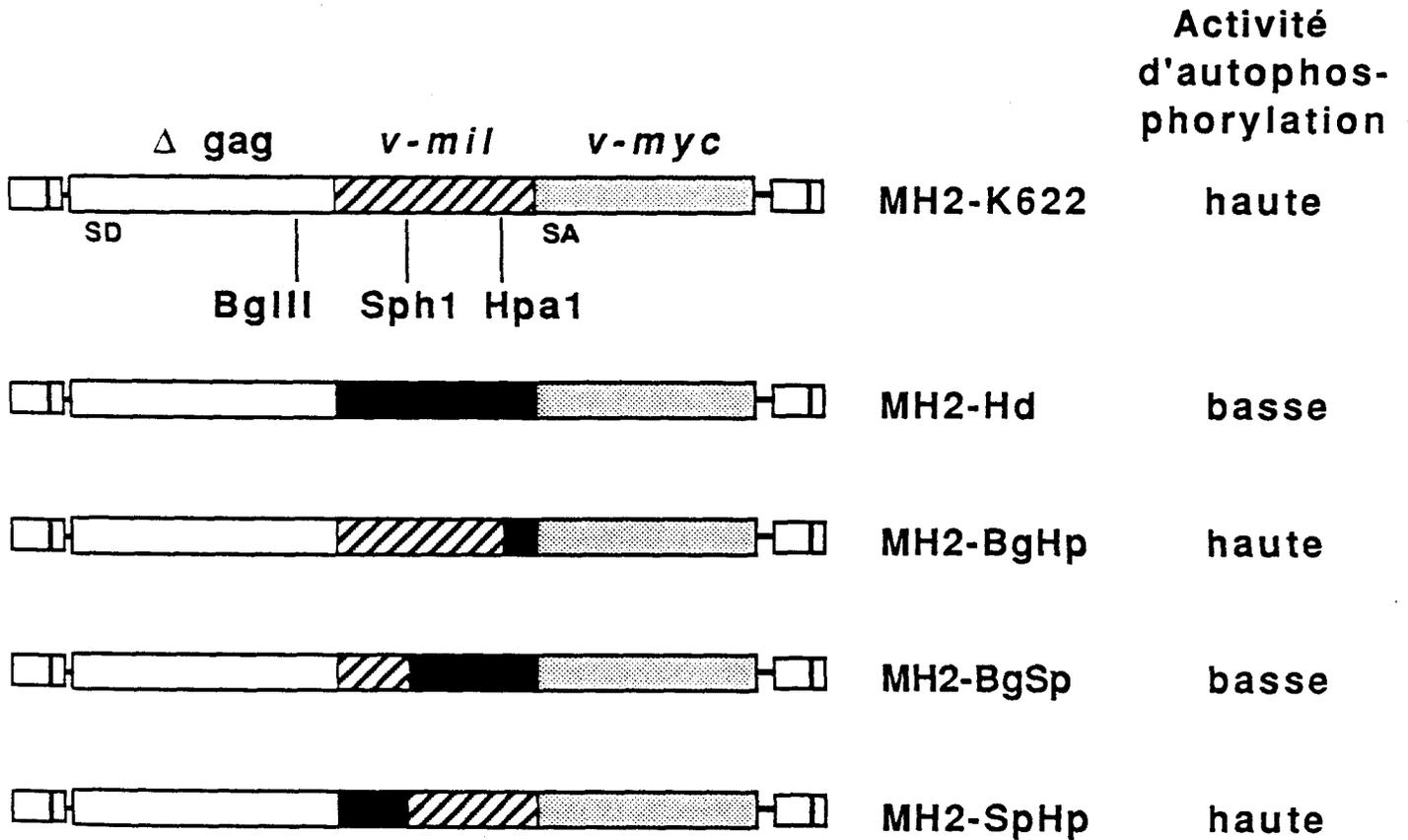
Si on admet que le taux d'autophosphorylation observée *in vitro* est le reflet de l'activité kinase de P100*gag-mil* dans les cellules transformées, ces résultats suggèrent que l'activité biologique de *v-mil* ne requiert pas de hauts taux d'activité kinase dans les cellules transformées par MH2. Il est intéressant de noter qu'il a déjà été montré, pour des mutants de *v-src*, qu'une activité kinase réduite ne modifiait pas son pouvoir mitogène sur des cellules de neurorétine de poulet (Iba et al., 1985).

## OBJECTIF

Nous avons tenté de localiser la (ou les) mutation(s), dans le virus MH2-Hd, responsable(s) de la diminution de l'activité kinase *in vitro* sans apparemment modifier les propriétés biologiques liées à l'expression du gène *v-mil* ni les sites de phosphorylation de la protéine.

Pour localiser la région responsable de cette baisse d'activité *in vitro* nous avons construit des chimères entre les provirus de MH2-Hd et de MH2 (K622) en profitant de la présence de 3 sites de restriction uniques : Bgl II à la fin du gène *gag*, Sph I au milieu du gène *mil* et Hpa I à la fin du gène *mil* (figure 41).

Recombinants



A - Construction de chimères MH2-Hd / MH2 (K622).

720

Ser Asn Asn Ile Phe Leu

Sph1..... TCC AAT AAT ATA TTT CTT ..... Hpa1 MH2-K622

Sph1..... ° ° ° ° G ° ° ° ° ° ° ° ..... Hpa1 MH2-Hd

Ser

B - Comparaison de la séquence du fragment Sph1-Hpa1 des provirus MH2-Hd et MH2 (K622).

figure 41

## CONSTRUCTION DES MUTANTS et RESULTATS

Trois nouveaux provirus ont ainsi été construits, transfectés sur fibroblastes embryonnaires de poulet et des clones cellulaires sélectionnés pour la transformation par *v-myc*. Les produits de traduction de leurs gènes *v-mil* respectifs ont été analysés par des tests d'autophosphorylation *in vitro*. La quantité de P100*gag-mil* engagée dans chaque réaction d'autophosphorylation a été normalisée par la technique du "Western Blot".

La première construction chimérique (MH2-BgHp) a été obtenue par insertion du fragment Bgl II-Hpa1 du provirus MH2 (K622) dans le provirus MH2-Hd. Le produit de traduction de ce gène *v-mil* est une P100*gag-mil* exhibant une forte activité kinase *in vitro*. Nous avons donc identifié la région dans laquelle se trouvait la (ou les) mutation(s) responsable(s) de la diminution de l'activité kinase observée *in vitro*. Pour localiser de manière plus précise dans quelle partie du fragment Bgl II-Hpa1 pouvai(en)t se localiser la (ou les) mutations, nous avons construit deux autres chimères.

La seconde construction chimérique (MH2-BgSp) a été obtenue par insertion du fragment Bgl II-Sph1 du provirus MH2-K622 dans le provirus MH2-Hd. La P100*gag-mil* obtenue par traduction de cette chimère possède une activité kinase faible comparable à celle de la P100*gag-mil* du provirus MH2-Hd.

La troisième et dernière construction chimérique (MH2-SpHp) a été obtenue par insertion du fragment Sph1-Hpa1 du provirus MH2 (K622) dans le provirus MH2-Hd. Ce fragment de MH2 (K622) suffit pour restaurer à la P100*gag-mil* du provirus MH2-Hd une activité autophosphorylante *in vitro* comparable à celle de la P100*gag-mil* du virus MH2 (K622).

Nous en avons déduit que la (ou les) mutation(s) responsable(s) de la diminution de l'activité kinase de la P100*gag-mil* du virus MH2-Hd se trouvai(en)t dans le fragment Sph1-Hpa1. La séquence de ce fragment avait déjà été publiée par Galibert et al. (1984). Il nous suffisait donc de comparer cette séquence avec celle du fragment correspondant dans le virus MH2 (K622) pour localiser la (ou les) mutation(s). Par conséquent, le fragment Sph1-Hpa1 du virus MH2 (K622) a été cloné dans un vecteur M13 et séquencé selon la méthode de Sanger.

La séquence du fragment Sph1-Hpa1 révèle qu'en fait une simple substitution d'une base changeant le codon (AAT), spécifiant une asparagine en position 720 dans MH2 (K622), en codon (AGT) pour une sérine dans MH2-Hd est responsable de cette diminution d'activité *in vitro* (figure 41).

Après consultations de banques de données (Genbank, EMBL), nous avons constaté que ce résidu fait partie d'une séquence de 6 à 8 AA très conservés par de nombreuses kinases



(figure 42) y compris des kinases spécifiques de substrats non protéiques et qui ne possèdent pas la séquence consensus :

(Gly X Gly X X Gly) ... (12 à 15 AA)... (Lys).

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Nos résultats suggèrent que la haute conservation de la région, comprenant l'asparagine 720, reflète probablement sa participation (directe ou indirecte) à la formation de la portion du site actif de ces enzymes responsable de la fixation de l'ATP. Il est intéressant de noter que cette région est conservée dans des kinases qui utilisent d'autres substrats que les protéines (par exemple l'aminoglycoside phosphotransférase, la viomycine phosphotransférase, la streptomycine phosphotransférase et l'hygromycine phosphotransférase sur la figure 42)

Un développement possible de ce sujet pourrait être l'étude de l'influence de cette région dans la fixation de l'ATP. L'utilisation d'analogues de l'ATP nous permettrait d'évaluer l'affinité de la protéine mutée *versus* la protéine sauvage dans des expériences de compétition avec l'ATP lui-même.

Ne connaissant pas encore de substrats de P100*gag-mil*, il serait maintenant intéressant d'introduire cette mutation dans une kinase dont certains substrats sont identifiés. Nous pourrions ainsi étudier d'éventuelles conséquences biologiques causées par cette substitution d'acide aminé.

Un modèle possible pourrait être le gène *v-src*. En effet, le produit de traduction de l'oncogène *v-src* est une protéine-kinase dont l'expression permet la transformation de fibroblastes. De plus, quelques substrats phosphorylés par *v-src* sont connus. Nous pourrions donc réintroduire la mutation dans la protéine *src* et étudier les conséquences de cette substitution sur l'aptitude de la pp60<sup>*v-src*</sup> à s'autophosphoryler *in vitro*, à transformer les fibroblastes *in vivo* et à phosphoryler ses substrats.

## DISCUSSION

## DISCUSSION-CONCLUSION

Nous avons montré dans ce mémoire que le produit de traduction de l'oncogène *v-mil* possède une activité kinase intrinsèque et spécifique de résidus sérine et thréonine. Ceci fut démontré par la substitution du site présumé de fixation d'ATP (Lys622) par un résidu méthionine (AA isostérique de la lysine mais qui ne peut pas se lier à l'ATP) et qui n'altère ni l'expression ni la stabilité de la protéine.

Nous avons vu que l'abolition de la fonction kinase est accompagnée de la perte des propriétés biologiques associée à l'expression de *v-mil* : prolifération des cellules de neurorétines et cMGF indépendance de macrophages transformés par *v-myc*.

*In vivo*, les sites de phosphorylation sont les mêmes pour une protéine sauvage (kinase +) que pour une protéine mutée (kinase -) : ceci signifie, premièrement, que la P100*gag-mil* ne s'autophosphoryle pas *in vivo* mais qu'elle est phosphorylée par d'autres kinases cellulaires et deuxièmement, que la perte des propriétés biologiques est une conséquence de la mutation de la protéine *mil* en tant qu'enzyme (kinase) et non en tant que substrat pour d'autres protéine-kinases cellulaires : la cascade d'événements dans laquelle *v-mil* est impliqué est donc coupée en aval de l'oncogène *v-mil*.

Il est intéressant de noter que les propriétés biologiques de *v-mil* sont étroitement liées à la prolifération cellulaire. Lorsqu'on parle de prolifération cellulaire, on pense souvent, même si cela n'est pas toujours vérifié, à une production de facteur(s) de croissance.

Les études qui ont été faites dans le domaine de l'oncogénèse ont souvent montré que les oncogènes confèrent aux cellules transformées une diminution de leur dépendance vis à vis de facteurs de croissance soit en codant eux-mêmes pour des peptides similaires à des facteurs de croissance (ex : *v-sis*) soit en codant pour des versions de leurs récepteurs (ex : *v-erbB*) ou alors en amplifiant les signaux mitotiques générés par la fixation du facteur sur son récepteur.

Dans le cas des neurorétines, mis à part le fait qu'on observe une prolifération, on n'a encore aucune idée sur la manière dont le programme de multiplication cellulaire s'est remis en route (ces cellules sont normalement quiescentes : phase G0) ; dans le cas des macrophages la relation est flagrante dans la mesure où il y a mise en évidence de la production d'un facteur de croissance (cMGF).

Il est peu probable que *v-mil* soit homologue à un facteur de croissance (aucun de ceux qui sont connus ne présente d'activité kinase). Peut-il être un récepteur ? ce n'est pas évident non plus, et tous ceux qui ont une activité kinase semblent plutôt spécifiques de résidus tyrosine que de résidus sérine et thréonine.

Deux hypothèses non exclusives peuvent être émises sur le rôle de la P100*gag-mil* : elle peut agir, par exemple, en tant que substrat en détournant l'activité de protéine-kinases et perturber ainsi une cascade d'événements ou bien encore la P100*gag-mil* peut perturber la physiologie normale de la cellule en tant qu'enzyme, en phosphorylant des substrats normalement non phosphorylés dans une cellule normale.

C'est pourquoi nous nous sommes proposés de poursuivre notre étude en nous tournant maintenant vers l'identification des sites de phosphorylation de la P100*gag-mil* *in vivo*. Une fois ces sites repérés, nous pourrions alors les muter et déterminer s'il existe une régulation par phosphorylation/déphosphorylation sur la protéine virale. Il sera également très intéressant d'essayer de trouver quels sont les cibles qui sont phosphorylées par la P100*gag-mil*.

Au cours de l'introduction nous avons vu que la P100*gag-mil* peut se lier *in vitro* à de l'ADN et à de l'ARN (Bunte *et al.*, 1983). Le deuxième oncogène qui possède une activité kinase spécifique de résidus sérine et thréonine, *v-mos* (Kloetzer *et al.*, 1983; 1984), présente aussi une aptitude à se lier à de l'ADN ; cependant cette aptitude est dépendante de la fixation d'ATP. Ainsi une mutation du produit de traduction du gène *v-mos* du site de fixation de l'ATP (lysine 121) supprime non seulement son activité kinase (et son aptitude à transformer les cellules) mais également ses propriétés "DNA binding" (Seth *et al.*, 1987).

Des études biochimique supplémentaires seront donc nécessaires pour savoir si, comme *v-mos*, *v-mil* se lie à l'ADN d'une façon "ATP dépendante". Si l'expérience se révèle positive, il faudra déterminer la région responsable de la fixation de la protéine virale avec les acides nucléiques. Nous pourrions alors muter, le plus précisément possible, cette région en essayant de ne pas supprimer l'aptitude de la protéine à fixer l'ATP. Un tel mutant nous permettrait de savoir si la perte des propriétés de l'oncogène *v-mil* est due uniquement à la perte de son activité kinase ou à la perte de sa capacité à se fixer à de l'ADN ou à de l'ARN en conséquence de la mutation sur le site de fixation de l'ATP.

La signification biologique de tels résultats est assez difficile à interpréter. Dans le cas de *v-mil* et de *v-mos*, il pourrait s'agir de protéines multifonctionnelles comme par exemple la protéine-kinase cellulaire de 67kd isolée dans les cellules HeLa qui est indispensable pour la réplication, *in vitro*, du virus de la poliomyélite (Morrow *et al.*, 1985). Cette protéine de 67kd présente, *in vitro*, une activité autophosphorylante, une capacité à phosphoryler la sous-unité  $\alpha$  du facteur eucaryote d'initiation de la synthèse peptidique (eIF-2) et une aptitude à stimuler la synthèse d'ARN de poliovirus en présence de l'enzyme virale, la réplicase. *In vitro*, l'activité kinase de cette protéine peut être stimulée par des concentrations faibles d'ARN double brin.

Tous ces travaux seront poursuivis en parallèle avec l'étude des protéines cellulaires *mil*. Des études préliminaires sont en cours pour mettre au point un test kinase *in vitro*. Dans les tests kinases que nous avons fait sur les protéines virales, les polypeptides étaient immobilisés sur un support solide (protéine A-sépharose) grâce à un anti-corps *gag*-spécifique qui reconnaissait la protéine dans sa partie aminoterminal (le produit de traduction de *v-mil* est une protéine de fusion *gag-mil*) (figure 40). Il est naturellement exclu que l'on puisse immobiliser les protéines cellulaires avec un anticorps viral, il faut donc trouver maintenant des anticorps qui reconnaissent les protéines cellulaires sans, et c'est là le point essentiel, altérer la fonction biochimique.

Nous essayons actuellement un anticorps dirigé contre la partie carboxyterminale de la protéine. Comme ce domaine est présent et identique dans la protéine virale, les essais sont faits sur la P100*gag-mil* dont on connaît le niveau d'autophosphorylation. Nous essayons également de savoir si les protéines cellulaires ont des sites de phosphorylation communs ou différents de ceux de la protéine virale.

D'après quelques résultats préliminaires, nous savons que les protéines cellulaires *mil* de 71kd et de 73kd sont phosphorylées *in vivo*. Un des sites de phosphorylation est commun avec un site de phosphorylation de la protéine virale, P100*gag-mil*. Au moins deux autres sites majeurs semblent uniques aux protéines cellulaires p71/p73. Afin d'identifier les protéine-kinases qui phosphorylent (et peut-être régulent l'activité) des protéines *mil* cellulaires nous essayons d'augmenter artificiellement la phosphorylation sur certains résidus en utilisant des activateurs de protéine-kinases connues.

En conclusion, dans les expériences que nous avons décrites dans ce mémoire, nous avons vu que l'étude des oncogènes pouvait, dans certains cas, être à l'origine de la détermination du rôle physiologique d'une protéine cellulaire. La démonstration que le produit de traduction de l'oncogène *v-mil* est une protéine-kinase permet maintenant d'étudier la régulation de l'activité kinase du produit de traduction de *c-mil* et ainsi éclairer les rôles physiologiques de ce proto-oncogène.

# **BIBLIOGRAPHIE**

- ADAMS, M.J., M. BUEHNER, K. CHANDRASEKHAR, G.C. FORD, M.L. HACKERT, A. LILJAS, M.G. ROSSMANN, I.E. SMILEY, W.S. ALLISON, J. EVERSE, N.O. KAPLAN and S.S. TAYLOR. (1973). Structure-Function Relationships in Lactate Dehydrogenase. Proc. Natl. Acad. Sci. **70** : 1968-1972.
- ADAMS, M.J., A.W. MARRIS, C.A. PINKERT, L.M. CORCORAN, W.S. ALEXANDER, S. CORY, R.D. PALMITER and R.L. BRINSTER. (1985). The *c-myc* oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. Nature **318** : 533-538.
- ADKINS, B., A. LEUTZ and T. GRAF. (1984). Autocrine growth induced by *src*-related oncogenes in transformed chicken myeloid cells. Cell **39** : 439-445.
- ALITALO, K., G. RAMSAY, J.M. BISHOP, S. OHLSSON-PFEIFER, W.W. COLBY and A.D. LEVINSON (1983a) Identification of nuclear proteins encoded by viral and cellular *myc* oncogenes. Nature **306** : 274-277.
- ALITALO, K., M. SCHWAB, C.C. LIN, H.E. VARMUS and J.M. BISHOP. (1983b). Homogeneously staining chromosomal regions contain amplified copies of an abundantly expressed cellular oncogene (*c-myc*) in malignant neuroendocrine cells from a human colon carcinoma. Proc. Natl. Acad. Sci. **80** : 1707-1711.
- AMARA, S.G., V. JONAS and M.G. ROSENFELD. (1982). Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. Nature **298** : 240-244.
- ANGEL, P., M. IMAGAWA, R. CHIU, B. STEIN, R.J. IMBRA, H.J. RAHMSDORF, C. JONAT, P. HERRLICH and M. KARIN. (1987). Phorbol ester-inducible genes contain a common *cis* element recognized by a TPA-modulated *trans*-acting factor. Cell **49** : 729-739.
- ARNDT, K. and G.R. FINK. (1987). GCN4 protein, a positive transcription factor in yeast, binds general control promoters at all 5' TGACTC 3' sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. **83** : 8516-8520.
- BARBACID, M. (1987). *ras* genes. Ann. Rev. Biochem. **56** : 779-827.
- BARKER, W.C. and M.O. DAYHOFF. (1982). Viral *src* gene products are related to the catalytic chain of mammalian cAMP-dependent protein kinase. Proc. Natl. Acad. Sci. **79** : 2836-2839.
- BARTRAM, C.R., A. de KLEIN, A. HAGEMEIJER, T. van AGTHOVEN, A.G. van KESSEL, D. BOOTSMA, G. GROSVELD, M.A. FERGUSON-SMITH, T. DAVIES, M. STONE, N. HEISTERKAMP, J.R. STEPHENSON and J. GROFFEN. (1983). Translocation of *c-abl* oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. Nature **306** : 277-280.
- 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.
- BEN-NERIAH, Y., A.BERNARDS, M.PASKING, G.Q.DALEY and D.BALTIMORE. (1986a). Alternative 5' exons in *c-abl* mRNA.  
Cell 44 : 577-586.
- BEN-NERIAH, Y., G.Q.DALEY, A.M.MES-MASSON, O.N.WITTE and D.BALTIMORE. (1986b). 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 : 485-487.
- BETSHOLTZ, C., B.WETERMARK, B.EK and C.H.HELDIN. (1984). Coexpression of a PDGF-like growth factor and PDGF receptors in a human osteosarcoma cell line : implications for autocrine receptor activation.  
Cell 39 : 447-457.
- BEUG, H., M.J.HAYMAN and T.GRAF. (1982). Myeloblasts transformed by the avian acute leukemia virus E26 are hormone-dependent for growth and for the expression of a putative *myb*-containing protein, P135 E26  
EMBO J 1 : 1069-1073.
- BEUG, H., S.PALMIERI, C.FREUDENSTEIN, H.ZENTGRAF and T.GRAF. (1982). Hormone-dependant terminal differentiation in vitro of chicken erythroleukemia cells transformed by ts mutants of avian erythroblastosis virus.  
Cell 28 : 907-919.
- BISHOP, J.M. (1981). Enemies within : the genesis of retrovirus oncogenes.  
Cell 23 : 5-6.
- 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., S.J.O'BRIEN, W.G.NASH, U.R.RAPP, C.C.MORTON and P.LEDER. (1983). 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.
- BOULUKOS, K.E., P.POGNONEC, A.BEGUE, F.GALIBERT, J.C.GESQUIERE, D.STEHELIN and J.GHYSDAEL. (1988). Identification in chickens of an evolutionarily conserved cellular *ets-2* gene (*c-ets-2*) encoding nuclear proteins related to the products of the *c-ets* proto-oncogene.  
EMBO J. 7 : 697-705.
- BRUGGE, J.S. and R.L.ERIKSON. (1977). Identification of a transformation-specific antigen induced by an avian sarcoma virus.  
Nature 269 : 346-347.

- BRUGGE, J.S. and D.DARROW. (1984). Analysis of the catalytic domain of phosphotransferase activity of two avian sarcoma virus-transforming proteins.  
J. Biol. Chem. **259** : 4550-4557.
- BRYANT, D. and J.T.PARSONS. (1983). Site-directed point mutation in the *src* gene of Rous sarcoma virus results in an inactive *src* gene product.  
J. Virol. **45** : 1211-1216.
- 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<sup>src</sup> 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.
- BUSS, J.E. and B.M.SEFTON. (1985). Myristic acid, a rare fatty acid, is the lipid attached to the transforming protein of Rous sarcoma virus and its cellular homolog.  
J. Virol. **53** : 7-12.
- CABRERA, C.V., M.C.ALONSO, P.JONHSTON, R.G.PHILLIPS and P.A.LAWRENCE. (1987). Phenocopies induced with antisense RNA identify the wingless gene.  
Cell **50** : 659-663.
- CAIRNS, J. and J.LOGAN. (1983). Step by step into carcinogenesis.  
Nature **304** : 582-583.
- CARTWRIGHT, C.A., W.ECKHART, S.SIMON and P.L.KAPLAN. (1987). Cell transformation by pp60<sup>c-src</sup> 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.
- CHARDIN, P. and A.TAVITIAN. (1986). The *ral* gene : a new *ras* related gene isolated by the use of a synthetic probe.  
EMBO J. **5** : 2203-2208.
- CHEN, S.J., N.J.HOLBROOK, K.F.MITCHELL, C.A.VALLONE, J.S.GREENGARD, G.R.GRABTREE and Y.LIN. (1985). A viral long terminal repeat in the interleukin 2 gene of a cell line that constitutively produces interleukin 2.  
Proc. Natl. Acad. Sci. **82** : 7284-7288.
- CHIEN, Y.H., M.LAI, T.Y.SHIH, I.M.VERMA, E.M.SCOLNICK, P.ROY-BURMAN and N.DAVIDSON. (1979). Heteroduplex analysis of the sequence relationships between the genomes of kirsten and harvey sarcoma viruses, their respective parental leukemia viruses, and the rat endogenous 30S RNA.  
J. Virol. **31** : 752-760.
- COHEN, P. (1982). The role of protein phosphorylation in neural and hormonal control of cellular activity.  
Nature **296** : 613-620.
- 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 *v-myc* oncogene.  
EMBO J. **2** : 2189-2194.

- COLLETT, M.S., J.S. BRUGGE and R.L. ERIKSON. (1978). Characterization of a normal avian cell protein related to the avian sarcoma virus transforming gene product.  
Cell 15 : 1363-1369.
- COLLETT, M.S. and R.L. ERIKSON. (1978). Protein kinase activity associated with the avian sarcoma virus *src* gene product.  
Proc. Natl. Acad. Sci. 75 : 2021-2024.
- COLLETT, M.S., E. ERIKSON and R.L. ERIKSON. (1979). Structural analysis of the avian sarcoma virus transforming protein : sites of phosphorylation.  
J. Virol. 29 : 770-781.
- COLLETT, M.S., E. ERIKSON, A.F. PURCHIO, J.S. BRUGGE and R.L. ERIKSON. (1979). A normal cell protein similar in structure and function to the avian sarcoma virus transforming gene product.  
Proc. Natl. Acad. Sci. 76 : 3159-3163.
- COLLINS, S. and M. GROUDINE. (1982). Amplification of endogenous *myc*-related DNA sequences in a human myeloid leukaemia cell line.  
Nature 298 : 679-681.
- COLLINS, S. and M. GROUDINE. (1983). Rearrangement and amplification of *c-abl* sequences in the human chronic myelogenous leukemia cell line K562.  
Proc. Natl. Acad. Sci. 80 : 4813-4817.
- COMINGS, D.E. (1973). A General Theory of Carcinogenesis.  
Proc. Natl. Acad. Sci. 70 : 3324-3328.
- COOPER, M. and P.E. NEIMAN. (1981). Two distinct candidate transforming genes of lymphoid leukosis virus-induced neoplasms.  
Nature 292 : 857-858.
- COOPER, G.M. (1982). Cellular transforming genes.  
Science 218 : 801-806.
- COOPER, J.A., K.L. GOULD, C.A. CARTWRIGHT and T. HUNTER. (1986a). Tyr<sup>527</sup> is phosphorylated in pp60<sup>c-src</sup> : implications for regulation.  
Science 231 : 1431-1434.
- COOPER, J.A. and C.S. KING. (1986b). Dephosphorylation or antibody binding to the carboxy terminus stimulates pp60<sup>c-src</sup>.  
Mol. Cell. Biol. 6 : 4467-4477.
- COURTNEIDGE, S.A. and J.M. BISHOP. (1982). Transit of pp60<sup>v-src</sup> to the plasma membrane.  
Proc. Natl. Acad. Sci. 79 : 7117-7121.
- COURTNEIDGE, S.A. (1985). Activation of the pp60<sup>c-src</sup> kinase by middle T antigen binding or by dephosphorylation.  
EMBO J. 4 : 1471-1477.
- COUSSENS, L., P.J. PARKER, L. RHEE, T.L. YANG-FENG, E. CHEN, M.D. WATERFIELD, V. FRANCKE and A. ULLRICH. (1986). Multiple distinct forms of bovine and human protein kinase C suggest diversity in cellular signaling pathways.  
Science 233 : 859-866.
- CROSS, F.R. and H. HANAFUSA. (1983). Local mutagenesis of Rous sarcoma virus : the major sites of tyrosine and serine phosphorylation of p60<sup>src</sup> are dispensable for transformation.  
Cell 34 : 597-607.
- CURRAN, T., A.D. MILLER, L. ZOKAS and J.M. VERMA. (1984). Viral and cellular *fos* proteins : A comparative analysis.  
Cell 36 : 259-268.

- DALLA-FAVERA,R., F.WONG-STAAAL and R.C.GALLO. (1982). Oncogene amplification in promyelocytic leukaemia cell line HL-60 and primary leukaemic cells of the same patient. *Nature* **299** : 61-63.
- DEFEO,D., M.A.GONDA, H.A.YOUNG, E.H.CHANG, D.R.LOWY, E.M.SCOLNICK and R.W.ELLIS. (1981). Analysis of two divergent rat genomic clones homologous to the transforming gene of Harvey murine sarcoma virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78** : 3328-3332.
- de MARTIN,R., B.HAENDLER, R.HOFER-WARBINEK, H.GAUGITSCH, M.WRANN, H.SCHLUSENER, J.M.SEIFERT, S.BODMER, A.FONTANA and E.HOFER. (1987). Complementary DNA for human glioblastoma-derived T cell suppressor factor, a novel member of the transforming growth factor- $\beta$  gene family. *EMBO J.* **6** : 3673-3677.
- DEUEL,T.F., J.S.HUANG, S.S.HUANG, P.STROOBANT and M.D.WATERFIELD. (1983). Expression of a platelet-derived growth factor-like protein in simian sarcoma virus transformed cells. *Science* **221** : 1348-1350.
- DONNER,P., I.GREISER-WILKE and K.MOELLING. (1982). Nuclear localization and DNA binding of the transforming gene product of avian myelocytomatosis virus. *Nature* **296** : 262-265.
- DOOLITTLE,R.F., M.W.HUNKAPILLER, L.E.HOOD, S.G.DEVARE, K.C.ROBBINS, S.A.AARONSON and H.N.ANTONIADES. (1983). Simian sarcoma virus *onc* gene, *v-sis*, is derived from the gene (or genes) encoding a platelet-derived growth factor. *Science* **221** : 275-277.
- DOWNWARD,J., 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.
- 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.
- DOZIER,C., F.DENHEZ, C.HENRY, J.COLL, A.BEGUE, B.QUATANNENS, S.SAULE and D.STEHELIN. (1988). Alternative splicing of RNAs transcribed from the chicken *c-mil* gene. *Mol. Cell. Biol.* (sous presse).
- DRABKIN,H.A., C.BRADLEY, I.HART, J.BLESKAN, F.P.LI and D.PATTERSON. (1985). Translocation of *c-myc* in the hereditary renal cell carcinoma associated with a t (3;8) (p14.2;q24.13) chromosomal translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82** : 6980-6984.
- ELIYAHU,D., A.RAZ, P.GRUSS, D.GIVOL and M.OREN. (1984). Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells. *Nature* **312** : 646-649.
- 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.

- ELLIS,R.W., D.DE FEO, T.Y.SHIH, M.A.GONDA, H.A.YOUNG, N.TSUCHIDA, D.R.LOWY and E.M.SCOLNICK. (1981). The p21<sup>src</sup> genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses originate from divergent members of a family of normal vertebrate genes. *Nature* 292 : 506-511.
- ERIKSON,R.L., M.S.COLLETT, E.ERICKSON and A.F.PURCHIO. (1979). Evidence that the avian sarcoma virus transforming gene product is a cyclic AMP-independent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76 : 6260-6264.
- FELDMAN,R.A., E.WANG and H.HANAFUSA. (1983). Cytoplasmic localization of the transforming protein of Fujinami sarcoma virus : salt-sensitive association with subcellular components. *J.Virol.* 45 : 782-791.
- FINCH,P.W. and P.T.EMMERSON. (1984). The nucleotide sequence of the *uvrD* gene of E.Coli. *Nucleic Acids Res.* 12 : 5789-5799.
- FISZMAN,M.Y. and P.FUCHS. (1975). Temperature-sensitive expression of differentiation in transformed myeloblasts. *Nature* 254 : 429-431.
- FOSTER,A.D. 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,A.D., 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.
- 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.
- FUNG,Y.K., A.L.MURPHREE, A.T'ANG, J.QIAN, S.H.HINRICHS and W.F.BENEDICT. (1987). Structural evidence for the authenticity of the human retinoblastoma gene. *Science* 236 : 1657-1661.
- GALIBERT,F., S.D. 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.
- GARCIA,I., B.SORDAT, E.RAUCCIO-FARINON, M.DUNAND, J.P.KRAEHENBUHL and H.DIGGELSMANN. (1986a). Establishment of two rabbit mammary epithelial cell lines with distinct oncogenic potential and differentiated phenotype after microinjection of transforming genes. *Mol. Cell. Biol.* 6 : 1974-1982.
- GARCIA,M., R.WELLINGER, A.VERZAK and H.DIGGELSMANN. (1986b). A new site of integration for mouse mammary tumor virus proviral DNA common to BalB/cf (c3h) mammary and kidney adenocarcinomas. *EMBO J.* 5 : 127-134.
- GARRETT,J.S., S.R.COUGHLIN, H.L.NIMAN, P.M.TREMBLE, G.M.GIELS and L.T.WILLIAMS. (1984). Blockade of autocrine stimulation in simian sarcoma virus-transformed cells reverses down-regulation of platelet-derived growth factors receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81 : 7466-7470.

- GAY,N.J. and J.E.WALKER. (1983). Homology between human bladder carcinoma oncogene product and mitochondrial ATP-synthase.  
Nature **301** : 262-264.
- GIBBS,J.B., I.S.SIGAL, M.POE and E.M.SCOLNICK. (1984). Intrinsic GTPase activity distinguishes normal and oncogenic *ras* p21 molecules.  
Proc. Natl. Acad. Sci. **81** : 5704-5708.
- GILMAN,A.G. (1984). G proteins and dual control of adenylate cyclase.  
Cell **36** : 577-579.
- GILMORE,T., J.E.DE CLUE and G.S.MARTIN. (1985). Protein phosphorylation at tyrosine is induced by the *v-erbB* gene product in vivo and in vitro.  
Cell **40** : 609-618.
- GISSELBRECHT,S., S.FICHELSON, B.SOLA, D.BORDEREAUX, A.HAMPE, C.ANDRE, F.GALIBERT and P.TAMBOURIN. (1987). Frequent *c-fms* activation by proviral insertion in mouse myeloblastic leukaemias.  
Nature **329** : 259-261.
- GRAF,T., F.VON WEIZSAECKER, S.GRIESER, J.COLL, D.STEHELIN, T.PATCHINSKY, K.BISTER, C.BECHADE, G.CALOTHY and A.LEUTZ. (1986). *v-mil* induces autocrine growth and enhanced tumorigenicity in *v-myc* transformed avian macrophages.  
Cell **45** : 357-364.
- GRAZIANI,Y., J.L.MALLER, Y.SUGIMOTO and R.L.ERIKSON. (1984). Modification of the activity of the catalytic subunit of the cAMP-dependent protein kinase by pp60<sup>src</sup>.  
Cancer Cells CSHL **2** : 27-35.
- GREENE,G.L., P.GILMA, M.WATERFIELD, A.BAKER, Y.HORT and J.SHINE. (1986). Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA.  
Science **231**: 1150-1154.
- GROFFEN,J., J.R.STEPHENSON, N.HEISTERKAMP, A.de KLEIN, C.R.BARTRAM and G.GROSVELD. (1984). Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, *bcr* on chromosome 22.  
Cell **36** : 93-99.
- GROSVELD,G., T.VERWOERD, T.van AGTHOVEN, A.de KLEIN, K.L.RAMACHANDRAN, N.HEISTERKAMP, K.STAM and J.GROFFEN. (1986). The chronic myelocytic cell line K562 contains a breakpoint in *bcr* and produces a chimeric *bcr/c-abl* transcript.  
Mol. Cell. Biol. **6** : 607-616.
- GRUNWALD,D.J., B.DALE, J.DUDLEY, W.LAMPH, B.SUGDEN, B.OZANNE and R.RISSER. (1982). Loss of viral gene expression and retention of tumorigenicity by Abelson lymphoma cells.  
J.Virol. **43** : 92-103.
- HANKS,S.K. (1987). Homology probing : identification of cDNA clones encoding members of the protein-serine kinase family.  
Proc. Natl. Acad. Sci. **84** : 388-392.
- HANN,S.R., H.D.ABRAMS, L.R.ROHRSCHEIDER and R.N.EISENMAN. (1983). Proteins encoded by the *v-myc* and *c-myc* oncogenes : Identification and localization in acute leukemia virus transformants and bursal lymphoma cell line.  
Cell **34** : 789-798.
- 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. **82** : 7894-7898.

- HANSEN, M.F., A.KOUFOS, B.L.GALLIE, R.A.PHILIPPS, O.FODSTAD., A.BROGGER, T.GEDDE-DAHL and W.K.CAVENEE. (1985). Osteosarcoma and retinoblastoma : A shared chromosomal mechanism revealing recessive predisposition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82** : 6216-6220.
- HAYMAN, M.J., G.KITCHENER and T.GRAF. (1979). Cells transformed by avian myelocytomatosis virus strain CMII contain a 90K *gag*-related protein. *Virology* **98** : 191-199.
- HAYMAN, M.J., G.M.RAMSAY, K.SAVIN and G.KITCHENER. (1983). Identification and characterization of the avian erythroblastosis virus *erbB* gene product as a membrane glycoprotein. *Cell* **32** : 579-588.
- HAYWARD, W.S., B.G.NEEL and S.M.ASTRIN. (1981). Activation of a cellular oncogene by promoter insertion in ALV induced lymphoid leukemia. *Nature* **290** : 475-480.
- HOLLENBERG, S.M., C.WEINBERGER, E.S.ONG, G.CERELLI, A.ORO, R.LEBO, E.B.THOMPSON, M.G.ROSENFELD and R.M.EVANS. (1985). Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* **318** : 635-641.
- HONEGGER, A.M., T.J.DULL, S.FELDER, E.van OBBERGHEN, F.BEILLOT, D.SZAPARY, A.SCHMIDT, A.ULLRICH and J.SCHLESSINGER. (1987). Point mutation at the ATP binding site of EGF receptor abolishes protein-tyrosine kinase activity and alters cellular routing. *Cell* **51** : 199-209.
- HOPE, I.A. and K.STRUHL. (1985). GCN4 protein, synthesized *in vitro*, binds HIS3 regulatory sequences : implications for general control of amino acid biosynthetic genes in yeast. *Cell* **43** : 177-188.
- 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.
- 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.GODSBOROUGH, C.M.CROCE and V.RAFF. (1986). Actively transcribed genes in the *raf* oncogene group, located on the X chromosome in mouse and man. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83** : 3934-3938.
- HULEIHEL, M., M.GOLDSBOROUGH, J.CLEVELAND, M.GUNNELL, T.BONNER and V.R.RAPP. (1986). Characterization of murine *A-raf*, a new oncogene related to the *v-raf* oncogene. *Mol. Cell. Biol.* **6** : 2655-2662.
- HUNTER, T. and B.M.SEFTON. (1980). Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **77** : 1311-1315.
- HUNTER, T. (1984). The epidermal growth factor receptor gene and its product. *Nature* **311** : 414-416.
- HUNTER, T., N.LING and J.A.COOPER. (1984). Protein kinase C phosphorylation of the EGF receptor at a threonine residue close to the cytoplasmic face of the plasma membrane. *Nature* **311** : 480-483.
- IBA, H., F.R.CROSS, E.A.GARBER and H.HANAFUSA. (1985). Low level of cellular protein phosphorylation by nontransforming overproduced p60<sup>c-src</sup>. *Mol. Cell. Biol.* **5** : 1058-1066.

- IBA,H., R.JOVE and H.HANAFUSA. (1985). Lack of induction of neuroretinal cell proliferation by Rous Sarcoma Virus variants that carry the *src* gene.  
Mol. Cell. Biol. **5** : 2856-2859.
- 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. **81** : 4424-4429.
- 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.
- ITOH,H., T.KOZASA, S.NAGATA, S.NAKAMURA, T.KATADA, M.UI, S.IWAI, E.OHTSUKA, H.KAWASAKI, K.SUZUKI and Y.KAZIRO. (1986). Molecular cloning and sequence determination of cDNAs for a subunits of the guanine nucleotide-binding proteins G<sub>s</sub>, G<sub>i</sub>, and G<sub>o</sub> from rat brain.  
Proc. Natl. Acad. Sci. **83** : 3776-3780.
- 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.
- JANSEN,H.W., R.LURZ, K.BISTER, T.I.BONNER, G.E.MARK and U.R.RAPP. (1984). Homologous cell-derived oncogenes in avian carcinoma virus MH2 and murine sarcoma virus 3611.  
Nature **307** : 281-284.
- JANSEN,H.W. and K.BISTER. (1985). Nucleotide sequence analysis of the chicken gene *c-mil*, the progenitor of the retrovirus oncogene *v-mil*.  
Virology **143** : 359-367.
- JENKINS,J.R., K.RUDGE and G.A.CURRIE. (1984). Cellular immortalization by a cDNA clone encoding the transformation-associated phosphoprotein P53.  
Nature **312** : 651-654.
- JOVE,R., S.KORNBLUTH and H.HANAFUSA. (1987). Enzymatically inactive p60<sup>c-src</sup> 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.
- KAMPS,M.P., J.E.BUSS and B.M.SEFTON. (1985). Mutation of NH<sub>2</sub>-terminal glycine of p60<sup>src</sup> prevents both myristoylation and morphological transformation.  
Proc. Natl. Acad. Sci. **82** : 4625-4628.
- KAMPS,M.P., J.E.BUSS and B.M.SEFTON. (1986a). Rous sarcoma virus transforming protein lacking myristic acid phosphorylates known polypeptide substrates without inducing transforming.  
Cell **45** : 105-112.

- KAMPS, M.P. and B.M. SEFTON. (1986b). Neither arginine nor histidine can carry out the function of lysine-295 in the ATP-binding site of p60<sup>src</sup>.  
Mol. Cell. Biol. 6 : 751-757.
- 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. 81 : 3000-3004.
- KARESS, R.E. and H. HANAFUSA. (1981). Viral and cellular *src* genes contribute to the structure of recovered avian sarcoma virus transforming protein.  
Cell 24 : 155-164.
- KAWAKAMI, T., C.Y. PENNINGTON and K.C. ROBBINS. (1986). Isolation and oncogenic potential of a novel human *src*-like gene.  
Mol. Cell. Biol. 6 : 4195-4201.
- KEATING, M.T. and L.T. WILLIAMS. (1988). Autocrine stimulation of intracellular PDGF receptors in *v-sis*-transformed cells.  
Science 239 : 914-916.
- KIKUCHI, K. and E.A. NEUWELT. (1983). Presence of immunosuppressive factors in brain-tumor cyst fluid.  
J. Neurosurg 59 : 790-799.
- KING, R.C., M.H. KRAUS and S.A. AARONSON. (1985). Amplification of a novel *v-erbB* related gene in a human mammary carcinoma.  
Science 229 : 974-976.
- KINGSTON, R.E., A.S. BALDWIN Jr and P.A. SHARP. (1985). Transcription control by oncogenes.  
Cell 41 : 3-5.
- KLEIN, G. (1983). Specific chromosomal translocations and the genesis of B-cell-derived tumors in mice and men.  
Cell 32 : 311-315.
- KLEMPNAUER, K.H., G. SYMONDS, G.I. EVAN and J.M. BISHOP. (1984). Subcellular localization of proteins encoded by oncogenes of avian myeloblastosis virus and avian leukemia virus E26 and by the chicken *c-myb* gene.  
Cell 37 : 537-547.
- KLINGER, H.P. and T.B. SHOWS. (1983). Suppression of Tumorigenicity in Somatic Cell Hybrids. II. Human Chromosomes implicated as Suppressors of Tumorigenicity in Hybrids with Chinese Hamster Ovary Cells  
J. Nci 71 : 559-569.
- KLOETZER, W.S., S.A. MAXWELL and R.B. ARLINGHAUS. (1983). P85<sup>gag-mos</sup> encoded by ts110 moloney murine sarcoma virus has an associated protein kinase activity.  
Proc. Natl. Acad. Sci. 80 : 412-416.

- KLOETZER, W.S., S.A. MAXWELL and R.B. ARLINGHAUS. (1984). Further characterization of the P85<sup>ag-mos</sup> associated protein kinase activity.  
Virology **138** : 143-155.
- KMIECIK, T.E. and D. SHALLOWAY. (1987). Activation and suppression of pp60<sup>c-src</sup> 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.
- KOHL, N.E., N. KANDA, R.R. SCHRECK, G. BRUNS, S.A. LATT, F. GILBERT and F.W. ALT. (1983). Transposition and amplification of oncogene related sequences in human neuroblastomas.  
Cell **35** : 359-367.
- 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.
- KONOPKA, J.B. and O.N. WITTE. (1985). Detection of *c-abl* tyrosine kinase activity in vitro permits direct comparison of normal and altered *abl* gene products.  
Mol. Cell. Biol. **5** : 3116-3123.
- 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.
- KREBS, E.G., GRAVES, D.J. and FISHER, E.H. (1959). Factors affecting the activity of muscle phosphorylase b kinase.  
J. Biol. Chem. **234** : 2867-2873.
- 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.
- KRUEGER, J.G., E. WANG and A.R. GOLDBERG. (1979). Evidence that the *src* gene product of Rous sarcoma virus is membrane associated.  
Virology **101** : 25-40.
- KRUEGER, J.G., E. WANG, E.A. GARBER and A.R. GOLDBERG. (1980). Differences in intracellular location of pp60<sup>src</sup> in rat and chicken cells transforming by Rous sarcoma virus.  
Proc. Natl. Acad. Sci. **77** : 4142-4146.
- KRUH, G.D., C. RICHTER KING, M.H. KRAUS, N.C. POPESCU, S.C. AMSBAUGH, W.O. McBRIDE, S.A. AARONSON. (1986). A novel human gene closely related to the *abl* proto-oncogene.  
Science **234** : 1545-1548.
- LAND, H., L.F. PARADA and R.A. WEINBERG. (1983a). Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes.  
Nature **304** : 596-602.
- LAND, H., L.F. PARADA and R.A. WENBERG. (1983b). Cellular Oncogenes and Multistep Carcinogenesis.  
Science **222** : 771-778.

- LEAL, F., L.T.WILLIAMS, K.C.ROBBINS and S.A.AARONSON. (1985). Evidence that the *v-sis* gene product transforms by interaction with the receptor for platelet-derived growth factor. *Science* **230** : 327-330.
- LEE, W., P.MITCHELL and R.TJIAN. (1987). Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. *Cell* **49** : 741-752.
- LEUTZ, A., H.BEUG and T.GRAF. (1984). Purification and characterization of cMGF, a novel chicken myelomonocytic growth factor. *EMBO J.* **3** : 3191-3197.
- LEVINSON, A.D., H.OPPERMANN, L.LEVINTOW, H.E.VARMUS and J.M.BISHOP. (1978). Evidence that the transforming gene of avian sarcoma virus encodes a protein kinase associated with a phosphoprotein. *Cell* **15** : 561-572.
- LEVINSON, A.D., S.A.COURTNEIDGE and J.M.BISHOP. (1981). Structural and functional domains of the Rous sarcoma virus transforming protein (pp60<sup>src</sup>). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78** : 1624-1628.
- LIN, C.R., V.CHEN, W.KRUIGER, L.S.STOLARSKY, W.WEBER, R.M.EVANS, I.M.VERMA, G.N.GILL and M.G.ROSENFELD. (1984). Expression cloning of human EGF receptor complementary DNA : gene amplification and three related messenger RNA products in A431 cells. *Science* **224** : 843-848.
- LINIAL, M. (1982). Two retroviruses with similar transforming genes exhibit differences in transforming potential. *Virology* **119** : 382-391.
- LITTLE, C.D., M.M.NAU, D.N.CARNEY, A.F.GAZDAR and J.D.MINNA. (1983). Amplification and expression of the *c-myc* oncogene in human lung cancer cell lines. *Nature* **306** : 194-196.
- 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.
- 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.
- MARTINEZ, R., B.MATHEY-PREVOT, A.BERNARDS and D.BALTIMORE. (1987). Neuronal pp60<sup>c-src</sup> contains a six-amino acid insertion relative to its non-neuronal counterpart. *Science* **237** : 411-415.
- MAYER, B.J., M.HAMAGUCHI and H.HANAFUSA. (1988). A novel viral oncogene with structural similarity to phospholipase C. *Nature* **332** : 272-284.
- McDONNELL, D.P., D.J.MANGELSDORF, J.W.PIKE, M.R.HAUSSLER and B.W.O'MALLEY. (1987). Molecular cloning of complementary DNA encoding the avian receptor for vitamin D. *Science* **235** : 1214-1217.

- McGRATH, J.P., D.J. CAPON, D.V. GOEDDEL and A.D. LEVINSON. (1984). Comparative biochemical properties of normal and activated human *ras* p21 protein. *Nature* **310** : 644-649.
- 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.
- MOELLING, K.A., 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.
- MORROW, C.D., G.F. GIBBONS and A. DASGUPTA. (1985). The host Protein for in vitro replication of poliovirus is a protein kinase that phosphorylates eucaryotic initiation factor-2. *Cell* **40** : 913-921.
- MOSS, P., K. RADKE, V.C. CARTER, J. YOUNG, T. GILMORE and G. STEVEN. (1984). Cellular localization of the transforming protein of wild-type and temperature-sensitive Fujinami sarcoma virus. *J. Virol.* **52** : 557-565.
- MOUCHES, C., N. PASTEUR, J.B. BERGE, O. HYRIEN, M. RAYMOND, B.R. de SAINT VINCENT, M. de SILVESTRI and G.P. GEORGHIOU. (1986). Amplification of an esterase gene is responsible for insecticide resistance in a California culex mosquito. *Science* **233** : 778-780.
- MOWAT, M., A. CHENG, N. KIMURA, A. BERNSTEIN and S. BENCHIMOL. (1985). Rearrangements of the cellular p53 gene in erythroleukaemic cells transformed by friend virus. *Nature* **314** : 633-636.
- MULLER, R. and D. MULLER. (1984). Co-transfection of normal NIH/3T3 DNA and retroviral LTR sequences : a novel strategy for the detection of potential *c-onc* genes. *EMBO J.* **3** : 1121-1127.
- 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.
- NIGG, E.A., B.M. SEFTON, T. HUNTER, G. WALTER and S.J. SINGER. (1982). Immunofluorescent localization of the transforming protein of Rous sarcoma virus with antibodies against a synthetic *src* peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **79** : 5322-5326.
- NINFA, A.J. and B. MAGASANIK. (1986). Covalent modification of the *glnG* product, NR<sub>I</sub>, by the *glnL* product, NR<sub>II</sub>, regulates the transcription of the *glnALG* operon in *Escherichia Coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83** : 5909-5913.
- NIXON, B.T., C.W. RONSON and F.M. AUSUBEL. (1986). Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes *ntrB* and *ntrC*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83** : 7850-7854.
- NODA, M., Z. SELINGER, E.M. SCOLNICK and R.H. BASSIN. (1983). Flat revertants isolated from Kirsten sarcoma virus-transformed cells are resistant to the action of specific oncogenes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **80** : 5602-5606.

- NODA,M., M.KO, A.OGURA, D.G.LIU, T.AMANO, T.TAKANO and Y.IKAWA. (1985). Sarcoma viruses carrying *ras* oncogenes induce differentiation-associated properties in a neuronal cell line.  
Nature **318** : 73-75
- NODA,M. (1987).  
Oncogene and Cancer 51
- NOWELL,P.C. and D.A.HUNGERFORD. (1960). A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia.  
Science **132** : 1197.
- OHNO,S., H.KAWASAKI, S.IMAJOH and K.SUZUKI. (1987). Tissue-specific expression of three distinct types of rabbit protein kinase C.  
Nature : **325** : 161-166.
- OPPERMAN,H., A.D.LEVINSON, H.E.VARMUS, L.LEVINTOW and J.M.BISHOP. (1979). Uninfected vertebrate cells contain a protein that is closely related to the product of the avian sarcoma virus transforming gene (*src*).  
Proc. Natl. Acad. Sci. **76** : 1804-1808.
- OPPERMAN,H., A.D.LEVINSON and H.E.VARMUS. (1981). The structure and protein kinase activity of proteins encoded by non-conditional mutants and back mutants in the *src* gene of avian sarcoma virus.  
Virology **108** : 47-70.
- OSHIMURA,M., T.M.GILMER and J.C.BARRET. (1985). Nonrandom loss of chromosome 15 in syrian hamster tumours induced by *v-ha-ras* plus *v-myc* oncogenes.  
Nature **316** : 636-639.
- OWEN,A.J., P.PANTAZIS and H.N.ANTONIADES. (1984). Simian sarcoma virus-transformed cells secrete a mitogen identical to platelet-derived growth factor.  
Science **225** : 54-56.
- 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.
- PALMIERI,S. and M.L.VOGEL. (1987). Fibroblast transformation parameters induced by the avian *v-mil* oncogene.  
J. Virol. **61** : 1717-1721.
- PARADA,L.F., H.LAND, R.A.WEINBERG, D.WOLF and V.ROTTER. (1984). Cooperation between gene encoding p53 tumour antigen and *ras* in cellular transformation.  
Nature **312** : 649-651.
- 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.
- 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<sup>v-src</sup> and pp60<sup>c-src</sup>.  
Cell **37** : 131-139.
- PATHAK,S., L.C.STRONG, R.E.FERRELL and A.TRINDADE. (1982). Familial renal cell carcinoma with a 3;11 chromosome translocation limited to tumor cells.  
Science **217** : 939-941.

- 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., B. SCHROEER and K. BISTER. (1986). Protein product of proto-oncogene *c-mil*. *Mol. Cell. Biol.* **6** : 739-744.
- PAYNE, G. S., J. M. BISHOP and H. E. VARMUS. (1982). Multiple arrangements of viral DNA and an activated host oncogene in bursal lymphomas. *Nature* **295** : 209-215.
- PELLMAN, D., E. A. GARBER, F. R. CROSS and J. HANAFUSA. (1985). An N-terminal peptide from p60<sup>src</sup> can direct myristylation and plasma membrane localization when fused to heterologous proteins. *Nature* **314** : 374-377.
- PETERS, G., A. E. LEE and C. DICKSON. (1986). Concerted activation of two potential proto-oncogenes in carcinomas induced by mouse mammary tumour virus. *Nature* **320** : 628-631.
- 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<sup>c-src</sup>. *Cell* **49** : 75-82.
- PRIVALSKY, M. L., L. SEALY, J. M. BISHOP, J. P. McGRATH and A. D. LEVINSON. (1983). The product of the avian erythroblastosis virus *erbB* locus is a glycoprotein. *Cell* **32** : 1257-1267.
- PRIVALSKY, M. L. and J. M. BISHOP. (1984). Subcellular localization of the *v-erb-B* protein, the product of a transforming gene of avian erythroblastosis virus. *Virology* **135** : 356-368.
- RABBITTS, T. H., P. H. HAMLYN and R. BAER. (1983). Altered nucleotide sequences of a translocated *c-myc* gene in Burkitt lymphoma. *Nature* **306** : 760-765.
- RAISNES, M. A., W. C. LEWIS, L. B. CRITTENDEN and H. J. KUNG. (1985). *c-erbB* activation in avian leukemia virus-induced erythroblastosis: clustered integration sites and the arrangement of provirus in *c-erbB* alleles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82** : 2287-2291.
- RAMSAY, G., M. J. HAYMAN and K. BISTER. (1982). Phosphorylation of specific sites in the *gag-myc* polyproteins encoded by MC29-type viruses correlates with their transforming ability. *EMBO J.* **1** : 1111-1116.
- 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.
- REDDY, E. P., R. K. REYNOLDS, E. SANTOS and M. BARBACID. (1982). A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. *Nature* **300** : 149-152.
- RIJSEWIJK, F., M. SCHUERMAN, E. WAGENAAR, P. PARREN, D. WEIGEL and R. NUSSE. (1987). The drosophila homolog of the mouse mammary oncogene *int1* is identical to the segment polarity gene *wingless*. *Cell* **50** : 649-657.

- ROBBINS, K.C., H.N. ANTONIADES, S.G. DEVARE, M.W. HUNKAPILLER and S.A. AARONSON. (1983). Structural and immunological similarities between simian sarcoma virus gene product(s) and human platelet-derived growth factor. *Nature* **305** : 605-608.
- ROHRSCHEIDER, L.R. (1980). Adhesion plaques of Rous sarcoma virus-transformed cells contain the *src* gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **77** : 3514-3518.
- ROSZMAN, T.L. and W.H. BROOKS. (1980). Immunobiology of primary intra cranial tumors 3. Demonstration of a qualitative lymphocyte abnormality in patients with primary brain tumors. *Clin. Exp. Immunol.* **39** : 395-402.
- 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<sup>src</sup> and increases pp60<sup>src</sup> kinase activity. *J. Biol. Chem.* **258** : 10768-10773.
- RULEY, H.E. (1983). Adenovirus early region 1A enables viral and cellular transforming genes to transform primary cells in culture. *Nature* **304** : 602-606.
- SANCAR, A., C. STACHELEK, W. KONIGSBERG and W.D. RUPP. (1980). Sequences of the *recA* gene and protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **77** : 2611-2615.
- SAN HUANG, J., 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.
- SAP, J., A. MUNOZ, K. DAMM, Y. GOLDBERG, J. GHYSDAEL, A. LEUTZ, H. BEUG and B. VENNSTROM. (1986). The *c-erb-A* protein is a high-affinity receptor for thyroid hormone. *Nature* **324** : 635-640.
- 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.
- SCHIEVEN, G., J. THORNER and G.S. MARTIN. (1986). Protein-tyrosine kinase activity in *saccharomyces cerevisiae*. *Science* **231** : 390-393.
- SCHIMKE R.T. (1984). Gene amplification in cultured animal cells. *Cell* **37** : 705-713.
- SCHULTZ, A.M. and S. OROSZLAN. (1984). Myristylation of *gag-onc* fusion proteins in mammalian transforming retrovirus. *Virology* **133** : 431-437.
- SCHULTZ, A.M., D.D. COPELAND, G.E. MARK, U.R. RAPP and S. OROSZLAN. (1985). Detection of the myristylated *gag-raf* transforming protein with *raf*-specific antipeptide sera. *Virology* **146** : 78-89.
- SCHWAB, M., K. ALITALO, K.H. KLEMPNAUER, H. VARMUS, J.M. BISHOP, F. GILBERT, G. BRODEUR, M. GOLDSTEIN and J. TRENT. (1983). Amplified DNA with limited homology to *myc* oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumor. *Nature* **305** : 245-248.
- SEEBURG, P.H., W.W. COLBY, D.J. CAPON, D.V. GOEDDEL and A.D. LEVINSON. (1984). Biological properties of human *c-Ha-ras* genes mutated at codon 12. *Nature* **312** : 71-75.

- SEFTON, B.M., I.S. TROWBRIDGE and J.A. COOPER. (1982). The transforming proteins of Rous sarcoma virus, Harvey sarcoma virus and Abelson virus contain tightly bound lipid. *Cell* **31** : 465-474.
- SEIZINGER, B.R., G.A. ROULEAU, L.J. OZELIUS, A.H. LANE, G.E. FARMER, J.M. LAMIELL, J. HAINES, J.W.M. YUEN, D. COLLINS, D. MAJOUR-KRAKAUER, T. BONER, C. MATHEW, A. RUBENSTEIN, J. HALPERIN, A. McCONKIE-ROSELL, J.S. GREEN, J.A. TROFATTER, B.A. PONDER, L. EIERMAN, M.I. BOWMER, R. SCHIMKE, B. OOSTRA, N. ARONIN, D.I. SMITH, H. DRABKIN, M.H. WAZIRI, W.J. HOBBS, R.L. MARTUZA, P.M. CONEALLY, Y.E. HSIA and J.F. GUSELLA. (1988). Von hippel-lindau disease maps to the region of chromosome 3 associated with renal cell carcinoma. *nature* **332** : 268-269.
- SEMBA, K., M. NISHIZAWA, N. MIYAJIMA, M.C. YOSHIDA, J. SUKEGAWA, Y. YAMANASHI, M. SASAKI, T. YAMAMOTO and K. TOYOSHIMA (1986). *yes*-related protooncogenes, *syn*, belongs to the protein-tyrosine kinase family. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83** : 5459-5463.
- 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.
- SHEN-ONG, G.L., E.J. KEATH, S.P. PICCOLI and M.D. COLE (1982). Novel *myc* oncogene RNA from abortive immunoglobulin-gene recombination in mouse plasmacytomas. *Cell* **31** : 443-452.
- SHEN-ONG, G.L.C., H.C. MORSE III, M. POTTER and F. MUSHINSKI. (1986). Two modes of *c-myb* activation in virus-induced mouse myeloid tumors. *Mol. Cell. Biol.* **6** : 380-392.
- SHIMIZU, K., M. GOLDFARB, M. PERUCHO and M. WIGLER. (1983a). Isolation and preliminary characterization of the transforming gene of a human neuroblastoma cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **80** : 383-387.
- SHIMIZU, K., D. BIRNBAUM, M.A. RULEY, O. FASANO., Y. SUARD, L. EDLUND, E. TAPAROWSKY, M. GOLDFARB and M. WIGLE. (1983b). Structure of the *Ki-ras* gene of the human lung carcinoma cell line Calu-1. *Nature* **304** : 497-500.
- SHIMIZU, K., M. GOLDFARB, Y. SUARD, M. PERUCHO, Y. LI, T. KAMATA, J. FERAMISCO, E. STAVNEZER, J. FOGH and M.H. WIGLER. (1983c). Three human transforming genes are related to the viral *ras* oncogenes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **80** : 2112-2116.
- SHIMIZU, K., Y. NAKATSU, M. SEKIGUCHI, K. HOKAMURA, K. TANAKA, M. TERADA and T. SUGIMURA. (1985). Molecular cloning of an activated human oncogene, homologous to *v-raf*, from primary stomach cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82** : 5641-5645.
- SHOJI, S., D.C. PARMELEE, R.D. WADE, S. KUMAR, L.H. ERICSSON, K.A. WALSH, H. NEURATH, G.L. LONG, J.G. DEMAILLE, E.H. FISCHER and K. TITANI. (1981). Complete amino acid sequence of the catalytic subunit of bovine cardiac muscle cyclic AMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78** : 848-851.
- SHTIVELMAN, E., B. LIFSHITZ, R.P. GALE and E. CANAANI. (1985). Fused transcript of *abl* and *bcr* genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature* **315** : 550-554.
- SHTIVELMAN, E., B. LIFSHITZ, R.P. GALE, B.A. ROE and E. CANAANI. (1986). Alternative splicing of RNAs transcribed from the human *abl* gene and from the *bcr-abl* fused gene. *Cell* **47** : 277-284.

- SMART, J.E., H. OPPERMANN, A.P. CZERNILOFSKY, A.F. PURCHIO, R.L. ERIKSON and J.M. BISHOP. (1981). Characterization of sites for tyrosine phosphorylation in the transforming protein of Rous sarcoma virus (pp60<sup>v-src</sup>) and its normal cellular homologue (pp60<sup>c-src</sup>). *proc. Natl. Acad. Sci.* **78** : 6013-6017.
- SMITH, D.L., C.C. CHEN, B.B. BRUEGGER, S.L. HOLTZ, R.M. HALPERN and R.A. SMITH. (1974). Characterization of protein kinases forming acid-labile histone phosphates in Walker-256 carcinosarcoma cells nuclei. *Biochemistry* **13** : 3780-3785.
- SMITH, R., G. PETERS and C. DICKSON. (1988). Multiple RNAs expressed from the *int2* gene in mouse embryonal carcinoma cell lines encode a protein with homology to fibroblast growth factors. *EMBO J.* **7** : 1013-1022.
- 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<sup>v-src</sup>. *Cell* **32** : 891-901.
- SNYDER, M.A. and J.M. BISHOP. (1983). A mutation at the major phosphotyrosine in pp60<sup>v-src</sup> 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<sup>v-src</sup> abolishes kinase activity, transformation, and tumorigenicity. *Mol. Cell. Biol.* **5** : 1772-1779.
- SPRADLING, A.C. and A.P. MAHOWALD. (1980). Amplification of genes for chorion proteins during oogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **77** : 1096-2002.
- STAHL, M.L., C.R. FERENZ, K.L. KELLEHER, R.W. KRIZ and J.L. KNOPF. (1988). Sequence similarity of phospholipase C with the non-catalytic region of *src*. *Nature* **332** : 269-272.
- 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.
- 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.
- STRUHL, K. (1987). The DNA binding domains of the *jun* oncoprotein and the yeast CGN4 transcriptional activator protein are functionally homologous. *Cell* **50** : 841-846.,,0000
- SUTRAVE, P., T.I. BONNER, U.R. RAPP, H.W. JANSEN, T. PATSCHINSKY and K. BISTER. (1984). Nucleotide sequence of avian retroviral oncogene *v-mil* : homologue of murine retroviral oncogene *v-raf*. *Nature* **309** : 85-88.
- SWEET, R.W., S. YOKOYAMA, T. KAMATA, J.R. FERAMISCO, M. ROSENBERG and M. CROSS. (1984). The product of *ras* is a GTPase and the T24 oncogenic mutant is deficient in this activity. *Nature* **311** : 273-275.

- TABIN,C.J., S.M.BRADLEY, C.I.BARGMANN, R.A.WEINBERG, A.G.PAPAGEORGE, E.M.SCOLNICK, R.DHAR, D.R.LOWY and E.H.CHANG. (1982). Mechanism of activation of a human oncogene.  
Nature **300** : 143-149.
- TAKEYA,T. and H.HANAFUSA. (1983). DNA sequence of the cellular gene homologous to the RSV *src* gene and the mechanism for generating the transforming virus.  
Cell **32** : 881-890.
- TAPAROWSKY,E., Y.SUARD, O.FASANO, K.SHIMIZU, M.GOLDFARB and M.WIGLER. (1982). Activation of the T24 bladder carcinoma transforming gene is linked to a single amino acid change.  
Nature **300** : 762-765.
- TAUB,R., C.MOULDING, J.BATTEY, W.MURPHY, T.VASICEK, G.M.LENOIR and P.LEDER. (1984). Activation and somatic mutation of the translocated *c-myc* gene in Burkitt lymphoma cells.  
Cell **36** : 339-348.
- 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.MULLER and I.M.VERMA. (1983). Analysis of FBJ-MuSV provirus and *c-fos* (mouse) gene reveals that viral and cellular *fos* gene products have different carboxy termini.  
Cell **32**: 1241-1255.
- VERMA,I.M. (1986). Proto-oncogene *fos* : a multifaceted gene.  
Trends. Genet. **9** : 93-96.
- WALSH,D.A., J.P.PERKINS and E.G.KREBS. (1968). An adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent protein kinase from rabbit skeletal muscle.  
J. Biol. Chem. **243** : 3763-3765.
- WALTHER,N., R.LURZ, T.PATSCHINSKY, H.W.JANSEN and K.BISTER. (1985). Molecular cloning of proviral DNA and structural analysis of the transduced *myc* oncogene of avian oncovirus CMII.  
J.Virol. **54** : 576-585.
- 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.
- WATERFIELD,M.D., G.T.SCRACE, N.WHITTLE, P.STROOBANT, A.JOHNSON, A.WASTESON, B.WESTERMARK, C.H.HELDIN, J.S.HUANG and T.F.DEUEL. (1983). Platelet derived growth factor is structurally related to the putative transforming protein p28<sup>sis</sup> of simian sarcoma virus.  
Nature **304** : 35-39.
- WEINBERG,R.A. (1984). Une Base Moléculaire du Cancer.  
Pour la Science - Janvier : 12-26.
- WEINBERGER,C., S.M.HOLLENBERG, M.G.ROSENFELD and R.M.EVANS. (1985). Domain structure of human glucocorticoid receptor and its relationship to the *v-erbA* oncogene product.  
Nature **318** : 670-672.

- WEINBERGER,C., C.C.THOMPSON, E.S.ONG, R.LEBO, D.J.GRUOL and R.M.EVANS. (1987).The *c-erbA* gene encodes a thyroid hormone receptor.  
Nature 324 : 641- 646.
- WEINMASTER,G., E.HINZE and T.PAWSON. (1983). Mapping of multiple phosphorylation sites within the structural and catalytic domains of the Fujinami avian sarcoma virus transforming protein.  
J.Virol. 46 : 29-41.
- WEINMASTER,G., M.J.ZOLLER, M.SMITH, E.HINZE and T.PAWSON. (1984). Mutagenesis of Fujinami sarcoma virus : Evidence that tyrosine phosphorylation of P130<sup>gag-fps</sup> 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<sup>gag-fps</sup> is essential for protein-tyrosine kinase activity.  
EMBO J. 5 : 69-76.
- WEINTRAUB,H., H.BEUG, M.GROUDINE and T.GRAF. (1981). Temperature-sensitive changes in the structure of globin chromatin in lines of red cell precursors transformed by ts-AEV.  
Cell 28 : 931-940.
- WEISSMAN,B.E. and E.J.STANBRIDGE. (1983). Complementation of the tumorigenic phenotype in human cell hybrids.  
J.N.C.I. 70 : 667-672.
- WEISSMAN,B.E., P.J.SAXON, S.R.PASQUALE, G.R.JONES, A.G.GEISER and E.J.STANBRIDGE. (1987). Introduction of a normal human chromosome 11 into a wilm's tumor cell line controls its tumorigenic expression.  
Science 236 : 175-180.
- WESTAWAY,D., J.PAPKOFF, C.MOSCOVICI and H.E.VARMUS. (1986). Identification of a provirally activated *c-ha-ras* oncogene in an avian nephroblastoma via a novel procedure : cDNA cloning of a chimaeric viral-host transcript.  
EMBO J. 5 : 301-309.
- 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.
- WHANG PENG,J., C.S.KAO-SHAN, E.C.LEE, P.A.BUNN, D.N.CARNEY, A.F.GAZDAR and J.D.MINNA. (1982). Specific chromosome defect associated with human small-cell lung cancer : deletion 3p (14-23).  
Science 215 : 181-182.
- WHEELER,E.F., M.F.ROUSSEL, A.HAMPE, M.H.WALKER, V.A.FRIED, A.T.LOOK, C.W.RETTENMIER and C.J.SHERR. (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.
- WIERENGA,R.K. and W.G.J.HOL. (1983). Predicted nucleotide-binding properties of p21 protein and its cancer-associated variant.  
Nature 302 : 842-844.
- WILLINGHAM,M.C., G.JAY and I.PASTAN. (1979). Localization of the ASV *src* gene product to the plasma membrane of transformed cells by electron microscopic immunocytochemistry.  
Cell 18 : 125-134.

- WILLINGHAM, M.C., I.PASTAN, T.YSHIH and E.M.SCOLNICK. (1980). Localization of the *src* gene product of the Harvey strain of MSV to plasma membrane of transformed cells by electron microscopic immunocytochemistry.  
Cell 19 : 1005-1014.
- WILLUMSEN, B.M., A.CHRISTENSEN, N.L.HUBBERT, A.G.PAPAGEORGE and D.R.LOWY. (1984a). The p21<sup>ras</sup> c-terminus is required for transformation and membrane association.  
Nature 310: 583-586.
- WILLUMSEN, B.M., K.NORRIS, A.G.PAPAGEORGE, N.L.HUBBERT and D.R.LOWY. (1984b). Harvey murine sarcoma virus p21 *ras* protein : biological and biochemical significance of the cysteine nearest the carboxy terminus.  
EMBO J. 3 : 2581-2585.
- WOLF, D., N.HARRIS and V.ROTTER. (1984). Reconstitution of p53 expression in a nonproducer Ab-MuLV-transformed cell line by transfection of a functional p53 gene.  
Cell 38 : 119-126.
- WOOD, J.G., P.R.GISARD, G.J.MAZZEI and J.F.KUO. (1986). Immunocytochemical localization of protein kinase C in identified neuronal compartments of rat brain.  
J.Neurosci. 6 : 2571-2577.
- WRANN, M., S.BODMER, R.de MARTIN, C.SIEPL, R.HOFER-WARBINEK, K.FREI, E.HOFER and A.FONTANA. (1987). T cell suppressor factor from human glioblastoma cells is a 12.5-kd protein closely related to transforming growth factor- $\beta$ .  
EMBO J. 6 : 1633-1636.
- 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.
- YMER, S., W.Q.J.TUCKER, C.J.SANDERSON, A.J.HAPEL, H.D.CAMPBELL and I.G.YOUNG. (1985). Constitutive synthesis of interleukine 3 by leukaemia cell line WEHI-3B is due to retroviral insertion near the gene.  
Nature 317 : 255-258.
- YOUNG, D., G.WAITCHES, C.BIRCHMEIER, O.FASANO and M.WIGLER. (1986). Isolation and characterization of a new oncogene encoding a protein with multiple potential cellular transmembrane domains.  
Cell 45 : 711-719.
- XU, Y.H., S.ISHII, A.J.L.CLARK, M.SULLIVAN, R.K.WILSON, D.P.MA, B.A.ROE, G.T.MERLINO and I.PASTAN. (1984). Human epidermal growth factor receptor cDNA is homologous to a variety of RNAs overproduced in A431 carcinoma cells.  
Nature 309 : 806-810.
- ZOLLER, M.J. and M.SMITH. (1982). Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13 derived vectors : an efficient and general procedure for the production of point mutations in any fragment of DNA  
Nucleic Acid Res. 10 : 6487-6500

ANNEXE

ARTICLE 1  
paru dans l'EMBO Journal

## Replacement of lys 622 in the ATP binding domain of P100<sup>gag-mil</sup> abolishes the *in vitro* autophosphorylation of the protein and the biological properties of the *v-mil* oncogene of MH2 virus

F. Denhez, B. Heimann<sup>1</sup>, L. d'Auriol<sup>2</sup>, T. Graf<sup>3</sup>, M. Coquillaud<sup>4</sup>, J. Coll, F. Galibert<sup>2</sup>, K. Moelling<sup>1</sup>, D. Stehelin and J. Ghysdael

CNRS UA 04 1160/INSERM U 186, Institut Pasteur, 1 rue Calmette, 59019 Lille Cedex, France. <sup>1</sup>Max Planck Institut, Ihnestrasse, D1000 Berlin 33, FRG, <sup>2</sup>Hôpital St Louis, Centre Hayem, 75475 Paris, France, <sup>3</sup>EMBL, 1 Meyerhofstrasse D6900 Heidelberg, FRG, and <sup>4</sup>INSERM U 124, CHR, Lille, France

Communicated by D. Stehelin

Lysine 622 in the ATP-binding domain of P100<sup>gag-mil</sup>, the translation product of the *v-mil* oncogene of MH2, has been replaced with methionine using oligonucleotide site-directed mutagenesis. This substitution results in the inactivation of the serine/threonine-specific autophosphorylation of P100<sup>gag-mil</sup> *in vitro*, indicating that this activity is an intrinsic property of the viral protein. This substitution also suppresses two of the biological properties of MH2 which have previously been shown to be dependant upon the expression of *v-mil*, namely, the production of chicken myelomonocytic growth factor (cMGF) by *v-myc*-transformed chicken macrophages and the sustained proliferation of chicken neuroretina cells. These data strongly suggest that the biological properties of *v-mil* are mediated by the phosphorylation at serine/threonine residues of key cellular substrates. In contrast to the *in vitro* situation, both the mutant and wild-type proteins appear to be phosphorylated at the same sites and to the same extent in either transformed fibroblasts or macrophages. This, together with the fact that the sites phosphorylated *in vivo* and *in vitro* are essentially different indicate that most of the phosphate associated with P100<sup>gag-mil</sup> in transformed cells does not result from an obligate autophosphorylation event but from the phosphorylation by as yet uncharacterized cellular kinase(s).

**Key words:** *v-mil* oncogene/protein kinase/protein phosphorylation

### Introduction

Avian *v-myc*-containing retroviruses induce leukemias, sarcomas and carcinomas in chickens and transform fibroblasts and macrophages in tissue culture (for review, see Graf and Beug, 1978). The Mill Hill No.2 (MH2) retrovirus is unique among these viruses because its genome contains, in addition to *v-myc*, an additional oncogene, *v-mil* (Coll *et al.*, 1983; Jansen *et al.*, 1983; Kan *et al.*, 1983). The presence of *v-mil* confers an increased tumorigenicity of MH2 compared to viruses containing *v-myc* as sole oncogene (Linial *et al.*, 1982; Graf *et al.*, 1986). Expression of *v-mil* also confers a distinct phenotype to MH2-transformed cells in culture. Macrophages transformed by *v-myc* require the

presence of chicken myelomonocytic growth factor (cMGF) for their growth (Leutz *et al.*, 1984). Expression of *v-mil* in these cells induces the production of cMGF and their growth in an autocrine fashion (Graf *et al.*, 1986). Viruses containing only the *v-mil* oncogene are able to induce a partially transformed phenotype to chicken embryo fibroblasts (Palmieri and Vogel, 1987) and the sustained proliferation of normally quiescent chicken embryo neuroretina (NR) cells (Bechade *et al.*, 1985).

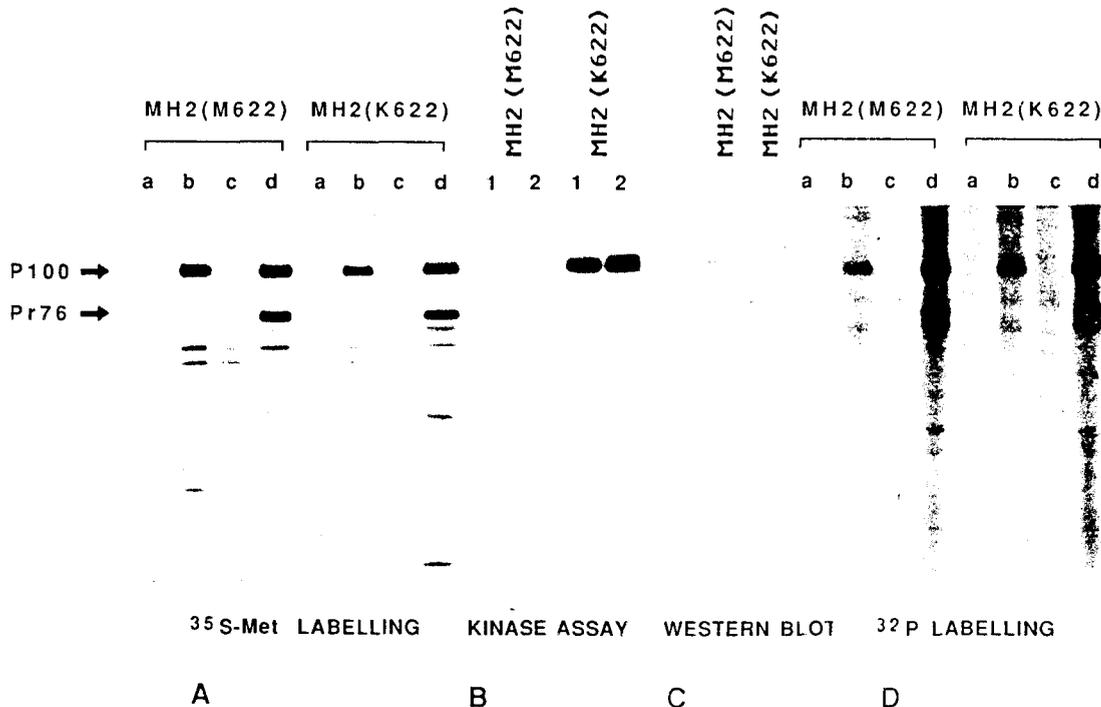
The mammalian equivalent of the chicken cellular progenitor of *v-mil* (*c-mil*) is *c-raf-1* (Rapp *et al.*, 1983). Truncated versions of *c-raf-1* isolated either from various human tumors (Shimizu *et al.*, 1985; Fukui *et al.*, 1985; Ishikawa *et al.*, 1986) or as part of the *v-raf* oncogene of mouse sarcoma virus 3611 (Jansen *et al.*, 1983; Kan *et al.*, 1984; Rapp *et al.*, 1983) have been found to fully transform mouse fibroblast cell lines *in vitro*.

The *v-mil* oncogene of MH2 is expressed as the carboxy-terminal domain of a 100-kd cytosolic protein which derived its amino-terminal region from a partial viral *gag* gene (Hu *et al.*, 1978; Ramsay *et al.*, 1982; Bunte *et al.*, 1983). The amino acid sequence of *v-mil*, predicted from DNA sequence data, shows an important homology with members of the *src* gene family of tyrosine kinases (Galibert *et al.*, 1984). Immunopurified P100<sup>gag-mil</sup>, however, fails to display tyrosine-specific kinase activity but is associated with an apparent autophosphorylating activity specific of serine and threonine residues (Moelling *et al.*, 1984).

In view of (i) the abundance of serine/threonine kinases in cells, (ii) the fact that even the highly purified preparations of P100<sup>gag-mil</sup> used in the *in vitro* phosphorylation assays are still contaminated by cellular kinases (unpublished observations), and (iii) the fact that the sites phosphorylated *in vitro* in P100<sup>gag-mil</sup> are different from those observed *in vivo* (see Results), additional experimental evidence is clearly needed to ascertain the intrinsic nature of the protein kinase activity associated with P100<sup>gag-mil</sup>.

In all known protein kinases there exists a glycine-rich region located 13-22 residues to the N-terminal side of a lysine residue. Since ATP analogs specifically react with this lysine residue in both the cAMP-dependent protein kinase (lysine 72; Zoller *et al.*, 1981) and pp60<sup>src</sup> (lysine 295; Kamps *et al.*, 1984) with the concomitant loss of the activity of these enzymes, this residue is believed to be instrumental in ATP binding by these kinases. Consistent with this view, site-directed mutagenesis of this residue in several tyrosine-specific kinases has been shown to abolish the activity of these enzymes (Snyder *et al.*, 1985; Kamps and Sefton, 1986; Weinmaster *et al.*, 1986; Chou *et al.*, 1987).

We show here that the substitution of lysine 622 in P100<sup>gag-mil</sup>, which is the homolog of lysine 295 of pp60<sup>src</sup>, for methionine suppresses both the *in vitro* autophosphorylating activity and the biological properties of *v-mil*. We also present evidence that most of the phosphate associated with P100<sup>gag-mil</sup> *in vivo* in either MH2-transformed fibroblasts or



**Fig. 1.** Expression, phosphorylation and autophosphorylating activity of wild-type and mutant P100<sup>gag-mil</sup>. **Panel A:** fibroblasts transformed by either wild-type MH2 (K622) or the mutant MH2 (M622) were metabolically labeled for 24 h with 100- $\mu$ Ci/ml of L-[<sup>35</sup>S]methionine in a medium containing 5% of its normal methionine content. After lysis, immunoprecipitations were carried out with (a) non-immune serum, (b) anti-mil serum, (c) anti-mil serum adsorbed with an excess of bacterially expressed mil protein, (d) anti-gag serum. Immunoprecipitated proteins were separated on a polyacrylamide-SDS slab gel followed by fluorography. **Panel B:** fibroblasts transformed by either wild-type MH2 (K622) or the mutant MH2 (M622) were lysed and P100<sup>gag-mil</sup> proteins were purified by affinity chromatography. *In vitro* autophosphorylation assays were carried out for 5 min (lane 1) and 10 min (lane 2) as described in Materials and methods. **Panel C:** analysis by Western blot of the level of MH2 (K622) and MH2 (M622) P100<sup>gag-mil</sup> used in the autophosphorylation assay of panel B. **Panel D:** fibroblasts transformed with either wild-type MH2 (K622) or the mutant MH2 (M622) were metabolically labeled for 24 h with 1 mCi/ml of [<sup>32</sup>P]-orthophosphate in MEM medium containing 10% of its normal phosphate content and 5% of dialyzed calf serum. After lysis, immunoprecipitations were carried out with (a) non-immune serum, (b) anti-mil serum, (c) anti-mil serum adsorbed with an excess of bacterially expressed mil protein, (d) anti-gag serum.

macrophages results from the phosphorylation by cellular kinases.

## Results

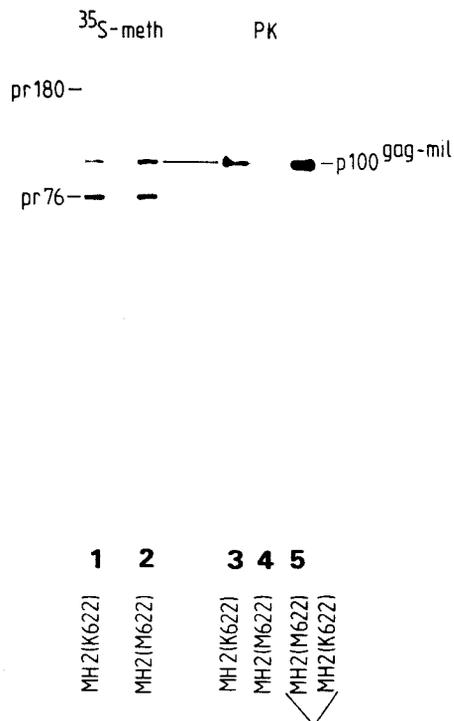
Using oligonucleotide-directed mutagenesis, the AAA codon for lysine 622 in the P100<sup>gag-mil</sup> protein encoded by a biologically active molecular clone of an MH2 provirus (pMH2LI777) was replaced with an ATG coding for methionine. Infectious wild-type MH2 (K622) and mutant MH2 (M622) viruses were rescued from *v-myc*-transformed foci after transfection of quail embryo fibroblasts with the corresponding plasmids together with a plasmid containing a helper RAV1 provirus.

Expression of P100<sup>gag-mil</sup> in transformed cells was analyzed by immunoprecipitation of metabolically labeled cells and by Western blotting using a *gag*-specific antiserum or a *v-mil*-specific antiserum. The *v-mil*-specific antiserum used in this study has been obtained from rabbits immunized with a bacterially expressed *v-mil* protein (see Materials and methods). The results of both types of analyses show that cells infected with either MH2 (K622) or MH2 (M622) contained similar amounts of P100<sup>gag-mil</sup> (Figure 1A). This indicates that substitution of lysine 622 for methionine does not affect the stability of the mutant P100<sup>gag-mil</sup> as compared to the wild-type protein in transformed cells.

We next compared the ability of immunoaffinity-purified wild-type and mutant P100<sup>gag-mil</sup> to become phosphorylated

*in vitro*. As previously described (Moelling *et al.*, 1984), incubation of immunobeads containing wild-type P100<sup>gag-mil</sup> in the presence of MnCl<sub>2</sub> and [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP results in a time-dependent phosphorylation of P100<sup>gag-mil</sup> at both serine and threonine residues (Figure 1B). In contrast to these results, incubation of immunobeads containing a similar amount (Figure 1C) of P100<sup>gag-mil</sup> isolated from MH2 (M622)-transformed cells did not demonstrate any significant autophosphorylating activity (Figure 1B). The inability of MH2 (M622)-encoded P100<sup>gag-mil</sup> to become phosphorylated in these *in vitro* phosphotransfer reactions is not due to its inability to act as a phosphoacceptor since it can be phosphorylated when used *in trans* as a substrate for wild-type P100<sup>gag-mil</sup> (Figure 2). We conclude from these results that replacement of lysine 622 in the putative ATP binding site of P100<sup>gag-mil</sup> abolishes the autophosphorylating activity of P100<sup>gag-mil</sup> *in vitro*, strongly suggesting that this activity is an intrinsic property of P100<sup>gag-mil</sup>.

Wild-type P100<sup>gag-mil</sup> is heavily phosphorylated in MH2-transformed fibroblasts labeled *in vivo* with [<sup>32</sup>P]-orthophosphate (Figure 1, panel D). Comparison of the two-dimensional tryptic phosphopeptides maps of Pr76<sup>gag</sup> and P100<sup>gag-mil</sup> shows that most of the phosphate associated with P100<sup>gag-mil</sup> (mostly as phosphoserine, Figure 3, panel H) is found in three major *v-mil*-specific phosphopeptides (Figure 3, compare panel A and panel C and mixing experiment in panel D). The other phosphopeptides are also found in the maps of Pr76<sup>gag</sup> (Figure 3, panel C) and are therefore con-



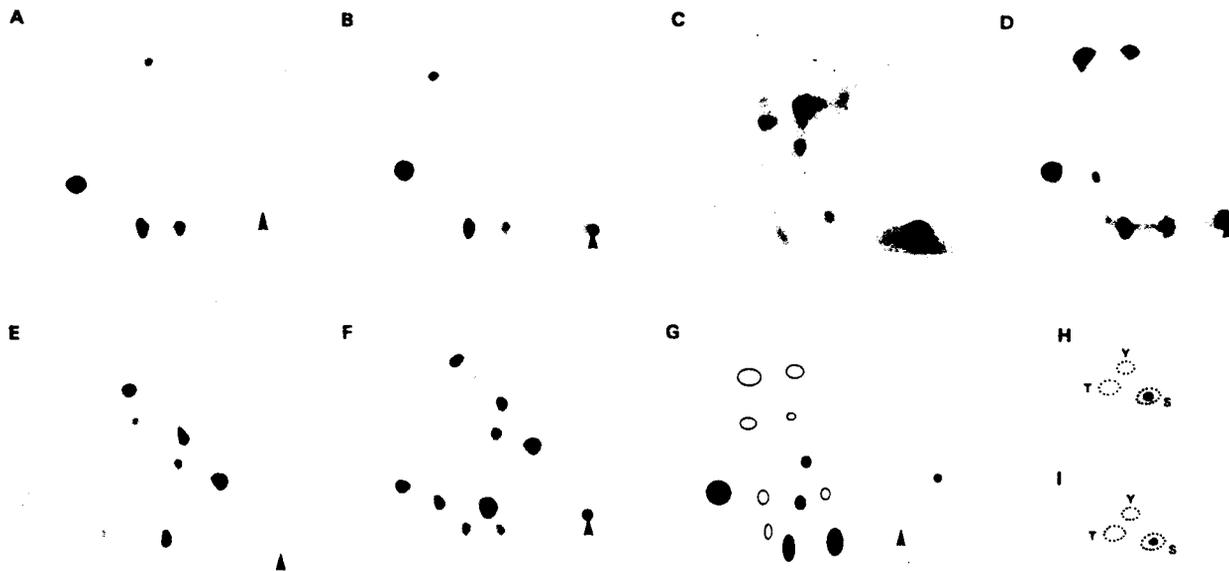
**Fig. 2.** Transphosphorylation of MH2 (M622) P100<sup>gag-mil</sup> by MH2 (K622) P100<sup>gag-mil</sup>. Lysates corresponding to the same number of cells transformed by either MH2 (K622) or MH2 (M622) were chromatographed singly or in combination and autophosphorylation reactions performed as described in Materials and methods. Lane 3, MH2 (K622) lysate; lane 4, MH2 (M622) lysate; lane 5, mixture (1:1) of MH2 (K622) and MH2 (M622) lysates. Steady state levels of P100<sup>gag-mil</sup> were estimated by immunoprecipitations of lysates of [<sup>35</sup>S]methionine labeled MH2 (K622) (lane 1) and MH2 (M622) (lane 2)-transformed cells.

tributed by the aminoterminal p19<sup>gag</sup> domain of P100<sup>gag-mil</sup>.

Comparison of the tryptic phosphopeptide maps of wild-type P100<sup>gag-mil</sup> phosphorylated *in vivo* and *in vitro* shows that none of the major *in vitro* labeled phosphopeptides correspond to those detected *in vivo* (Figure 3, compare panels A and E and mixing experiment in panel F). It should be noted however that long exposures of the autoradiograms of the phosphopeptides maps of *in vitro* labeled P100<sup>gag-mil</sup> show a low level of radioactivity associated with the *v-mil*-specific peptide identified *in vivo*. In cells transformed by MH2 (M622), P100<sup>gag-mil</sup> is phosphorylated to the same extent (Figure 1, panel D) and at the same sites (Figure 3, compare panels A and B) as it is in cells transformed by wild-type MH2 (K622). Similar data were obtained for wild-type and mutant proteins isolated from transformed macrophages instead of fibroblasts (data not shown). We conclude from these experiments that most (if not all) of the phosphate associated with P100<sup>gag-mil</sup> in MH2-transformed cells does not result from an obligate autophosphorylation event but rather from the phosphorylation by cellular kinases(s).

Previous experiments have demonstrated that the expression of *v-mil* induces the production of cMGF and autocrine growth of *v-myc*-transformed macrophages (Graf *et al.*, 1986) and the sustained growth of normally quiescent chicken NR cells (Bechade *et al.*, 1985). The results of Figure 4 and Table I show that 10 out of 10 individual colonies of macrophages transformed by MH2 (K622) or by a standard MH2 stock grew independently of exogenous cMGF. In contrast, all macrophage clones transformed by MH2 (M622) required exogenous cMGF for growth and were, in that respect, indistinguishable from clones transformed by MC29, a virus containing *v-myc* as sole oncogene (Figure 4 and Table I).

We next compared the growth of 7-day-old chicken em-



**Fig. 3.** Two-dimensional tryptic phosphopeptide analysis of *in vivo* and *in vitro* phosphorylated wild-type and mutant P100<sup>gag-mil</sup>. Fibroblasts transformed by either wild-type MH2 (K622), mutant (M622) and RAV-1 helper virus were metabolically labeled with [<sup>32</sup>P]orthophosphate and P100<sup>gag-mil</sup> and Pr76<sup>gag</sup> were isolated from gels similar to those of Figure 1. After trypsin digestion, the resulting peptides were separated in two-dimensions using electrophoresis at pH 2.1 (anode to the right and cathode to the left) and chromatography. A, *in vivo* phosphorylated P100<sup>gag-mil</sup> of wild-type MH2 (K622); B, *in vivo* phosphorylated P100<sup>gag-mil</sup> of mutant virus MH2 (M622); C, *in vivo* phosphorylated Pr76<sup>gag</sup> of RAV1 helper virus; D, mixing experiment using samples of panels A and C; E, *in vitro* phosphorylated wild-type MH2 (K622) P100<sup>gag-mil</sup>; F, mixing of *in vivo* and *in vitro* phosphorylated wild-type P100<sup>gag-mil</sup>; G, schematic drawing of panel D displaying *v-mil*-specific phosphopeptides (filled symbols) and gag-specific phosphopeptides (open symbols). Panels H and I: phosphoaminoacid analyses of *in vivo* labeled wild-type MH2 (K622) P100<sup>gag-mil</sup> (panel H) and mutant MH2 (M622) P100<sup>gag-mil</sup> (panel I). After complete acid hydrolysis, phosphoaminoacids were separated in two dimensions as described previously (Ghysdael *et al.*, 1981). Migrations of marker phosphoaminoacids are indicated by S (phosphoserine); T (phosphothreonine) and Y (phosphotyrosine).

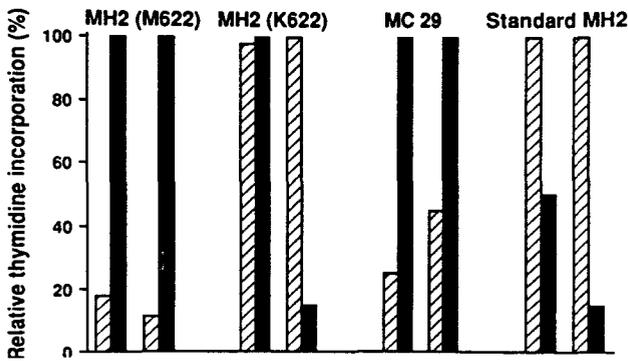


Fig. 4. cMGF dependence of *v-myc*-transformed macrophages. Chicken bone marrow cells were infected with MH2 (K622), MH2 (M622), a standard MH2 virus stock and MC29 and seeded in methocel. Colonies of transformed macrophages were expanded in growth medium containing cMGF and were then transferred into low-serum 'assay medium' in the presence or absence of cMGF for 2 days, after which they were pulse-labeled with [<sup>3</sup>H]TdR, as described earlier (Leutz *et al.*, 1984; Graf *et al.*, 1986). Hatched bars: cells incubated in the absence of cMGF, filled bars: cells incubated in the presence of cMGF.

Table I. Relative thymidine incorporation (plus factor/minus factor) in transformed macrophages

Clone	MH2(M622)	MH2(K622)	MC29	Standard MH2
1	5.3	0.24	4.13	0.90
2	8.7	1.01	2.19	0.16
3	7.3	0.62	2.69	0.62
4	5.5	0.20	3.78	0.41
5	8.3	0.62	2.59	0.89
6	4.7	1.32	2.59	0.03
7	8.0		2.80	0.25
8	4.5		3.00	2.00
9	3.7		2.07	0.43
10	7.4			0.70
X	6.34	0.67	2.87	0.64
S.D.	1.80	0.44	0.68	0.56

cMGF dependence of *v-myc* transformed macrophages. [<sup>3</sup>H]Thymidine labeling was performed on individual macrophage clones as described in Figure 4.

bryo NR cells infected with either MH2 (K622) or MH2 (M622). Whereas cells infected with MH2 (K622) are induced to proliferate, cells infected with MH2 (M622) failed to do so (Figure 5). Both macrophages and NR cells infected with either MH2 (K622) or MH2 (M622) expressed similar amounts of P100<sup>gag-mil</sup> (data not shown).

We conclude from these experiments that substitution of lysine 622 of P100<sup>gag-mil</sup> abolished the *v-mil*-dependent biological properties of MH2 and that these properties probably result from the P100<sup>gag-mil</sup>-mediated phosphorylation at serine/threonine residues of key cellular substrates.

## Discussion

Two lines of evidence indicate that conversion of lysine 622 of P100<sup>gag-mil</sup> to the isosteric amino acid methionine does not affect the general structure of P100<sup>gag-mil</sup>. First, both the mutant and wild-type proteins appear to have the same stability in either transformed fibroblasts or macrophages. Second, both the mutant and wild-type proteins are phosphorylated at the same sites and to a similar level by cellular kinases in transformed fibroblasts and macrophages.

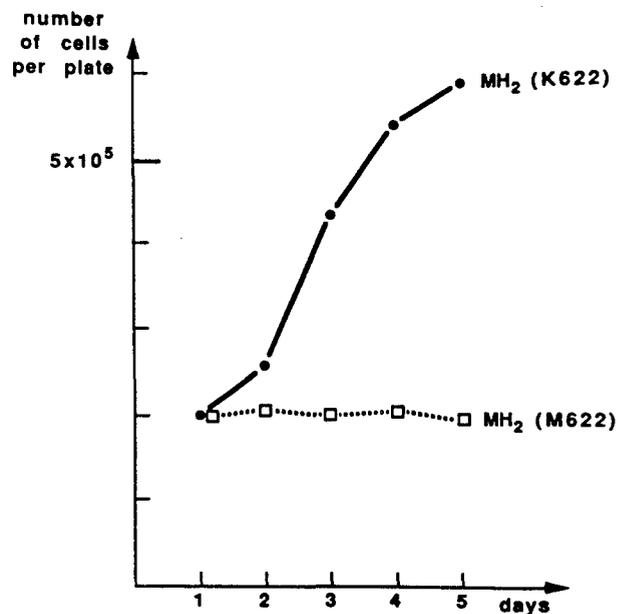


Fig. 5. Growth kinetics of infected chicken NR cells. Primary cultures of 7-day-old chicken NR cells were infected with MH2 (K622) and MH2 (M622) viruses. 20 days after infection NR cells were seeded into 60 mm dishes at the density of 10<sup>5</sup> cells per plate. Cell number in each plate was determined daily during 5 days.

This substitution, however, completely suppresses two of the biological properties which have been associated with the expression of *v-mil* (Bechade *et al.*, 1985; Graf *et al.*, 1986). Unlike the wild-type protein, P100<sup>gag-mil</sup> encoded by the *v-mil* gene of MH2 (M622) is unable to induce cMGF production and autocrine growth of *v-myc*-transformed chicken macrophages and unable to induce sustained growth of chicken neuroretina cells. Since the homologous lysine residue of the protein kinases encoded by other members of the *src* gene family have been demonstrated to be directly involved in ATP binding (Zoller *et al.*, 1981; Hashimoto *et al.*, 1982; Kamps *et al.*, 1984), it appears that these biological activities of P100<sup>gag-mil</sup> are dependent upon the integrity of an ATP binding site. Purified P100<sup>gag-mil</sup> preparations have been shown to be associated *in vitro* with an apparent autophosphorylating activity specific of serine and threonine residues (Moelling *et al.*, 1984). Substitution of lysine 622 for methionine completely abolishes this activity (Figure 1), indicating that this activity is an intrinsic property of P100<sup>gag-mil</sup> and not the result of phosphorylation by associated cellular kinases.

These results strongly suggest that P100<sup>gag-mil</sup> functions *in vivo* by phosphorylating cellular proteins at serine/threonine residues. Definitive evidence for the functioning of P100<sup>gag-mil</sup> as a protein kinase *in vivo* will require the identification of specific substrates in MH2-transformed cells. Most, if not all, of the sites phosphorylated in P100<sup>gag-mil</sup> *in vitro* are not found *in vivo* after metabolic labeling of P100<sup>gag-mil</sup> with [<sup>32</sup>P]orthophosphate. Since P100<sup>gag-mil</sup> molecules are bound to an affinity matrix for the *in vitro* assay of their kinase activity, it could be argued that conformational constraints induced by this binding are responsible for the difference of site specificity observed *in vivo* and *in vitro*. However, the *in vivo* phosphorylation sites of the P100<sup>gag-mil</sup> encoded by either MH2 (K622) and MH2 (M622) appear indistinguishable, indicating that most of the

phosphate associated with P100<sup>gag-mil</sup> in transformed cells does not result from an obligate autophosphorylation event but rather from the phosphorylation by cellular kinase(s). Taken together these results suggest therefore that P100<sup>gag-mil</sup> may not autophosphorylate *in vivo*. In that respect, this situation clearly differs from that of most members of the viral tyrosine kinase family for which the *in vitro* phosphotyrosine-containing peptides are usually a subset of those observed *in vivo* (Neil *et al.*, 1981; Barbacid *et al.*, 1981) and where mutations suppressing the kinase activity also suppress the tyrosine phosphorylation of the corresponding transforming proteins *in vivo* (Snyder *et al.*, 1985; Kamps and Sefton, 1986; Weinmaster *et al.*, 1986). The situation of the transforming proteins of Abelson murine leukemia virus (A-MuLV) is slightly different since, although the phosphorylation sites observed *in vivo* and *in vitro* are different (Witte *et al.*, 1981; Sefton *et al.*, 1981), other experimental evidences suggest that A-MuLV proteins do autophosphorylate *in vivo* (Ponticelli *et al.*, 1982). Previous observations have suggested that P100<sup>gag-mil</sup> can bind DNA and RNA *in vitro* (Bunte *et al.*, 1983). This situation also appears to apply for the *mos* gene product which has been shown to be a serine-specific kinase *in vitro* and *in vivo* (Kloetzer *et al.*, 1983, 1984; P. Donoghue, personal communication) and to display ATP-dependent DNA-binding properties *in vitro* (Seth *et al.*, 1987). Additional biochemical and genetic studies are required to assess whether these nucleic acid binding activities are relevant to the biological properties of P100<sup>gag-mil</sup> and *mos* encoded products.

P100<sup>gag-mil</sup> appears to be phosphorylated in transformed cells at several serine residues by as yet uncharacterized cellular kinase(s). The significance of these modifications in the modulation of the activity of P100<sup>gag-mil</sup> requires further study.

## Materials and methods

### Oligonucleotide site directed mutagenesis

A 3.3-kb fragment containing the *v-mil* oncogene was obtained by *Sst*I digestion of a plasmid (pMH2L1777) containing a biologically active MH2 provirus and subcloned into the *Sst*I restriction site of M13mp10 RF DNA. By using the following synthetic oligonucleotide (5'-CCTTAATCATCACTGCTACA-3'), the substitution of the lysine residue 622 (AAA) for a methionine residue (ATG) was performed by oligonucleotide site-directed mutagenesis according to published procedures (Zoller and Smith, 1982, 1984). Putative mutants were first identified by plaque hybridization and confirmed by DNA sequence analysis (Zoller and Smith, 1984). The mutagenized *v-mil* gene was excised from the replicative form of M13 using *Bgl*II and *Hpa*I restriction endonucleases and reinserted into pMH2L1777.

### Isolation of the infectious viruses and biological assays

Plasmids corresponding to the wild-type MH2 (K622) and the mutant MH2 (M622) proviruses were cotransfected together with a plasmid containing a biological active RAV-1 provirus in quail embryo fibroblasts as described by Graham and van der Eb (1973). Clones of *v-mil* transformed cells were picked and amplified. Virus stocks were harvested and tested for their biological activities on 7-day-old chicken embryo neuroretina cells (Bechade *et al.*, 1985) and on bone marrow derived macrophages (Graf *et al.*, 1986).

### Preparation of *v-mil* specific antisera

A *v-mil* specific *Xho*II to *Hind*III fragment encoding the 267 carboxyterminal amino acids of *v-mil* was subcloned into the P<sub>1</sub>-based expression vector pPlc24 (Remaut *et al.*, 1981). This fragment was expressed as a fusion protein including the first 99 amino acids of the polymerase of phage MS2 at its amino-terminus linked to the 267 amino acids encoded by the *v-mil* fragment. The recombinant polypeptide was purified from bacterial extracts and used to immunize rabbits as previously described (Ghysdael *et al.*, 1986).

### Cell labeling, immunoprecipitation and tryptic phosphopeptides analysis

Labeling of cells with L-[<sup>35</sup>S]methionine and [<sup>32</sup>P]orthophosphate, preparation of cell lysates, immunoprecipitation and SDS-PAGE have been described (Ghysdael *et al.*, 1979). Tryptic phosphopeptides analyses were performed essentially as previously described (Ghysdael *et al.*, 1981) except that separation of the phosphopeptides by electrophoresis in the first dimension was run for 40 min at 1000 V at pH 2.2 in water:formic acid:acetic acid (90:2:8).

### Immune complex kinase reaction

Samples of 2 × 10<sup>7</sup> MH2 (K622) or MH2 (M622) transformed fibroblasts or macrophages were lysed at 0°C in 3 ml of lysis buffer (Tris-HCl 50 mM, pH 7.2; NaCl 0.15 M; Triton-X100 1%; Na deoxycholate 1%; SDS 0.1%; dithiothreitol 1 mM; Trasylol 1%; 200 µg/ml phenylmethylsulfonyl fluoride; 10 mM NaF and 40 mM 4-nitrophenylphosphate). After centrifugation at 100 000 g for 30 min, the lysate was slowly chromatographed on 100 µl of a protein A sepharose column containing covalently bound IgG isolated either from a monoclonal anti-p19<sup>gag</sup> serum or from a polyclonal rabbit antiserum directed against detergent solubilized AMV virions. After extensive washing with 300–500 volumes of lysis buffer, the resin was washed sequentially with first, Tris-HCl 50 mM, pH 7.2; NaCl 0.15 M; Triton-X100 1%; dithiothreitol 1 mM; trasylol 1% and, second, Tris-HCl 50 mM, pH 7.2; NaCl 0.15 M; dithiothreitol 1 mM; trasylol 1%.

Autophosphorylation reactions were carried in a final volume of 40 µl containing 10 µl of immunoaffinity beads, 20 µCi [γ-<sup>32</sup>P]ATP (3000 Ci/mmol, NEN) in 20 mM Tris-HCl, pH 7.2, 0.15 M NaCl, 10 mM MnCl<sub>2</sub> for various periods of time at 37°C. After incubation, the immunoaffinity beads were quickly washed in STE buffer (Tris-HCl 10 mM, pH 7.2; NaCl 0.15 M; EDTA 1 mM) and prepared for SDS-PAGE.

## Acknowledgements

We thank M. Bailly and B. Quatannens for technical assistance, G. Calothy and M. Kaczorek for helpful discussions and N. Devassine for patient typing. This work was supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Centre Nationale de la Recherche Scientifique, the Association pour la Recherche Contre le Cancer and the Pasteur Institute in Lille.

## References

- Barbacid, M., Donner, L., Ruscetti, S. and Sheer, C. J. (1981) *J. Virol.*, **39**, 246–254.
- Bechade, C., Calothy, G., Pessac, B., Martin, P., Coll, J., Denhez, F., Saule, S., Ghysdael, J. and Stehelin, D. (1985) *Nature*, **316**, 559–562.
- Bunte, T., Greiser-Wilke, I. and Moelling, K. (1983) *EMBO J.*, **2**, 1087–1092.
- Chou, C. K., Dull, T. J., Russell, D. S., Gherzi, R., Lebowitz, D., Ullrich, A. and Rosen, O. M. (1987) *J. Biol. Chem.*, **262**, 1842–1847.
- Coll, J., Righi, M., de Taisne, C., Dissous, C., Gégonne, A. and Stehelin, D. (1983) *EMBO J.*, **2**, 2189–2194.
- Fukui, M., Yamamoto, T., Kawai, S., Maruo, K. and Toyoshima, K. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 5954–5958.
- Galibert, F., Dupont de Dinechin, S., Righi, M. and Stehelin, D. (1984) *EMBO J.*, **3**, 1333–1338.
- Ghysdael, J., Kettmann, R. and Burny, A. (1979) *J. Virol.*, **29**, 1087–1098.
- Ghysdael, J., Neil, J. C., Wallbank, A. M. and Vogt, P. K. (1981) *Virology*, **111**, 386–400.
- Ghysdael, J., Gégonne, A., Pognonec, P., Dernis, D., Leprince, D. and Stehelin, D. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 1714–1718.
- Graf, T. and Beug, H. (1978) *Biochim. Biophys. Acta*, **516**, 269–299.
- Graf, T., Von Weizsäcker, F., Grieser, S., Coll, J., Stehelin, D., Patchinsky, T., Bister, K., Bechade, C., Calothy, G. and Leutz, A. (1986) *Cell*, **45**, 357–364.
- Graham, F. L. and van der Eb, A. J. (1973) *Virology*, **54**, 536–539.
- Hashimoto, E., Takio, K. and Krebs, E. (1982) *J. Biol. Chem.*, **257**, 727–733.
- Hu, S. S. F., Moscovici, C. and Vogt, P. K. (1978) *Virology*, **89**, 162–178.
- Ishikawa, F., Takaku, F., Hayashi, K., Nagao, M. and Sugimura, T. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 3209–3212.
- Jansen, H. N., Ruckert, B., Lurz, R. and Bister, K. (1983) *EMBO J.*, **2**, 1969–1975.
- Kamps, M. A., Taylor, S. S. and Sefton, B. M. (1984) *Nature*, **310**, 589–592.

F. Denhez et al.

- Kamps, M.A. and Sefton, B.M. (1986) *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 751-757.
- Kan, N., Flordellis, C., Garon, G., Duesberg, P. and Papas, T.M. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 6566-6570.
- Kan, N., Flordellis, G., Mark, G.E., Duesberg, P.H. and Papas, T.S. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 3000-3004.
- Kloetzer, W.S., Maxwell, S.A. and Arlinghaus, R.B. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 412-416.
- Kloetzer, W.S., Maxwell, S.A. and Arlinghaus, R.B. (1984) *Virology*, **138**, 143-155.
- Leutz, A., Beug, H. and Graf, T. (1984) *EMBO J.*, **3**, 3191-3197.
- Linial, M. (1982) *Virology*, **119**, 382-391.
- Moelling, K., Hiemann, B., Beimling, P., Rapp, U.R. and Sander, T. (1984) *Nature*, **312**, 558-561.
- Neil, J.C., Ghysdael, J., Vogt, P.K. and Smart, J.E. (1981) *Nature*, **291**, 675-677.
- Palmieri, S. and Vogel, M. (1987) *J. Virol.*, **61**, 1717-1721.
- Ponticelli, A.S., Whitlock, C.A., Rosenberg, N. and Witte, O.N. (1982) *Cell*, **29**, 953-960.
- Ramsay, G., Hayman, M.J. and Bister, K. (1982) *EMBO J.*, **1**, 1111-1116.
- Rapp, V.R., Goldsborough, M.D., Mark, G.E., Bonner, T.I., Groffen, J., Reynolds, F.H. and Stephenson, J.R. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 4218-4222.
- Remaut, E., Stanssens, P. and Fiers, W. (1981) *Gene*, **15**, 81-93.
- Sefton, B.M., Hunter, T. and Raschke, W. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 704-708.
- Seth, A., Priel, E. and van de Woude, G.F. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 3560-3564.
- Shimizu, K., Yoshimichi, N., Sekiguchi, M., Hokamura, K. and Tanaka, K. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 5641-5645.
- Snyder, M.A., Bishop, J.M., McGrath, J.P. and Levinson, A.D. (1985) *Mol. Cell. Biol.*, **5**, 1772-1779.
- Weinmaster, G., Zoller, M.J. and Pawson, T. (1986) *EMBO J.*, **5**, 69-76.
- Witte, O.N., Ponticelli, A., Gifford, A., Baltimore, D., Rosenberg, N. and Elder, J. (1981) *J. Virol.*, **39**, 870-878.
- Zoller, M.J., Nelson, N.C. and Taylor, S.S. (1981) *J. Biol. Chem.*, **256**, 10837-10842.
- Zoller, M.J. and Smith, M. (1982) *Nucleic Acids Res.*, **10**, 6487-6800.
- Zoller, M.J. and Smith, M. (1984) *DNA*, **3**, 479-488.

Received on October 21, 1987; revised on November 17, 1987

ARTICLE 2  
accepté à Oncogene Research

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

F.DENHEZ<sup>1\*</sup>, F.GALIBERT<sup>2</sup>, B.HEIMANN<sup>3</sup>, C.DOZIER<sup>1</sup>, T.GRAF<sup>4</sup>, K.MOELLING<sup>3</sup>,  
D.STEHELIN<sup>1</sup> and J.GHYSDAEL<sup>1</sup>

1 : CNRS UA 04 1160 / INSERM U 186, Institut Pasteur, 1 rue Calmette, 59019 LILLE, Cedex  
FRANCE

2 : Hôpital St. Louis, Centre Hayem, 75475 PARIS, FRANCE

3 : Max Plank Institut, Ihnestrasse, D1000 BERLIN 33 FRG

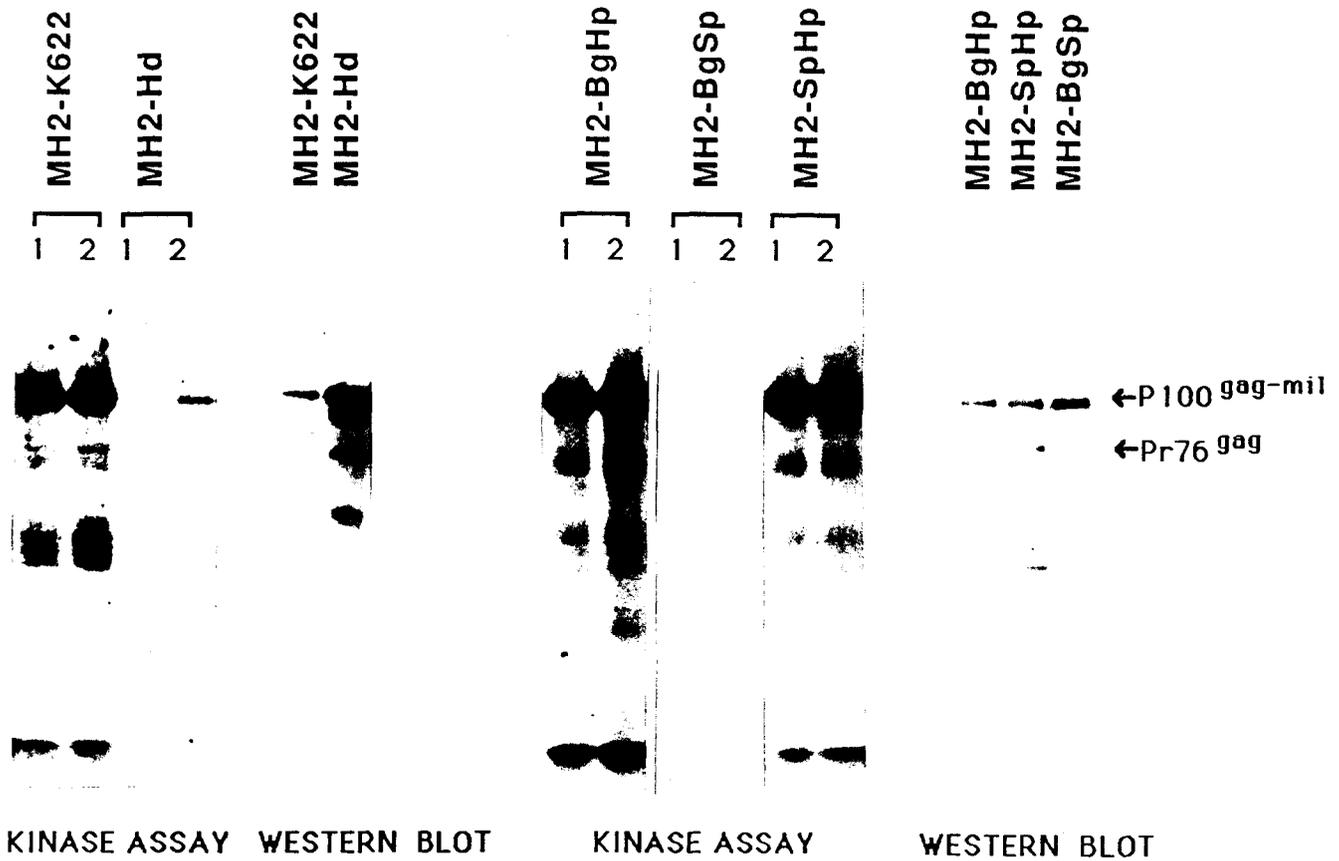
4 : EMBL, 1 Meyerhofstrasse, D6900 Heidelberg, FRG

KEYWORDS : phosphotransferase / catalytic function / oncogene .

RUNNING TITLE : MH2 V-MIL KINASE MUTANT

ABSTRACT

P100gag-mil, the translation product of the v-mil oncogene of MH2 is a protein kinase specific of serine/threonine residues. We report here that the P100gag-mil encoded by the MH2-Hd isolate displays a considerably reduced kinase activity in vitro. Construction of chimeric viruses and sequencing revealed that the lesion responsible for this reduced activity results from a single point mutation converting an asparagine residue at position 720 in fully active P100gag-mil kinase into serine in the P100gag-mil of MH2-Hd. Since this asparagine residue together with an invariant aspartate residue bracket a highly conserved 6 amino-acids region in all known protein kinases as well as in phosphotransferases of bacterial origin, our results indicate that integrity of this region is essential to enzymatic function and support the notion that it could be directly involved in ATP binding or phosphate transfer from ATP to kinase substrates.



**FIGURE 1:**

Autophosphorylation assays and Western blot analyses. Fibroblasts transformed by MH2-K622, MH2-Hd and the chimeric viruses described in Figure 2 were lysed and the respective P100gag-mil were purified by affinity chromatography as previously described (Denhez et al. 1988). *In vitro* autophosphorylation assays were performed for 5 minutes (lane1) and 10 minutes (lane 2) as described (Denhez et al. 1988). Amount of P100gag-mil present in the experiment were evaluated by Western blot analysis using a gag-specific antiserum.

The genome of the Mill Hill N°2 (MH2) avian retrovirus contains two oncogenes, v-myc and v-mil (Coll et al. 1983; Jansen et al. 1985; Kan et al. 1983; Suttrave et al. 1984). V-myc is also found as sole oncogene in several other, independent, avian retrovirus isolates (Graf et al. 1982). All avian v-myc-containing retroviruses have a similar oncogenic spectrum in chickens and transform macrophages and fibroblasts in culture (Graf et al. 1978). The presence of v-mil confers to MH2 an increased oncogenic potential as compared to other v-myc-containing viruses (Linial, 1982 ; Graf et al. 1986) as well as a distinct phenotype to MH2 transformed cells in culture. Specifically, the expression of v-mil in macrophages transformed by v-myc induce these cells to produce cMGF, a chicken hematopoietic growth factor, and the growth of these cells in an autocrine fashion (Graf et al. 1986). Also, v-mil expression contributes to the transformed phenotype of MH2 transformed chicken embryo fibroblasts (Palmieri et al. 1987). Finally, v-mil alone is able to induce the sustained growth of normally quiescent chicken embryo neuroretina cells in culture (Béchade et al. 1985). The protein encoded by v-mil, a 100 kd fusion protein (P100gag-mil), is related to the src gene family of tyrosine protein kinases (Galibert et al. 1984). However, *in vitro*, P100gag-mil is associated with a serine/threonine-specific autophosphorylating activity (Moelling et al. 1984). We have recently shown that substitution of lysine 622 in the ATP binding domain of P100gag-mil results in the inactivation of its autophosphorylating activity *in vitro*, indicating that this activity is an intrinsic property of P100gag-mil (Denhez et al. 1988). This substitution also abolishes the ability of v-mil to induce both the proliferation of chicken neuroretina cells and the production of cMGF by v-myc-transformed macrophages, indicating that the biological activities of v-mil are dependant upon the protein kinase activity of P100gag-mil (Denhez et al. 1988).

We show here that the P100gag-mil protein encoded by the previously described MH2-Hd isolate (Coll et al. 1983) displays a considerably reduced autophosphorylating activity *in vitro* as compared to that of other MH2 virus isolates. The lesion responsible for this reduced activity has been characterized in MH2-Hd P100gag-mil as a single point mutation converting an asparagine residue at position 720 into serine. Since this asparagine is invariant in all known protein kinases where it is part of a highly conserved 6 amino acid sequence, these results indicate that integrity of this sequence is involved in the catalytic function of these enzymes.

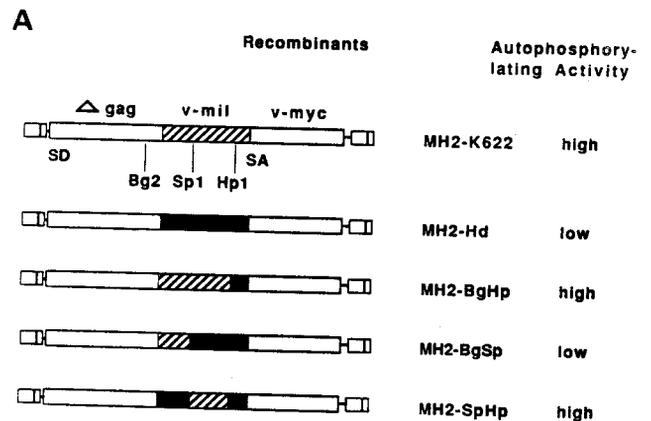
Expression of P100gag-mil in transformed cells was analyzed by Western blot analyses of total cell lysates using either gag-specific or v-mil specific antisera. As shown in Figure 1, quail embryo fibroblasts transformed with either the previously described MH2-K622 virus which encodes a fully active v-mil kinase (Denhez et al. 1988) or MH2-Hd contained similar amounts of P100gag-mil. These proteins, however, exhibited a drastic difference in behaviour in standard autophosphorylation assays, since the v-mil protein of MH2-Hd was only phosphorylated to less than 5 % of the level observed for the P100gag-mil of MH2-K622 (Figure 1). The inefficiency of MH2-Hd P100gag-mil to autophosphorylate in this assay is not due to its inability to act as a

FIGURE 2:

**Panel A.** Strategy of construction of the chimera between the MH2-K622 provirus and the MH2-Hd provirus. The MH2-BgHp provirus results from the substitution of the BglIII-HpaI fragment of the MH2-Hd provirus by the corresponding fragment of the MH2-K622 provirus. MH2-BgSp and MH2-SpHp proviruses are the result of the substitution of, respectively, the BglIII-SphI and the SphI-HpaI fragments of the MH2-Hd provirus by the corresponding fragment of MH2-K622.

Bg2 : BglIII ; Sp1 : SphI ; Hp1 : HpaI

**Panel B.** Comparison of the nucleotide sequence of the SphI-HpaI fragment of MH2-K622 and MH2-Hd (Galibert et al.1984) proviruses.



**B**

720  
Ser Asn Asn Ile Phe Leu  
Sp1 ..... TCC AAT AAT ATA TTT CTT ..... Hp1 MH2-K622  
Sp1 ..... ... .. .G. ... .. Hp1 MH2-Hd  
Ser

v-mil  
c-mil  
PKC  
c-AMP PK  
c-GMP PK  
PhK-  $\gamma$  Rabbit sk.m  
CaM-KII  
MLCK Chicken gizzard  
MLCK Rabbit sm.m  
MLCK Rabbit sk.m  
casein kinase II  
CDC 28  
KIN1 (*S.cerevisiae*)  
KIN2 (*S.cerevisiae*)  
human insulin recept.  
mos  
v-src  
v-yes  
v-fes/v-fps  
v-fms  
v-erbB  
aminoglycoside phosphot.  
viomycin phosphot.  
streptomycin phosphot.  
hygromycin phosphot.

\*

I	I	H	R	D	M	K	S	N	N	I	F	L	H	E	
I	I	H	R	D	M	K	S	N	N	I	F	L	H	E	
I	I	Y	R	D	L	K	L	D	N	V	M	L	D	S	
D	L	I	Y	R	D	L	K	P	E	N	L	L	I	D	Q
G	I	I	Y	R	D	L	K	P	E	N	L	I	L	D	H
N	I	V	H	R	D	L	K	P	E	N	I	L	L	D	D
V	H	R	D	L	K	P	E	N	L	L	L	L	A	S	
G	I	V	H	L	D	L	K	P	E	N	I	M	C	V	N
V	H	L	D	L	K	P	E	N	I	M	C	V	N		
R	V	L	H	L	D	L	K	P	E	N	I	L	C	V	N
I	M	H	R	D	V	K	P	H	N	V	M	I	D	H	
H	R	D	L	K	P	Q	N	L	L	I	N				
N	I	V	H	R	D	L	K	I	E	N	I	M	I	S	D
N	I	V	H	R	D	L	K	I	E	N	I	M	I	S	
K	F	V	H	R	D	L	A	A	R	N	C	M	V	A	H
S	I	L	H	L	D	L	K	P	A	N	I	L	I	S	E
N	Y	V	H	R	D	L	R	A	A	N	I	L	V	G	
Y	I	H	R	D	L	R	A	A	N	I	L	V	G	D	
C	I	H	R	D	L	A	A	R	N	C	L	V	T	E	
C	I	H	R	D	V	A	A	R	N	V	L	L	T	S	
R	L	V	H	R	D	L	A	A	R	N	V	L	V	K	T
V	F	S	H	G	D	L	G	D	S	N	I	F	V	G	
H	G	D	L	G	G	E	N	V	L	W	E	T			
H	G	D	L	H	H	E	N	V	D	L					
H	A	D	F	G	S	N	N	V	L	T	D	L			

FIGURE 3:

Alignment of the amino acid sequence surrounding Asparagine residue 720 of P100gag-mil with those of other protein kinases and bacterial phosphotransferases. The amino acid sequences shown here are derived from:

*v-mil* (Galibert et al. 1984) ; Protein Kinase C (PKC : Knopf et al. 1986) ; cyclic AMP-dependant Protein Kinase (c-AMP PK : Shoji et al. 1981) ; cyclic GMP-dependant Protein Kinase (c-GMP PK : Guerriero et al. 1986) ; Phosphorylase Kinase from Rabbit Skeletal Muscle (PhK- Rabbit sk.m : Hanley et al. 1987) ; Calmodulin Kinase II (CaM-KII : Hanley et al.1987) ; Chicken Gizzard Myosin Light Chain Kinase (MLCK Chicken gizzard : Guerriero et al. 1986) ; Rabbit smooth muscle Myosin Light Chain Kinase (MLCK Rabbit sm.m : Hanley et al.1987) ; Rabbit skeletal muscle Myosin Light Chain Kinase (MLCK Rabbit sk.m : Guerriero et al. 1986) ; casein kinase II (Saxena et al. 1987) ; yeast CDC protein kinases (CDC 28 : Hanley et al. 1987) ; KIN1 (*S.Cerevisiae*) - KIN2 (*S.Cerevisiae*) (Levin et al. 1987) ; human insulin receptor (Ullrich et al. 1985) ; (mos ; v-src ; v-yes ; v-fes/v-fps ; v-fms ; v-erbB) (Galibert et al. 1984) ; Aminoglycoside phosphotransferase, Viomycin phosphotransferase, Streptomycin phosphotransferase and Hygromycin phosphotransferase (Brenner. 1987).

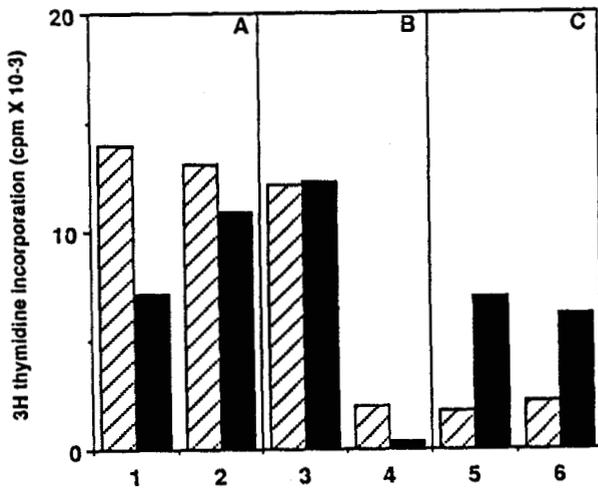
phosphoacceptor since this molecule can be efficiently phosphorylated when used in trans as a substrate for MH2-K622 P100gag-mil (data not shown).

To localize the mutation(s) responsible for the reduced autophosphorylating activity of MH2-Hd P100gag-mil, chimera were constructed between MH2-K622 and MH2-Hd proviruses by the use of three unique restriction enzyme sites : BglII at the end of the partial retroviral gag gene, SphI in the middle of the v-mil oncogene and HpaI at the 3' extremity of v-mil. A schematic illustration of the resulting recombinant genomes is shown in Figure 2, panel A. Infectious virus corresponding to each of these chimeric genomes were rescued from v-myc transformed foci obtained after transfection of quail embryo fibroblasts with the plasmids described above together with a molecularly cloned RAV-1 helper virus DNA. Western blot analyses demonstrated that cells transformed by all three chimeric viruses (MH2-BgHp, MH2-BgSp and MH2-SpHp) contained similar amounts of P100gag-mil as cells transformed by the parental viruses (Figure 1).

The autophosphorylating activity of each of these molecules was next analyzed by the standart assay procedure. The results of Figure 1 show that substitution of the Sph1 - Hpa1 fragment of the MH2-Hd provirus by the corresponding fragment of the MH2-K622 provirus is sufficient to restore a full autophosphorylating activity to MH2-Hd P100gag-mil. The complete nucleotide sequence of the v-mil oncogene of MH2-K622 has been determined and compared to that of the published sequence of MH2-Hd (Galibert et al. 1984). The two genes differ in a single position in the Sph1-Hpa1 fragment (Figure 2, panel B). This change results in the substitution of an asparagine residue (AAT) in position 720 in MH2-K622 P100gag-mil for a serine residue (AGT) in MH2-Hd P100gag-mil.

Since an asparagine residue is found at position 720 of the P100gag-mil of other MH2 isolates (Kan et al. 1984; Sutrave et al. 1984) and in the c-mil encoded protein (Jansen et al. 1985) and since no other mutation is present in the v-mil domain of the P100gag-mil of MH2-Hd as compared to that of the fully active kinase of MH2-K622 (data not shown) the asparagine to serine change in MH2-Hd P100gag-mil is solely responsible for the reduced kinase activity of this molecule.

From the comparison of the amino-acid sequence of this domain of P100gag-mil with that of other known protein kinases, it appears that this asparagine residue is in fact invariant in all protein kinases, independently of their origin (mammals, birds and yeasts) or their specificity for serine/threonine or tyrosine (Figure 3). This invariant asparagine residue together with an invariant aspartate residue bracket a 6 amino-acids region highly conserved in all protein kinases. These asparagine and aspartate residues are also invariant and delineate a highly conserved domain in otherwise unrelated bacterial phosphotransferases involved in antibiotic resistance (Brenner. 1987; Figure 3). The fact that conversion of asparagine 720 of P100gag-mil into serine is accompanied by a considerable inhibition of P100gag-mil kinase activity indicates that the integrity of this region is essential to enzymatic function and supports the notion that it could be directly involved in either ATP binding or phosphate transfer from ATP to various substrates.



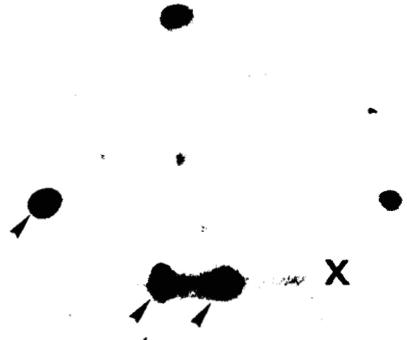
**FIGURE 4:**

cMGF independence of MH2-Hd-transformed macrophages. Chicken bone marrow cells were infected with MH2-Hd (panel A) or MH2-K622 (panel B) or MC29 (panel C) and seeded in methocel. Colonies of transformed macrophages were expanded in growth medium containing cMGF and were then transferred into low serum "assay medium" in the presence or absence of cMGF for two days, after which they were pulse-labelled with (<sup>3</sup>H)TdR as described earlier (Graf et al 1986). Hatched bars: cells incubated in the absence of cMGF. Filled bars: cells incubated in the presence of cMGF.

**FIGURE 5:**

Two dimensional phosphopeptide analyses of *in vivo* phosphorylated P100gag-mil. Fibroblasts transformed by either MH2-K622 and MH2-Hd were metabolically labelled with (<sup>32</sup>P) orthophosphate for 24 hours and the respective P100gag-mil were isolated from gels similar to those of Figure 1. After trypsin digestion, the resulting peptides were separated in two dimensions using electrophoresis at pH2.1 (anode to the right and cathode to the left; origin of migration indicated by X) and chromatography. Panel A: *in vivo* phosphorylated P100gag-mil from MH2-K622 infected cells. Panel B: *in vivo* phosphorylated P100gag-mil from MH2-Hd infected cells. V-mil-specific phosphopeptides as identified previously (Denhez et al. 1988) are indicated by arrowheads; other phosphopeptides are derived from the gag-encoded domain of P100gag-mil.

A



B



Previous studies have shown that the v-mil oncogene is able to induce the sustained proliferation of chicken neuroretina cells (Béchéde et al. 1985) and to activate v-myc-transformed macrophages to produce cMGF and their subsequent growth in an autocrine manner (Graf et al. 1986). The results of Figure 4 show that macrophages transformed by either MH2-Hd or by MH2-K622, a molecularly cloned MH2 provirus encoding a fully active P100gag-mil kinase (Denhez et al. 1988), are independent of exogenously added cMGF for their growth (Figure 4, panel A and B). In contrast, macrophages transformed by MC29, a retrovirus containing v-myc as sole oncogene, require cMGF for their growth (Figure 4, panel C). In addition, previous studies have demonstrated that MH2-Hd, like other MH2 virus isolates, is able to induce the sustained proliferation of chicken neuroretina cells (Béchéde et al. 1985). We recently demonstrated that the protein kinase activity of P100gag-mil as assayed by its autophosphorylating activity in vitro is instrumental in the biological activities of v-mil, indicating that the autophosphorylating activity of P100gag-mil as measured in vitro at least partially reflects the activity of this enzyme towards its physiological substrates in vivo (Denhez et al. 1988). This assay is so far the only available way to measure the P100gag-mil protein kinase activity. Although various exogenous proteins are phosphorylated by P100gag-mil-containing immunoprecipitates (Moelling et al., 1984), these phosphorylation events appear largely due to contaminating cellular kinases (our unpublished observations). From these results and from the biological and biochemical properties of the MH2-Hd v-mil gene product described here, it appears that the threshold level of P100gag-mil kinase activity required to affect the cellular phenotype is probably low. Such a threshold effect is reminiscent of that described for p60<sup>V-Src</sup>, the translation product of the src oncogene of Rous sarcoma virus, where morphological transformation of fibroblasts and mitogenic potential in NR cells does not require the high dose of tyrosine kinase activity found in most RSV-transformed cells (Jakobovits et al. 1984; Poirier et al. 1982). In this context, the comparison of proteins phosphorylated in cells transformed by MH2-K622 and MH2-Hd could be useful to identify the physiologically relevant substrates of the v-mil kinase.

We previously reported that the sites phosphorylated in P100gag-mil in in vitro phosphotransfer reactions are different from those phosphorylated in vivo (Denhez et al. 1988). We found the kinase-deficient P100gag-mil of MH2-Hd to be phosphorylated in transformed cells to a similar extent and at the same sites as those of a fully active P100gag-mil kinase (Figure 5). This result give further support to our previous contention (Denhez et al. 1988) that most of P100gag-mil phosphorylation observed in transformed cells does not result from an obligate autophosphorylation event but rather from the phosphorylation by cellular kinases.

## REFERENCES

- Béchéde C., Calothy G. and Pessac B.  
P. Martin, J. Coll, F. Denhez, S. Saule, J. Ghysdael and D. Stéhelin. (1985). Induction of proliferation or transformation of neuroretina cells by the mil and myc viral oncogenes. *Nature* **316** : 559-562.
- Brenner S. (1987). Phosphotransterase sequence homology. *Nature* **329** : 21
- Coll J., Righi M., de Taisne C., Dissous C., Gégonne A. and Stéhelin D. (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.
- Denhez F., Heimann B., d'Auriol L., Graf T., Coquillaud M., Coll J., Galibert F., Moelling K., Stéhelin D. and Ghysdael J. (1988). Replacement of Lysine 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 the retrovirus MH2. *EMBO J.* **7**, 541-546.
- Fitzgerald T.J., Trempe M.R. and Carlson G.M. (1987). Autophosphorylation of the  $\alpha$  Subunit of Phosphorylase Kinase from Rabbit Skeletal Muscle. *J. Biol. Chem.* **262**, 11239-11246.
- Galibert F., Dupont de Dinechin S., Righi M. and Stéhelin D. (1984). The second oncogene mil of avian retrovirus MH2 is related to the src gene family. *EMBO J.* **6**, 1333-1338.
- Graf T. and Beug H. (1978). Avian leukemia viruses. Interaction with their target cells in vivo and in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* **516**, 269-299.
- Graf T. and Stéhelin D. (1982). Avian leukaemia viruses oncogenes and genome structure. *Biochim. Biophys. Acta.* **651**, 245-271.
- Graf T., Weizsaecker F.V., Grieser S., Coll J., Stéhelin D., Patschinsky T., Bister K., Béchéde C., Calothy G. and Leutz A. (1986). v-mil induces autocrine growth and enhanced tumorigenicity in v-myc-transformed avian macrophages. *Cell* **45**, 357-364.
- Guerriero V. Jr., Russo M.A., Olson N.J., Putkey J.A. and Means A.R. (1986). Domain Organization of Chicken Gizzard Myosin Light Chain Kinase Deduced from a Cloned cDNA. *Biochemistry* **25**, 8372-8381.
- Hanley R.M., Means A.R., Ono T., Kemp B.E., Burgin K.E., Waxham N., Kelly P.T. (1987). Functional Analysis of a Complementary DNA for the 50-Kilodalton Subunit of Calmodulin Kinase II. *Science* **237**, 293-297.
- Jakobovits E.B., Majors J.F. and Varmus H.E. (1984). Hormonal regulation of the Rous sarcoma virus src gene via a heterologous promoter defined a threshold dose for cellular transformation. *Cell* **38**, 757-768.
- Jansen H.W. and Bister K. (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., Rückert B., Lurtz R. and Bister K. (1983). Two unrelated cell-derived sequences in the genome of avian leukemia and carcinoma inducing retrovirus MH2. *EMBO J.* **11**, 1969-1975.

- Kan N.C., Flordellis C.S., Garon C.F., Duesberg P.H. and Papas T.S. (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., Flordellis C.S., Mark G.E., Duesberg P.H., and Papas T.S. (1984). A common onc gene sequence transduced by avian carcinoma virus MH2 and by Murine Sarcoma Virus 3611. *Science* **223**, 813-816.
- Knopf J.L., Lee M-H., Sulzman L.A., Kriz R.W., Loomis C.R., Hewick R.M. and Bell R.M. (1986). Cloning and Expression of Multiple Protein Kinase C cDNAs. *Cell* **46**, 491-502.
- Koenen M., Sippel A.E., Trachmann C. 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.
- Levin D.E., Hammond C.I., Ralston R.O and Bishop J.M. (1987). Two yeast genes that encode unusual protein kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 6035-6039.
- Linial M. (1982). Two Retroviruses with similar transforming genes exhibit differences in transforming potential. *Virology* **119**, 382-391.
- Moelling K., Heimann B., Beimling P., Rapp U.R. and Sander T. (1984). Serine- and threonine-specific protein kinase activities of purified gag-mil and gag-raf proteins. *Nature* **312**, 558-561.
- Palmieri S. and Vogel M.L. (1987). Fibroblasts transformation parameters induced by the avian v-mil oncogene. *J. Virol* **61**, 1717-1721.
- Poirier F., Calothy G., Karess G., Erikson E. and Hanafusa H. (1982). Role of p60<sup>src</sup> kinase activity in the induction of neuroretinal cell proliferation by Rous sarcoma virus. *J. Virol.* **42**, 780-789.
- Sanger S.N. and Coulson A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Saxena A., Padmanabha R., and Glover C.V.C. (1987). Isolation and Sequencing of cDNA Clones Encoding Alpha and Beta Subunits of *Drosophila melanogaster* Casein Kinase II. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 3409-3417.
- Shoji S., Parmelee D.C., Wade R.D., Kumar S., Ericsson L.H., Walsh K.A., Neurath H., Long G.L., Demaille J.G., Fischer E.H. and Titani K. (1981). Complete amino acid sequence of the catalytic subunit of bovine cardiac muscle cyclic AMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 848-851.
- Sutrave P., Bonner T.I., Rapp U.R., Jansen H.W., Patchinsky T., and Bister K. (1984). Nucleotide sequence of avian retroviral oncogene v-mil : homologue of murine retroviral oncogene v-raf. *Nature* **309**, 85-88.
- Ullrich A., Bell J.R., Chen E.Y., Herrera R., Petruzzelli L.M., Dull T.J., Gray A., Coussens L., Liao Y-C., Tsubokawa M., Mason A., Seeburg P.H., Grunfeld C., Rosen O.M. and Ramachandran, J. (1985). Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature* **313**, 756-761.

We thank M.Bailly and C.Lagrou for technical assistance and N.Devassine for patient typing. This work was supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Centre Nationale de la Recherche Scientifique, the Association pour la Recherche Contre le Cancer and the Pasteur Institute in Lille. F.Denhez was supported by a fellowship from the MRT and C.Dozier by a fellowship from the Association pour la Recherche Contre le Cancer.

# RESUME

Le virus MH2 est un rétrovirus aviaire défectif pour la réplication qui contient dans son génome 2 oncogènes: *v-mil* et *v-myc*. L'expression de la P100*gag-mil* (produit de traduction de l'oncogène *v-mil*) permet :

-1- la prolifération de cellules de neurorétine d'embryon de poulet de 7 jours normalement quiescentes à ce stade.

-2- la production, de façon autocrine, d'un facteur de croissance, le cMGF (chicken Myeloid Growth Factor), par des macrophages transformés par *myc*.

La séquence en acides aminés de *v-mil* révèle une importante homologie avec les membres de la famille des tyrosine-kinases dont un représentant est *src*. En 1984, les travaux de K.Moelling ont montré que la P100*gag-mil* semble être associée *in vivo* avec une activité kinase spécifique de résidus sérine et thréonine. *v-mil* venait alors rejoindre l'oncogène *v-mos* dans les exceptions : en effet, ce sont les deux seuls oncogènes décrits jusqu'alors pour lesquels la fonction kinase qui leur est associée n'est pas tyrosine spécifique mais sérine/thréonine. Connaissant l'abondance des sérine/thréonine-kinases dans les cellules (les phosphosérine et phosphothréonine représentent plus de 99% des phospho-acides aminés) et tenant compte du fait que quelque soit le degré de pureté de la P100*gag-mil* isolée pour le test d'autophosphorylation *in vitro* il y a toujours contamination par des kinases cellulaires, nous avons voulu démontrer la nature intrinsèque de l'activité kinase associée à la P100*gag-mil*. Pour cela, nous avons utilisé la technique de mutation dirigée à l'aide d'oligonucléotides pour changer la lysine 622 (homologue à la lysine 295 de *src* connue pour être le site de fixation de l'ATP) en résidu méthionine. Nous avons montré que cette substitution supprime à la fois l'autophosphorylation observée *in vitro* et les propriétés biologiques de *v-mil*. Nous avons également présenté des évidences suggérant que la P100*gag-mil* ne semble pas s'autophosphoryler *in vivo* puisque les cartes à deux dimensions des phosphopeptides provenant soit de la P100*gag-mil* sauvage ou de la P100*gag-mil* mutée sont identiques.

Nous possédons au laboratoire un autre isolat du rétrovirus MH2 que nous appelons MH2-Hd. Ce virus possède des propriétés biologiques indiscernables de celles d'un virus MH2 sauvage. Cependant, la P100*gag-mil* de ce virus présente *in vitro* une activité d'autophosphorylation considérablement réduite comparée à celle de la P100*gag-mil* du virus MH2 décrit ci-dessus. Nous avons donc construit des chimères avec les ADN des différents provirus pour localiser la région incriminée. Ensuite, par la séquence de cette région nous avons vu qu'une simple substitution changeant, en position 720, un codon pour une Asparagine (AAT) en un codon pour une Sérine (AGT) était responsable de cette baisse d'activité *in vitro*. En comparant le domaine qui entoure cette Asparagine avec la séquence en acides-aminoés des protéine-kinases déjà décrites ainsi qu'avec celle d'autres kinases nous avons vu qu'il s'agissait en fait d'une région très conservée ce qui laisse supposer que ce domaine fait probablement partie également du site actif de ces enzymes.

