

50376  
1989  
223

50376  
1989  
223

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

---

N° d'ordre: 370

## THESE

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

option : BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE

par

Ruoping LI

Effets de mutations ponctuelles ou de délétions dans  
l'oncogène v-myb des virus AMV et E26 sur la  
transformation des cellules myéloïdes et sur la  
prolifération des cellules de neurorétine de poulet.



soutenue le 23 juin 1989 devant la commission d'examen

|             |   |   |
|-------------|---|---|
| Président   | : | Professeur J.MONTREUIL                    |
| Rapporteurs | : | Professeur J.KREMBEL<br>Docteur P. JURDIC |
| Examineur   | : | Professeur D.STEHELIN                     |

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

*Je remercie infiniment Dominique LEPRINCE qui a su être un directeur de thèse patient et rigoureux, et qui m'a appris tout ce que je voulais savoir sans jamais oser le demander. Je le remercie encore de tout mon coeur pour sa patience et son temps prodigués dans la correction de ce mémoire.*

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

*Je remercie Monsieur le Docteur P. JURDIC d'avoir bien voulu accepter de juger ce travail et de faire partie de ce jury.*

*Je remercie Simon SAULE pour sa patience, sa disponibilité et ses conseils prodigués au cours de ce travail et les membres de son équipe pour leur aide.*

*Je remercie Bernard VANDENBUNDER qui a été mon premier guide dans ce laboratoire.*

*Je remercie Brigitte DEBUIRE et Martine DUTERQUE-COQUILLAUD pour leur coopération.*

*Je remercie Christian LAGROU, Agnès BEGUE et Manuella BAILLY pour m'avoir initiée à la culture cellulaire et aux techniques moléculaires et pour leurs conseils et leur aide constante .*

*Je remercie Anne FLOURENS et Brigitte QUATANNENS pour leurs conseils techniques et pour leur enthousiasme et leur collaboration aussi efficace que sympathique sur le sujet E26.*

*Je remercie Nicole DEVASSINE, Marie-Christine BOUCHEZ, Samia REDJEM et Valérie DUFRESNOY qui, de leurs doigts de fée, ont aligné des kilomètres de mots pour assurer la frappe de ce mémoire. Merci beaucoup !*

*Je remercie Anne BOSSELUT, Sophie RAVIT , Fabienne DENHEZ et Vincent LAUDET pour leur patience et leur temps prodigués dans la correction de ce mémoire. Merci beaucoup aux "Professeurs de Français"*

*Je remercie Thierry DUPRESSOIR et Patrick MARTIN pour leur aide au Macintosh.*

*Je remercie tous les membres de la SARL "Crouillats" pour leur sympathie.*

*Enfin, je remercie tous les membres de l'U 186 que je n'ai pas encore nommés pour leur aide constante et leur sympathie.*

## PUBLICATIONS

### ARTICLES :

- \* - D.LEPRINCE, M.DUTERQUE-COQUILLAUD, R.LI, C.HENRY, A.FLOURENS, B.DEBUIRE and D.STEHELIN.  
Alternative splicing within the chicken c-ets-1 locus : implications for the transduction within the E26 retrovirus of the c-ets proto-oncogene  
J.Virol.(1988) 62: 3233-3241
- R.LI,M.DUTERQUE-COQUILLAUD,C.LAGROU,B.DEBUIRE,T.GRAF, D.STEHELIN and D.LEPRINCE  
A single amino-acid substitution in the DNA-binding domain of the v-myb oncogene confers a thermolabile phenotype to E26 transformed myeloid cells.  
Oncogene Research (1989), in press.
- P.AMOUYEL, V.LAUDET, P.MARTIN, R.LI, B.QUATANNENS, D.STEHELIN and S.SAULE.  
Two nuclear oncogenic proteins, P135gag-myb-ets and P61/63myc cooperate to induce transformation of chicken neuroretina cells.  
J.Virol.(1989) Aug., in press.

### ABSTRACTS :

- D.LEPRINCE, M.DUTERQUE-COQUILLAUD, R.LI, A.GEGONNE, A.FLOURENS, K.BOULUKOS, J.GHYSDAEL, B.DEBUIRE and D.STEHELIN  
Two distinct proteins are generated by alternative splicing within the same chicken c-ets locus.  
Third Annual Meeting on Oncogenes (Frederick, Maryland) (1987).
- V.LAUDET, P.AMOUYEL, R.LI, D.LEPRINCE, M.FAUQUET, D.STEHELIN and S.SAULE.  
Cooperation between two nuclear oncogenic proteins, p135gag-myb-ets and p61/63myc for transformation of chicken neuroretina cell.  
Fourth Annual Meeting on Oncogenes (Frederick, Maryland) (1988).

## GLOSSAIRE

- **ADNc** : copie d'ARN en ADN double brin.
- **ALV** : rétrovirus de la lymphomatose aviaire compétent pour la réplication et dépourvu de gène oncogène.
- **bp, Kbp** : paires de bases d'ADN ; millier de paires de bases.
- **"cap site"** : signaux d'initiation d'ARN messenger.
- **cMGF** : Chicken Myelomonocytic Growth Factor.
- **CNR** : Chicken Neuroretina cell, cellule de neurorétine de poulet.
- **CSF** : "Colony Stimulating Factor", hormone indispensable à la survie, la prolifération et la différenciation des cellules hématopoïétiques.
- **DLV** : rétrovirus défectif pour la réplication et induisant des leucémies aiguës chez le poulet
- **"enhancer"** : séquence activatrice de la transcription.
- **épissure** : mécanisme permettant l'élimination des introns d'un ARN.
- **exon** : partie codante d'un gène.
- **"helper"** : ALV ou MuLV, virus auxiliaire permettant la propagation des rétrovirus défectifs pour leur replication .
- **Ig** : gène des Immunoglobulines.
- **intron** : partie non codante d'un gène.
- **Kb** : Kilobase, milliers de bases d'ARN.
- **Kd** : Kilodaltons
- **LTR** : "Long Terminal Repeat" (promoteur fort de transcription viral), séquence constituée de U3RU5 (350 bp) et présente à chaque extrémité de l'ADN proviral.
- **MuLV** : rétrovirus des lymphomes murins compétents pour la réplication et dépourvu de gène oncogène.
- **Oncogène** : gène dont le produit peut induire la transformation cellulaire. Par extension, gène fréquemment impliqué dans les tumeurs.
- **v-onc** : gène viral d'origine cellulaire responsable du pouvoir transformant du rétrovirus; la dénomination des oncogènes doit rappeler le type de maladie induit (par exemple erb pour érythroblastose), le lieu de découverte (mil pour Mill Hill), le nom du découvreur (abl pour Mr

Abelson) ou encore une particularité biochimique (trk pour tyrosine kinase).

- **c-onc** : gène cellulaire normal, progéniteur de l' oncogène viral .
- **provirus** : virus sous sa forme intégrée à l'ADN de la cellule hôte.
- **px** : protéine x mature.
- **ppx** : phospho-protéine x.
- **Px** : protéine de fusion x.
- **PK** : Protéine Kinase.
- **QNR** : Quail Neuroretina cell, cellule de neurorétine de caille.
- **Western Blot** : technique d'empreintes des protéines par transfert sur une feuille de nitrocellulose .

# **SOMMAIRE**

|  |          |
|--|----------|
| <b>PRESENTATION DU MEMOIRE</b>   | .....1 1 |
| <b>INTRODUCTION</b>  | .....1 4 |
| <b><u>I - LES RETROVIRUS LEUCEMOGENES</u></b>  | .....18  |
| I - 1 <u>Généralités.</u>  |          |
| I - 2 <u>Rétrovirus leucémogènes peu transformants.</u>  |          |
| I - 3 <u>Rétrovirus leucémogènes transformants aviaires.</u>   |          |
| <b><u>II - ONCOGENES ET SYSTEME HEMATOPOIETIQUE</u></b>  | .....24  |
| II - 1 <u>Cellules et facteurs de croissance hématopoïétiques</u>  |          |
| A) Les cellules hématopoïétiques.  |          |
| B) Les facteurs de croissance hématopoïétiques.  |          |
| II - 2 <u>Effet des produits des oncogènes viraux sur les cellules hématopoïétiques.</u>                             |          |
| A) Effet des produits des oncogènes viraux sur la prolifération et la différenciation des cellules hématopoïétiques. |          |
| a. Les facteurs de croissance et leurs récepteurs.   |          |
| b. La transmission du signal mitotique.  |          |
| c. La réaction nucléaire.  |          |
| B) Coopération d'oncogènes dans le système hématopoïétique.  |          |
| II - 3 <u>Activation de proto-oncogènes dans le système hématopoïétique et la tumorigénicité</u>                     |          |
| II - 4 <u>Oncogènes et autres systèmes biologiques (ex: Cellules de Neurorétine de Poule )</u>                       |          |
| <b><u>III - ONCOGENES A LOCALISATION NUCLEAIRE</u></b>   | .....45  |
| III - 1. <u>Les oncogènes dont les produits de traduction sont localisés dans le noyau.</u>                          |          |
| III - 2. <u>Les mécanismes possibles de transformation par ces oncogènes</u>   |          |



**IV - RETROVIRUS AMV , ONCOGENE V-MYB ET PROTO-ONCOGENE C-MYB**  
 .....48

IV - 1 Le rétrovirus de la myéloblastose aviaire: AMV

- A) Structure du génome du virus AMV
- B) Biologie du virus AMV
- C) Mutant thermosensible du virus AMV

IV - 2 Mode d'expression et produits de traduction des gènes v-myb et c-myb

- A) Structure de v-myb et des gènes cellulaires c-myb
  - a. Formation de v-myb
  - b. c-myb chez le poulet, la souris, l'homme et la drosophile
  - c. Homologie entre v-myb et c-myb et conservation phylogénétique de c-myb
- B) Expression de c-myb
- C) Produits de traduction de v-myb et c-myb
  - a. Localisation des protéines
  - b. Structure et fixation des protéines à l'ADN

IV - 3 Implications de c-myb dans la tumorigénèse

- A) Activation de c-myb par insertion virale
- B) Activation de c-myb par amplification génique
- C) Activation de c-myb par remaniement chromosomique

**V - RETROVIRUS E26 . ONCOGENE V-ETS ET GENES CELLULAIRES**  
C-ETS-1 ET C-ETS-2 .....65

V - 1 Rétrovirus E26

- A) Structure et mode d'expression du virus E26
  - a. Structure génomique de E26
  - b. Protéine transformante de E26: P135gag-myb-ets

## B) Biologie du virus E26

- a. Leucémies induites *in vivo* par le virus E26
- b. Transformation des cellules hématopoïétiques par le virus E26 *in vitro*
- c. Effets du virus E26 sur les fibroblastes de caille et de poulet

## C) Mutants thermosensibles du virus E26

## D) Virus E26 et virus AMV

- a. Différences structurales entre E26 et AMV
- b. Différences biologiques entre E26 et AMV

V - 2 Mode d'expression et produits de traduction des gènes v-ets et c-etsA) Expression de v-ets et c-ets

- a. Structure de v-ets et de son homologue cellulaire c-ets-1
- b. Structure et expression des gènes c-ets-1 et c-ets-2

B) Produits de traduction des gènes c-ets

- a. Protéines c-ets
- b. Phosphorylation des protéines c-ets

V - 3 Implication des gènes c-ets dans la tumorigénèse
**RESULTATS** .....7 8

**I<sup>ère</sup> PARTIE :** Caractérisation des mutations présentes dans l'oncogène v-myb d'un mutant du virus E26, ts143 E26, thermosensible pour la transformation myéloïde .  
(Résumé de l'article I)

**II<sup>ème</sup> PARTIE :** Introduction de la mutation Thr-> Arg dans l'oncogène v-myb du virus AMV .

**III<sup>ème</sup> PARTIE:** Construction de virus E26 mutés dans les oncogènes v-myb et/ou v-ets et caractérisation de leur effet biologique dans le système de cellules de neurorétine de poulet . (Article II)

DISCUSSION ET CONCLUSION .....114

BIBLIOGRAPHIE .....119

ANNEXE .....143

Articles : R.LI, M.DUTERQUE-COQUILLAUD, C.LAGROU, B.DEBUIRE, T.GRAF,  
D.STEHELIN and D.LEPRINCE.

A single amino-acid substitution in the DNA-binding domain of the v-myb oncogene confers a thermolabile phenotype to E26 transformed myeloid cells.

Oncogene Research, in press.

## **PRESENTATION DU MEMOIRE**

## PRESENTATION DU MEMOIRE

Le sujet de ce mémoire concerne la caractérisation de mutants des rétrovirus aviaires E26 et AMV. Dans leur oncogène v-myb, ils présentent soit des mutations ponctuelles responsables du phénotype de transformation thermosensible des cellules myéloïdes dans le cas de E26, soit des mutations par délétions réalisées *in vitro* par génie génétique.

Les effets de ces mutations sur les propriétés transformantes de ces virus ont été analysées en utilisant deux systèmes biologiques différents.

- la transformation des cellules hématopoïétiques qui est classiquement utilisée pour l'étude des rétrovirus défectifs des leucémies aiguës.

- la prolifération des cellules de neurorétine de poulet qui s'est révélée être un système de choix pour l'étude de l'oncogène myb.

Dans la première partie des résultats nous avons cloné et séquencé le gène myb d'un mutant du virus E26, ts 143 E26, thermosensible pour la transformation myéloïde sans que la transformation érythroïde soit affectée. Nous avons mis en évidence une mutation ponctuelle : la Thréonine en position 68 dans le virus E26 de type sauvage qui est remplacée par une Arginine dans le mutant thermosensible.

Cette mutation est située dans le domaine aminoterminal phylogénétiquement conservé, impliqué dans la fixation à l'ADN des protéines myb. Elle est responsable à elle seule du phénotype de transformation thermosensible des cellules myéloïdes.

Dans la deuxième partie des résultats, nous avons introduit la même mutation dans l'oncogène v-myb du virus AMV et suggéré que cette mutation, induisant un phénotype de transformation thermosensible dans le cas du virus E26, rendait le virus AMV incapable de transformer des cellules myéloïdes *in vitro*.

Dans la troisième partie des résultats, nous avons utilisé un nouveau système biologique permettant l'étude des propriétés de l'oncogène myb : les cellules de neurorétine de poulet (CNR). Nous avons montré que l'oncogène v-myb pouvait induire la prolifération de CNR. Le domaine aminoterminal de la protéine myb est requis pour cette activité, alors qu'une région phylogénétiquement conservée dans la partie 3' du gène myb joue un rôle accessoire et affecte la vitesse de prolifération des CNR.

Pour pouvoir situer nos travaux dans le contexte des rétrovirus et des oncogènes, nous avons développé l'introduction de ce mémoire en cinq chapitres.

Dans le premier chapitre, nous avons tenté de résumer brièvement la structure des rétrovirus, et surtout la structure et la fonction des rétrovirus défectifs des leucémies aviaires dont font partie les rétrovirus AMV et E26.

Les données publiées auparavant ont montré que les rétrovirus AMV et E26 ne transformaient que des cellules hématopoïétiques, le second chapitre a donc été réservé au système hématopoïétique. Après une présentation des cellules hématopoïétiques, nous avons décrit les effets des produits des oncogènes viraux sur la prolifération et la différenciation de ces cellules, ainsi que les mécanismes d'activation et de coopération entre oncogènes dans ce système. Ce chapitre se termine par la description des effets de ces oncogènes dans d'autres systèmes biologiques tel le système "neurorétine" puisqu'il a été montré au laboratoire que les cellules de neurorétine de poulet constituaient un modèle d'étude des virus AMV et E26.

Les produits des virus AMV et E26 (p45<sup>v</sup>-myb et P135gag-myb-ets) se localisant dans le noyau, nous avons donc développé un troisième chapitre sur les oncogènes nucléaires : la famille des oncogènes nucléaires et les mécanismes possibles pour la transformation par ces oncogènes.

Le quatrième et le cinquième chapitre sont consacrés aux rétrovirus AMV et E26, et aux oncogènes myb et ets présents dans ces deux virus. Pour cela, nous avons tout d'abord décrit la fonction biologique et la structure de ces deux virus. Ensuite, nous avons présenté les modes d'expression et les produits de traduction des oncogènes myb et ets. Enfin, nous avons terminé ces chapitres par l'implication possible des proto-oncogènes c-myb et c-ets dans la tumorigénicité.

# **INTRODUCTION**

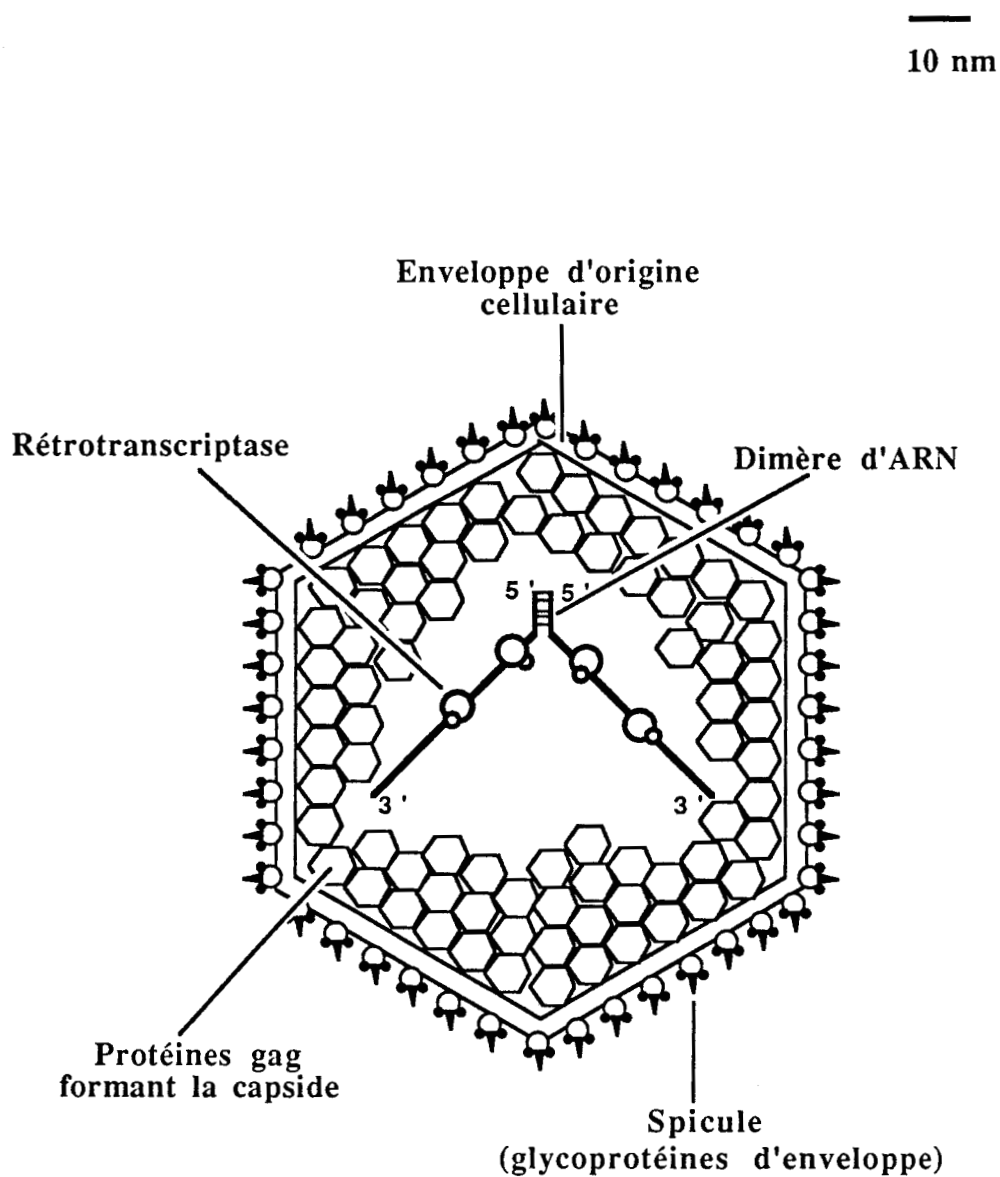


Figure 1: Morphologie d'une particule virale.



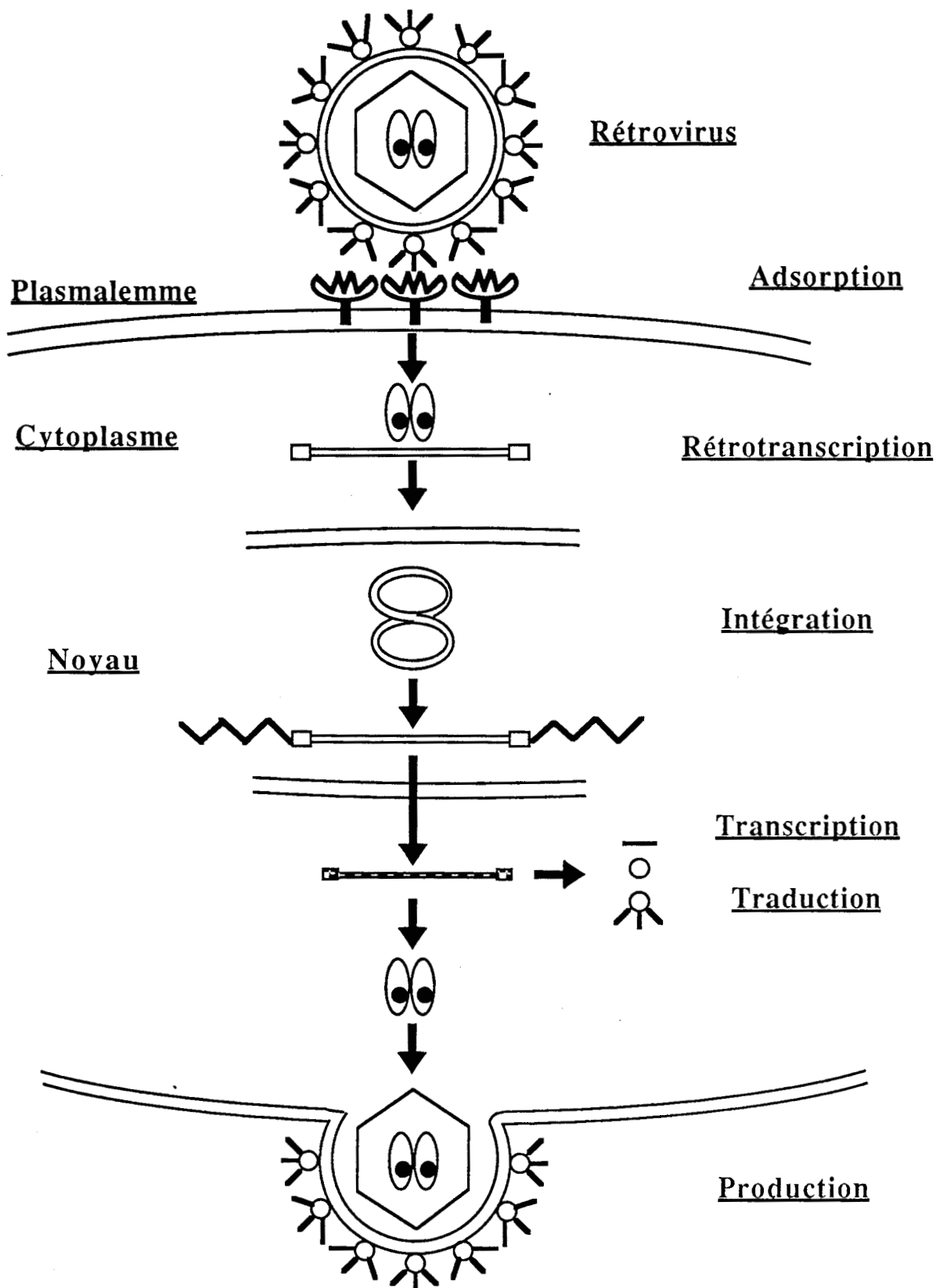


Figure 2: Schéma général de la propagation des rétrovirus.

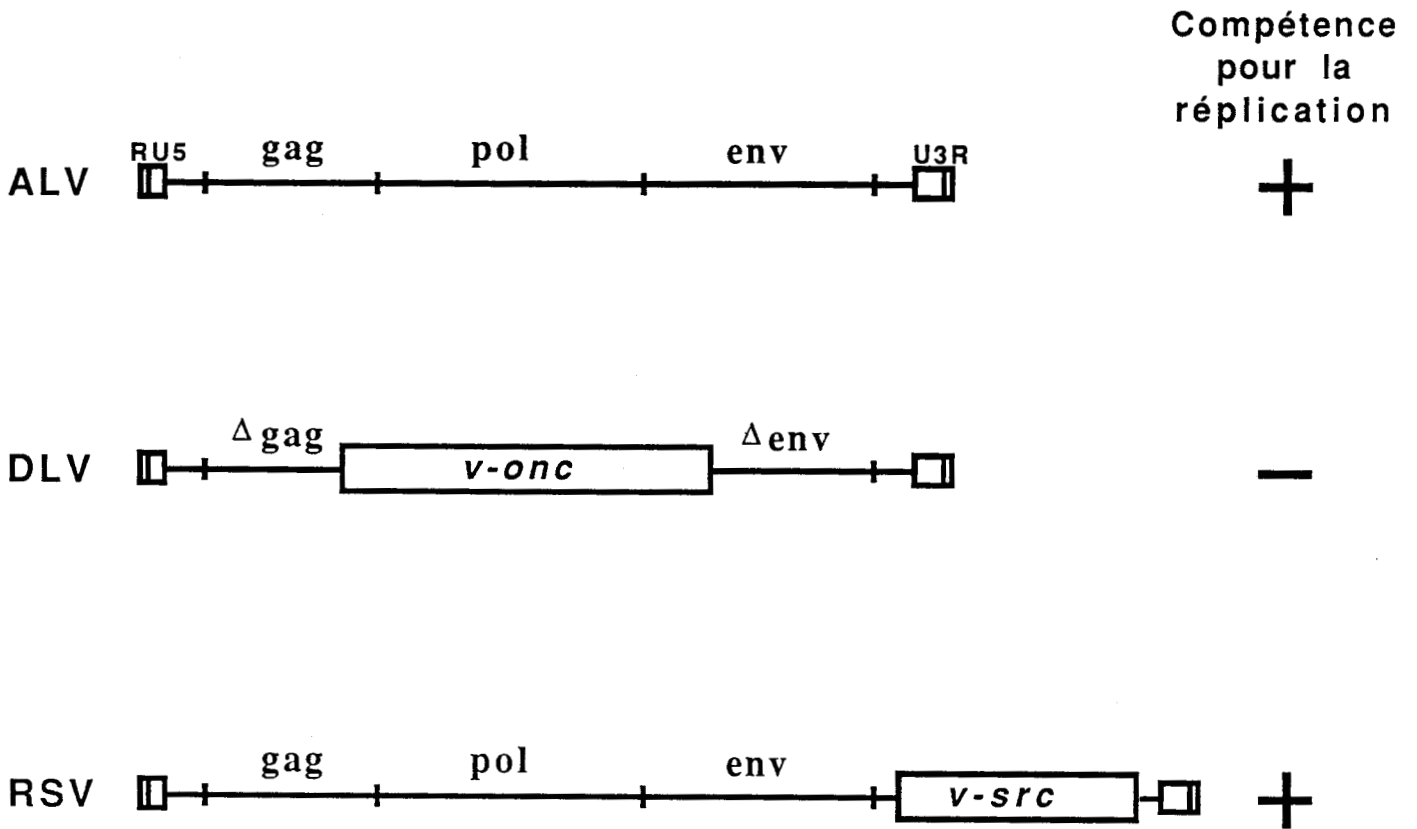


Figure 3 :Génome des rétrovirus et compétence pour la réplication.

# I. RETROVIRUS LEUCEMOGENES

## I-1. GENERALITES

Les rétrovirus sont des virus dont le génome diploïde est constitué d'ARN. Ces virus possèdent une enzyme spécifique, la rétrotranscriptase (Baltimore, 1970 ; Temin et Mizutani, 1970), qui synthétise l'ADN à partir de l'ARN viral servant de matrice. Ils utilisent tous le même mode de propagation : la particule virale (Figure 1) s'absorbe sur des récepteurs présents à la surface de la cellule hôte et pénètre dans la cellule. L'ARN viral associé à la rétrotranscriptase est aussitôt transcrit en ADN double brin linéaire, puis circularisé. L'ADN s'intègre dans le génome de la cellule et, en utilisant la machinerie cellulaire, il est transcrit et traduit comme des gènes cellulaires. Les rétrovirus possédant tous les gènes nécessaires à leur réplication sont reconstitués dans la cellule et la quittent par bourgeonnement (Figure 2). Le génome de ces virus compétents pour la réplication est constitué des gènes *gag*, *pol* et *env* :

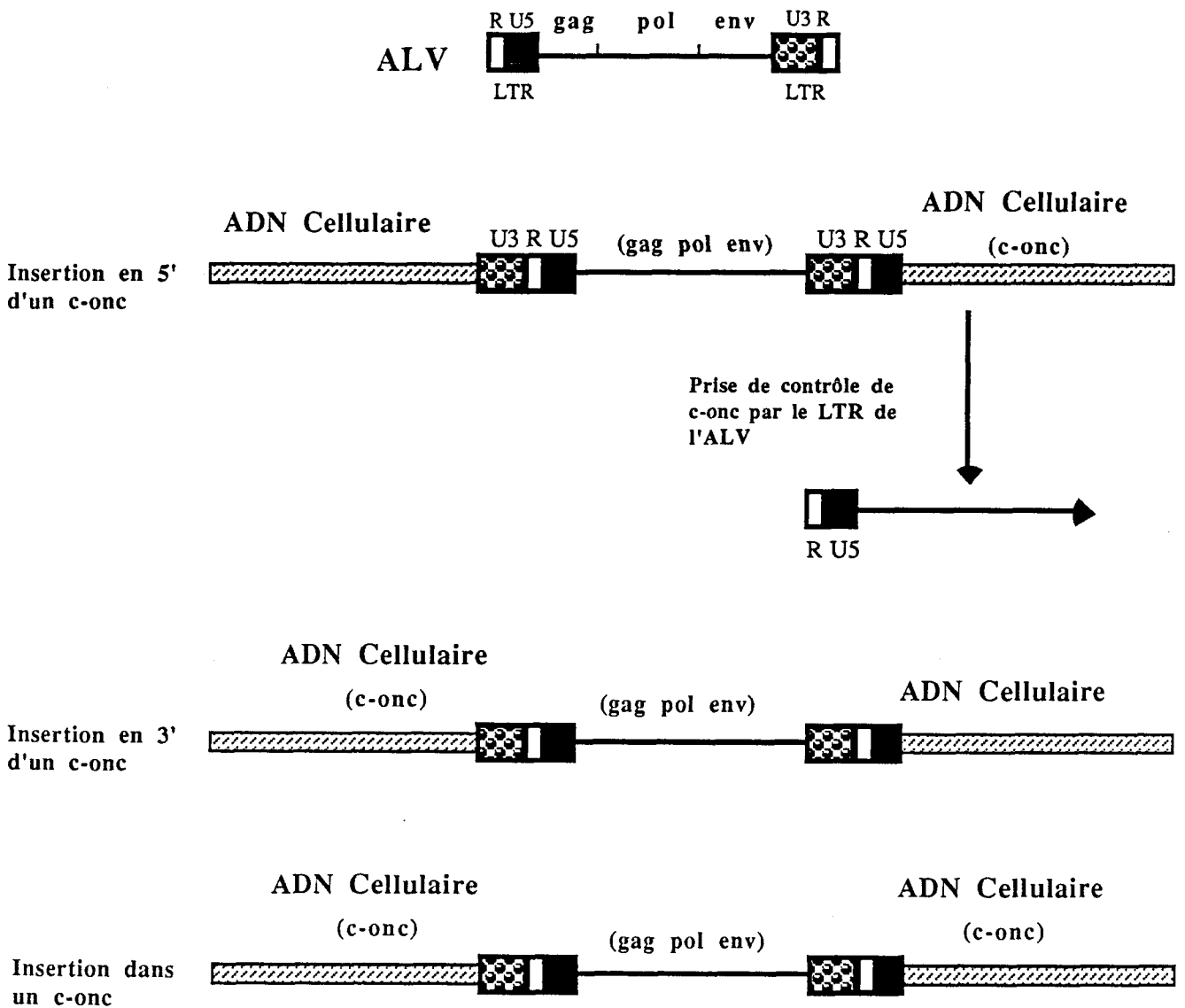
- le gène *gag* code pour les protéines de la capsid interne.
- le gène *pol* code pour une enzyme : la rétrotranscriptase.
- le gène *env* code pour les protéines de l'enveloppe virale.

Les rétrovirus oncogènes sont des rétrovirus qui possèdent un ou deux oncogènes (*v-onc*). Ces oncogènes sont responsables des propriétés transformantes du virus, et dérivent de gènes cellulaires normaux (proto-oncogènes ou *c-onc*). Ils remplacent, dans la plupart des cas, certaines parties des gènes viraux; ces virus sont alors défectifs pour la réplication et ont besoin pour se propager d'un rétrovirus auxiliaire appelé "helper", compétent pour la réplication et dépourvu d'oncogène. Il existe une exception notable parmi les rétrovirus oncogènes : le virus du sarcome de Rous qui contient l'oncogène *v-src* (Figure 3) (Rous et Murphy, 1911; Martin, 1970 ; Duesberg et Vogt, 1970 ; Lai et al., 1973 ; Stehelin et al., 1976). L'acquisition de cette séquence spécifique s'étant faite sans perte de séquences virales nécessaires au cycle infectieux, le virus n'est pas défectif pour la réplication.

Les rétrovirus oncogènes peuvent induire des tumeurs *in vivo* et transformer des cellules *in vitro*. Les tumeurs les plus fréquemment associées aux rétrovirus oncogènes peuvent être classées en trois grands groupes en fonction de leur tissu d'origine :

- 1 : les sarcomes qui proviennent des tissus conjonctifs
- 2 : les carcinomes qui proviennent des tissus épithéliaux
- 3 : les lymphomes et les leucémies qui proviennent des tissus hématopoïétiques

L'étude des propriétés biologiques des rétrovirus oncogènes est complexe ; chacun d'eux pouvant induire plusieurs types de tumeurs.



**Figure 4: Activation d'un c-onc par insertion d'un promoteur viral: "LTR-activation".**

## I-2. RETROVIRUS LEUCEMOGENES NON OU PEU TRANSFORMANTS.

Dans chaque espèce où on a mis en évidence des rétrovirus leucémogènes, on a également trouvé au moins un virus de type "helper". Nous nous intéressons aux deux principales familles de ces rétrovirus : les virus des lymphomes aviaires et murins (ALV et MuLV). Ils sont tous compétents pour la réplication et ne possèdent pas de v-onc. Ils ne peuvent pas transformer des cellules en culture. En revanche, ils peuvent induire, chez l'animal, des lymphomes dont le temps d'apparition est généralement assez long (de 1 à 12 mois), et dont l'efficacité d'apparition est généralement assez faible (20-60 % des animaux infectés développent une leucémie) (Neel et al., 1981), par rapport à ceux induits par les rétrovirus transformants.

Cette transformation *in vivo* peut être due à l'activation de gènes cellulaires par intégration de provirus -complets ou non- à leur proximité (Figure 4). Ce type d'activation a déjà été démontré dans certaines tumeurs (Table 1). Par exemple, on a beaucoup étudié l'activation du gène c-myc par les séquences promotrices (LTR) de rétrovirus insérés à sa proximité dans des lymphomes B et des lymphomes T, chez le poulet et chez la souris (Hayward et al., 1981 ; Payne et al., 1982 ; Corcoran et al., 1984 ; Linial et Groudine., 1985). Un ALV ou un MuLV est intégré à proximité ou dans le locus c-myc. La plupart des virus intégrés sont incomplets ; certains, même, ne sont plus représentés que par l'un de leurs LTR. Dans chaque cas, le taux de transcrits du gène c-myc est de 20 à 30 fois plus élevé que celui observé dans des cellules normales. Les ARN myc initiés soit à partir du promoteur viral soit à partir des promoteurs propres à c-myc sont probablement activés par les séquences "enhancer" du LTR proviral. Cet "enhancer" du LTR proviral peut être intégré dans n'importe quelle partie en 5' ou en 3' du c-onc, et dans quelle qu'orientation que ce soit (Khoury et Gruss, 1983). Un autre exemple de l'activation de c-onc par insertion virale est celui de c-erbB dans l'érythroblastose induite par un ALV. Dans ce cas, l'insertion du virus a lieu dans la région où le gène viral v-erbB est amputé (Raisnes et al., 1985). Le gène activé ou amplifié n'est pas forcément un gène transduit par ailleurs dans un rétrovirus mais peut être par exemple, un gène codant pour un facteur de croissance de cellules hématopoïétiques (IL3, IL2 etc) (Ymer et al., 1985 ; Chen et al., 1985). L'activation transcriptionnelle de gènes codant pour des facteurs de croissance peut être l'une des étapes du mécanisme amenant une cellule à devenir tumorigène. L'émergence de cellules hématopoïétiques indépendantes vis à vis de ces facteurs (pour leur croissance) est un événement fréquemment observé dans la progression de ces cellules vers la tumorigénicité (Heard et al., 1984 ; Sporn et Robert, 1985). Lang et al. (1985) ont pu montrer que des cellules hématopoïétiques non tumorigènes et dépendantes du facteur de croissance GM-CSF pour proliférer devenaient tumorigènes après infection par un rétrovirus contenant le gène codant pour ce facteur.

## I-3. RETROVIRUS LEUCEMOGENES TRANSFORMANTS.

| Gène activé                | Espèce | Tumeur ou lignée            | Origine du promoteur viral          | Références             |
|----------------------------|--------|-----------------------------|-------------------------------------|------------------------|
| c-myc                      | Poulet | Lymphome B                  | ALV(RAV-1, RAV-2, td-SRA)           | Hayward et al., 1981   |
|                            | Souris | Lymphome T                  | C.P.A.(Intra Cisternal Particule A) | Greenberg et al., 1985 |
|                            |        | Plasmocytome                | MCF                                 | Corcoran et al., 1984  |
|                            | Rat    |                             | MLV                                 | Tsichlis et al., 1985  |
|                            | Chat   | Lymphome T                  | FeLV                                | Neil et al., 1984      |
| c-erb B                    | Poulet | Erythroblastose             | ALV(RAV-1)                          | Raisnes et al., 1985   |
| c-myb                      | Souris | Tumeurs myéloïdes           | MLV                                 | Shen-Ong, 1986         |
| c-mos                      | Souris | Plasmocytome                | C.P.A.                              | Canaani et al., 1983   |
| pim 1                      | Souris | Lymphome T                  | MCF                                 | Cuypers et al., 1984   |
| int 1<br>int 2             | Souris | Carcinome mammaire          | MMTV                                | Peters et al., 1984    |
| int 41                     | Souris | Carcinome mammaire et rénal | MMTV                                | Garcia et al., 1986    |
| Mlvi 1<br>Mlvi 2<br>Mlvi 3 | Rat    | Lymphome T                  | MLV                                 | Tsichlis et al., 1985  |
| Mis 1                      | Rat    | Lymphome T                  | MLV                                 | Jolicoeur et al., 1985 |
| IL-3                       | Souris | Promyélocytique(WEHI 3B)    | C.P.A.                              | Ymer et al., 1985      |
| IL-2                       | Singe  | Lymphome T(MLA-144)         | GLV                                 | Chen et al., 1985      |
| fim 1<br>fim 2             | Souris | Leucémies Myéloblastiques   | F-MLV                               | Sola et al., 1986      |

**Table1: Quelques exemples d'activation de gène par des promoteurs viraux**

| VIRUS   | v-onc        | Maladie                    | Hôte   | Protéine v-onc                     | Activité            | Localis.                        | PRO. c-onc                       | Activité                                   | Localis.                        | Références  |
|---------|--------------|----------------------------|--------|------------------------------------|---------------------|---------------------------------|----------------------------------|--|---------------------------------|---|
| AEV-ES4 | erbA<br>erbB | Erythroblastose<br>Sarcome | Poulet | gag-erbA<br>P75<br>erbB<br>gp74    |                     | Noyau (erbA)<br>Membrane (erbB) | p40/46                           | Réc. Horm. Thy<br>Tyr.Kinase Récepteur EGF | Noyau (erbA)<br>Membrane (erbB) | Sap et al.,1986   |
| AEV-H   | erbB         | Erythro. Sarcome           | Poulet | erbB<br>gp74                       | Tyr. Kin.           | Membrane Plasmique              | gp170 (homme)                    | Tyr.Kin.<br>Réc.EGF                        | Tran.Mbr.                       | Downward et al.,1984  |
| MC29    | myc          | Myélocyto. Carcinome       | Poulet | gag-myc<br>P110                    | Affinité pour l'ADN | Noyau                           | p58                              | Affinité pour l'ADN                        | Noyau                           | Patshinsky et al.,1986  |
| CMII    |              | Myélocy tomatose           |        |                                    |                     |                                 |                                  |  |                                 |   |
| OK10    |              | Endothél.                  |        |                                    |                     |                                 |                                  |  |                                 |   |
| MH2     | myc<br>mil   | Endothél. Carcinome        | Poulet | v-myc<br>p61/63<br>gag-mil<br>P100 | mil Thr/Ser Kin.    | mil Cytoplasme                  | p71<br>p73                       | mil Thr/Ser Kin.                           |                                 | Patshinsky et al., 1986<br>Denhez et al.,1988                           |
| AMV     | myb          | Myélobl.                   | Poulet | v-myb<br>p45                       | Affinité pour l'ADN | Noyau                           | p75                              | Affinité pour l'ADN                        | Noyau                           | Klempnauer et al.,1984  |
| E26     | myb<br>ets-1 | Myélobl. Erythro.          | Poulet | gag-myb-ets<br>P135                | Affinité pour l'ADN | Noyau                           | c-ets-1<br>p54<br>c-ets-1<br>p68 | Affinité pour l'ADN                        | Noyau                           | Ghysdalet al.,1986(a,b)<br>Leprince et al.,1988<br>Pognonec et al.,1989 |
| S13     | sea          | Erythro. Sarcome           | Poulet | env-sea<br>gp155<br>gp85+gp70      | Tyr.Kin. (gp70)     | Cytoplasme                      |                                  |  |                                 | Hayman et al.,1985  |
| REV-T   | rel          | Réticulo-e ndothéliose     | Poulet | env-rel<br>P59                     | Affinité pour l'ADN | Noyau<br>Cytoplasme             | c-rel<br>p68                     | Affinité pour l'ADN                        |                                 | Gilmore et Temin,1986   |

**Table2: Les virus défectifs des leucémies aviaires et leurs oncogènes**

| VIRUS  | v-onc | Maladie    | Hôte   | Protéine v-onc | Activité  | Localis.           | PRO. c-onc | Activité | Localis.   | Référence             |
|--------|-------|------------|--------|----------------|-----------|--------------------|------------|----------|------------|-----------------------|
| Ab-MLV | abl   | Leuc. PrÉB | Souris | gag-abl P160   | Tyr. Kin. | Membrane Plasmique | p150       |          | Cytoplasme | Hunter et Cooper,1985 |

**Table 3 : Le virus défectif de leucémie murine et son oncogène**



Ces virus, des DLV (Defective Leukemia Viruses), sont défectifs pour la réplication. Ils nécessitent la présence d'un virus auxiliaire "helper" pour se propager. Ils contiennent un ou deux oncogènes (v-onc) possédant des homologues cellulaires (c-onc). Une dizaine de rétrovirus leucémogènes (Table 2 et Table 3) a déjà été isolée à partir de tumeurs solides ou de leucémies, principalement chez le poulet (Beard, 1963 ; Graf et Beug, 1978 ; Moscovici et Gazzolo, 1982).

Ces virus possèdent en commun la propriété d'affecter le système hématopoïétique de l'animal infecté. *In vivo*, ils induisent des leucémies aiguës dont les temps d'apparition sont très courts : la mort intervient, dans 100 % des cas, au bout de quelques semaines voire quelques jours après l'infection (Graf et Beug, 1978, RNA Tumor Viruses, 1985). *In vitro*, ils stimulent la prolifération de cellules peu ou non matures, et/ou bloquent leur différenciation. Toutefois, certains de ces virus peuvent induire d'autres types de tumeurs comme des sarcomes ou des carcinomes. Certains sont également capables de transformer *in vitro* d'autres types de cellules comme les fibroblastes. Par exemple, le virus S13 peut induire des sarcomes et des érythroblastoses et transformer *in vitro* les fibroblastes et les cellules érythroïdes (Hayman et al., 1985). De même, certains virus de sarcome peuvent induire des leucémies et transformer des cellules hématopoïétiques (Table 2).

La fonction, la caractérisation et les mécanismes possibles pour la transformation *in vivo* et *in vitro* vont être présentés plus précisément dans les chapitres suivants.

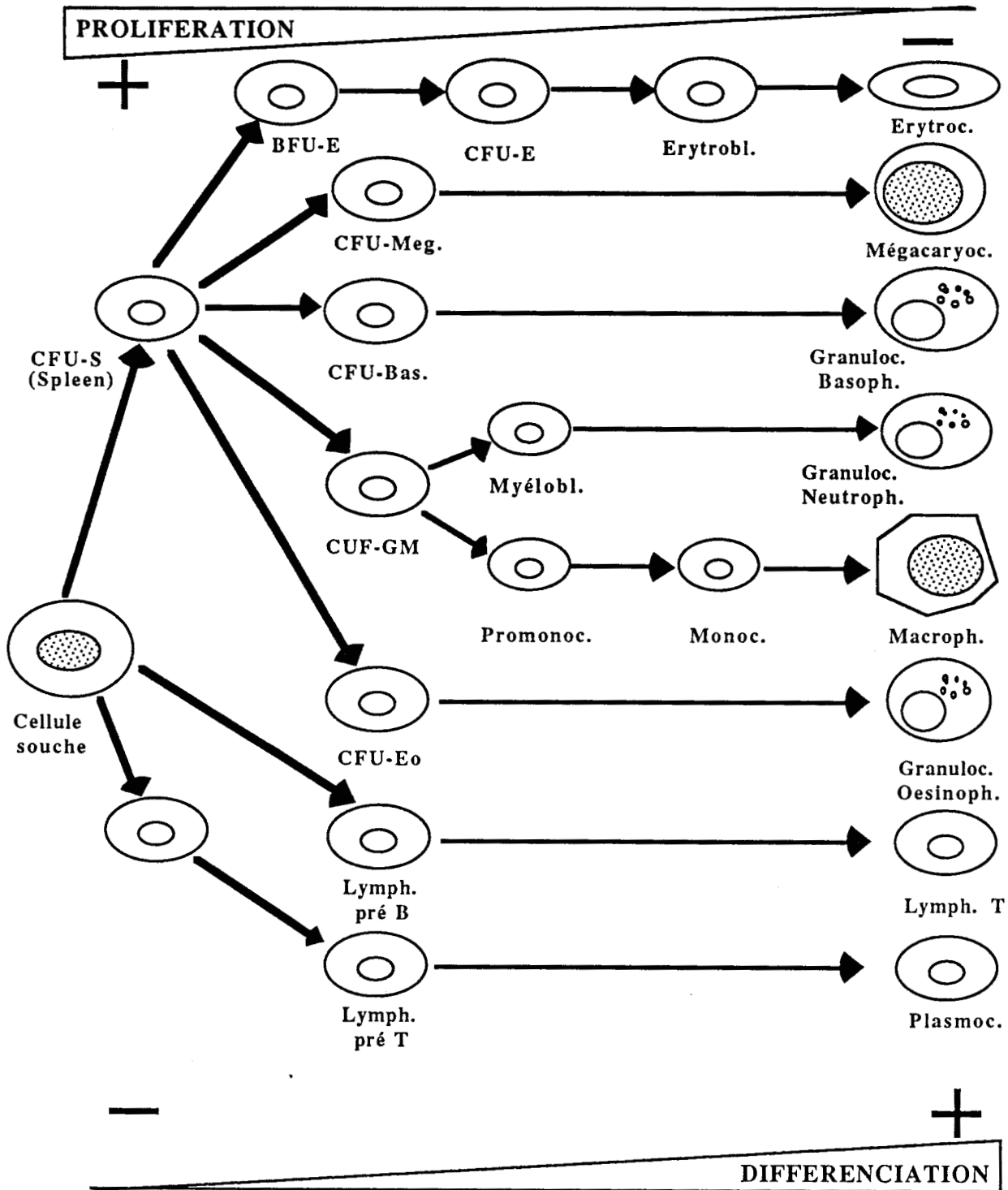
## II. ONCOGENES ET SYSTEME HEMATOPOIETIQUE.

### II-1. CELLULES ET FACTEURS HEMATOPOIETIQUES.

#### A. Les cellules hématopoïétiques.

Les cellules hématopoïétiques sont complètement différentes des certains types des cellules. Elles ont une durée de vie très courte : les granulocytes et les érythrocytes ne peuvent vivre respectivement que pendant quelques heures et quelques semaines (Whetton et Dexter, 1986). Elles sont constamment produites pour remplacer des cellules mortes et subvenir au besoin d'un organisme (Alberts et al., 1983). Elles sont toutes originaires du même type de cellules souches multipotentes. Une cellule souche peut s'autorenouveler ou se différencier en cellules progénitrices de l'une ou l'autre des voies de différenciation hématopoïétique. Ces cellules progénitrices peuvent se différencier à leur tour pour donner des cellules matures.

On peut distinguer différents types de cellules matures (Figure 5) (Clark et Kamen, 1987) : le



**Figure 5: Schéma de l'hématopoïèse**

lymphocyte B, le lymphocyte T, les granulocytes (éosinophile, basophile et neutrophile), le macrophage, le mégacaryocyte et l'érythrocyte. A partir de cellules de moelle osseuse, on peut visualiser, selon les conditions de culture utilisées, certains précurseurs à des stades de développement bien particulier. Par exemple, deux types principaux de précurseurs des érythrocytes peuvent être visualisés par culture en milieu semi-solide: BFU-E (Erythrocytic Burst-Forming Unit) et CFU-E (Erythrocytic Colony-Forming Unit).

Les cellules de moelle osseuse peuvent être cultivées *in vitro* :

\*soit en milieu liquide en présence d'un tapis de cellules nourricières ("feeder"). Dans ce cas, on obtient un mélange de cellules appartenant à différentes lignées à différents stades de différenciation.

\*soit en milieu semi-solide où on obtient des colonies de cellules appartenant généralement à la même lignée (Sachs 1964; Ginsburg et Sachs, 1963 ;Sachs, 1987 ).

Enfin, la prolifération et la différenciation de toutes ces cellules hématopoïétiques sont sous le contrôle d'une classe d'hormones, des glycoprotéines connues sous le nom de CSF (Colony Stimulating Factors).

#### B. Les facteurs de croissance hématopoïétiques.

Les facteurs présents dans le système hématopoïétique sont identifiés par leur capacité à stimuler la croissance de colonies de cellules d'une lignée précise ou plusieurs lignées, dans un milieu de croissance semi-solide (Metcalf, 1977 ; Cline et Golde, 1979). Une dizaine des facteurs a été distinguée dans le système hématopoïétique de la souris (Table 4). Le M-CSF (ou CSF-1) stimule spécifiquement la croissance des macrophages et de leurs précurseurs directs ; le G-CSF stimule la prolifération des précurseurs de granulocytes ; le GM-CSF (ou CSF-2) stimule la croissance des cellules à l'origine des macrophages et des granulocytes ; le multi-CSF (ou interleukine-3 (IL-3)), produit par des lymphocytes T activés, permet la formation de colonies de précurseurs érythroïdes, éosinophiles, mégacaryocytes, neutrophiles et macrophages ainsi que la stimulation de la cellule souche elle-même (Metcalf, 1985 ; Whetton et Dexter, 1986) ; le "pluripotent CSF" permet la croissance des colonies mixtes de granulocytes et macrophages, et la croissance de colonies de précurseurs des cellules érythroïdes (Welte et al. 1985). Plusieurs facteurs sont actifs sur des cellules lymphoïdes : l'interleukine 2 (IL-2) permet la prolifération et la maturation de lymphocytes T et B (Clark et Kamen, 1987) ; les interleukines 4 et 5 (IL-4 et IL-5) permettent la maturation de lymphocytes B (Sherr, 1987) ; l'IL-3 peut aussi stimuler la prolifération et la différenciation de lymphocytes B et T.

Certains facteurs ont besoin de coopérer avec d'autres facteurs pour être actifs. L'hémopoïétine-1 (H-1) ne peut stimuler la croissance de précurseurs hématopoïétiques qu'en

| Facteur de croissance  | Espèce            | Poids Moléculaire | Poids Moléculaire de Récepteur | Cellules Cibles   | Références                   |
|--|-------------------|-------------------|--------------------------------|---|------------------------------|
| <b>IL-3</b><br>(Interleukine 3)  | Murine            | 23-26kd           | 50-70kd                        | Cellule souche<br>CFU-S BFU-E<br>CFU-GM<br>CFU-Eo<br>CFU-Meg<br>Précurseurs des<br>Granulocytes<br>Précurseurs des<br>Macrophages | Metcalf,1985                 |
| <b>IL-4</b><br>(Interleukine 4)  | Murine            | 20kd              |                                | Lymphocytes<br>B et T<br>Mastocytes   | Lee et al.,1986              |
| <b>GM-CSF</b><br>(Granulocyte-Macrophage<br>Colony Stimulating Factor) | Murine<br>Humaine | 23kd<br>30kd      | 51kd                           | CFU-GM<br>CFU-Eo<br>CFU-Meg   | Walker et<br>Burgers,1985    |
| <b>G-CSF</b><br>(Granulocyte-Colony<br>Stimulating Factor)             | Murine<br>Humaine | 25kd<br>30kd      | 150kd                          | Sous-popul. des<br>CFU-GM<br>Précurseurs des<br>Granulocytes  | Nicola et al.,1985           |
| <b>M-CSF</b><br>(Macrophage-Colony<br>Stimulating Factor)              | Murine<br>Humaine | 76kd<br>45kd      | 150kd                          | Sous-popul. des<br>CFU-GM<br>Précurseurs des<br>Macrophages   | Kawasaki et al.,1985         |
| <b>EPO</b><br>(Erythropoïétine)  | Murine            | 20kd              |                                | CFU-E   | Krantz et<br>Goldwasser,1984 |
| <b>H-1</b><br>(Hémopoïétine<br>Interleukine- <i>h</i> )                | Murine<br>Humaine | 39kd<br>20kd      |                                | Cellule souche<br>CFU-S<br>(en synergie avec<br>IL-3 et M-CSF)  | Stanley et al.,1986          |
| <b>IL-5</b><br>(Interleukine 5)  |                   |                   |                                | Lymphocytes B   |                              |

**Table 4: Facteurs de croissance des cellules  
hématopoïétiques**

(Whetton et Dexter,1986)

présence de CSFs ; avec l'IL-3, il augmente d'environ 30 fois le nombre de colonies multipotentes (Stanley et al., 1986). L'association du CSF-1 avec l'IL-3 permet de stimuler des cellules plus primitives que celles stimulées par le CSF-1 ou l'IL-3 agissant seuls. Certains facteurs sont spécifiques de certaines lignées cellulaires: l'érythropoïétine est spécifique de la lignée érythroïde qui en outre nécessite la présence de surnageants de cultures de cellules de rate stimulées par la concanavaleine A (BPA : Burst Promoting Activity ) chez le poulet (Moscovici et Gazzolo, 1982).

Bien que les facteurs de croissance hématopoïétique permettent la survie, la prolifération et le développement des cellules hématopoïétiques *in vitro*, leurs rôles ne sont pas encore clairement prouvés *in vivo*. Seul le rôle de l'érythropoïétine a été démontré jusqu'à maintenant : la prolifération des cellules érythroïdes, le développement et la maturation des cellules rouges sont reliées à l'activité de l'érythropoïétine (Burgess et Nicola, 1983).

Comme tous les facteurs de croissance polypeptidiques, les facteurs agissants dans le système hématopoïétique se fixent à des récepteurs présents à la surface des cellules cibles. Dans le cas de l'IL-3, du GM-CSF, du CSF-1 et du G-CSF marqueurs, la fixation spécifique à des récepteurs correspondants a pu être démontrée. Il n'y a pas de récepteurs communs pour ces facteurs. De plus, leurs récepteurs pour différentes espèces sont différents (Metcalf, 1985 ; Nicola et al., 1985 ; Walker et Burgess, 1985).

## II-2. EFFET DES PRODUITS DES ONCOGENES VIRAUX SUR LES CELLULES HEMATOPOIETIQUES.

### A. Effet des produits des oncogènes viraux sur la prolifération et la différenciation des cellules hématopoïétiques.

La caractéristique la plus remarquable d'une cellule tumorale est souvent sa capacité fortement accrue à proliférer, ce qui la conduit parfois à l'immortalisation. Cette prolifération pour des cellules normales est généralement dépendante de facteurs de croissance qui transmettent un signal de la surface de la cellule au noyau, par l'intermédiaire d'une "cascade" d'évènements. Une possibilité de "cascade" d'évènements ainsi que les facteurs mis en jeu a été représentée dans la Figure 6 (Goustin et al., 1986 ; Rozengurt, 1986). On pourra regrouper schématiquement ces évènements en trois étapes :

\*Le facteur de croissance se fixe sur son récepteur disposé à la surface de la cellule cible. Le récepteur une fois occupé, s'internalise et active son propre domaine tyrosine kinase, dans le cas où le récepteur est un tyrosine kinase. Le récepteur activé peut également phosphoryler différentes protéines cellulaires.

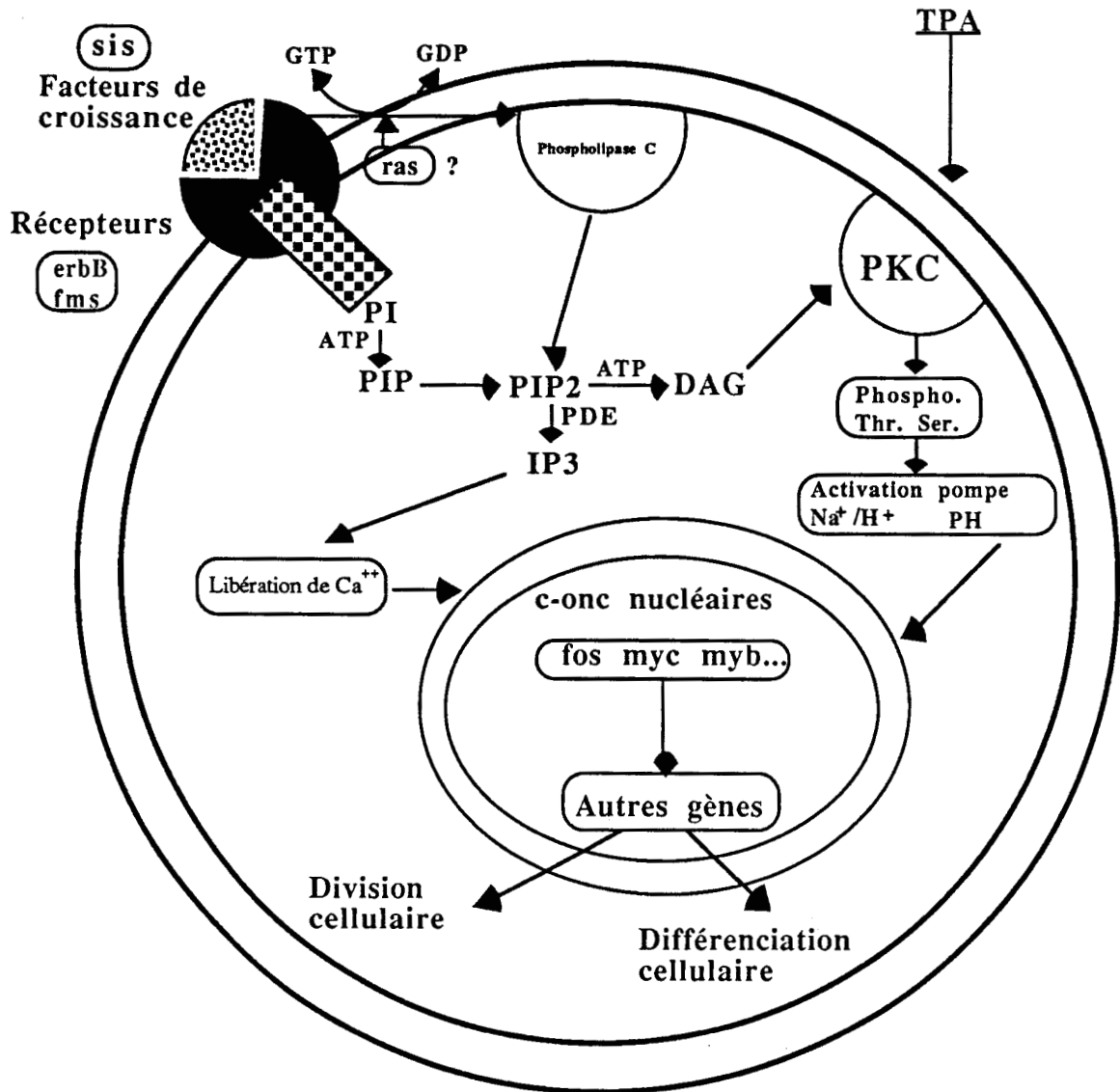


Figure 6: La "cascade" des oncogènes

\* La transmission du signal mitotique.

Cette interaction récepteur/ligand peut stimuler par exemple une phospholipase C (phosphodiesterase PDE) qui permet d'abord l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5 diphosphate (PIP<sub>2</sub>) en inositol triphosphate IP<sub>3</sub> et en diacylglycérol (DAG). Ensuite l'augmentation des taux d'inositol triphosphate et de diacylglycérol est suivie d'une augmentation transitoire du taux de calcium intra-cellulaire, d'une activation de la PKC et de l'adényl cyclase (AC) et enfin d'une réorganisation du cytosquelette.

\* La réaction nucléaire.

Par différents effecteurs cytosoliques, le signal mitotique est acheminé jusqu'au noyau pour aboutir à la transcription de certains gènes et à la synthèse d'ADN. Ainsi, après traitement au PDGF, les fibroblastes expriment successivement de très hauts taux d'ARN messagers du gène c-fos et du gène c-myc.

Les produits des v-onc peuvent intervenir à tous les niveaux de cette "cascade" d'évènements.

a. Les facteurs de croissance et leurs récepteurs.

Le gène v-sis est l'homologue de la chaîne  $\beta$  du PDGF " Platelet Derived Growth Factor " (Waterfield et al., 1983). Aucun autre v-onc ne présente d'homologie avec des facteurs de croissance hématopoïétique.

Cependant, l'infection par un DLV peut rendre des cellules indépendantes vis à vis des facteurs de croissance. Après l'infection par A-MuLV (portant l'oncogène v-abl), on a pu obtenir une lignée de cellules lymphoïdes et une lignée de cellules myéloïdes indépendantes de leurs facteurs de croissance respectifs (IL-3 et GM-CSF) (Mathey-Prevot et al., 1986 ; Cook et al., 1985 ; Pierce et al., 1985).

Le produit de v-ras est capable de stimuler des précurseurs de cellules érythroïdes murines à proliférer et se différencier en présence de l'érythropoïétine; par contre, la sur-infection de ces cellules par le virus Abelson (v-abl), permet à la différenciation érythroïde de se produire en l'absence de ce facteur (Waneck et al., 1986). L'indépendance vis à vis des facteurs de ces cellules sur-infectées par le virus Abelson, s'obtient sans production des facteurs ni changement du niveau d'expression des récepteurs. (Pierce et al., 1985 ; Cook et al., 1985 ; Waneck et al., 1986).

Dans un autre exemple, les myéloblastes transformés par le virus E26 ne requièrent plus de cMGF ("Chicken Myelomonocytic Growth Factor") pour leur croissance après sur-infection par un virus contenant v-src ou un autre oncogène de la famille src. Les cellules sur-infectées par v-src produisent donc de façon autocrine du cMGF ou un autre facteur ayant une fonction similaire à celle du cMGF (Adkins et al., 1984). De même, le produit de l'oncogène v-mil rend les cellules

myéloïdes transformées par v-myc capables de produire leur propre facteur de croissance, le cMGF ( Graf et al., 1986 ).

Il a été démontré que l'homologue cellulaire de l'oncogène viral v-fms, c-fms, est le récepteur du facteur de croissance CSF-1, ou M-CSF spécifique des macrophages (Sherr et al., 1985). Le produit de v-fms, comme celui de v-erbB qui est une version tronquée du récepteur de l'EGF (Downward et al., 1984 ; Ullrich et al., 1984), est différent du produit de son homologue c-fms essentiellement dans sa partie carboxyterminale (Coussens et al., 1986 ; Browning et al., 1986). Les produits de ces deux v-onc (v-fms et v-erbB) sont des protéines trans-membranaires, glycosylées qui possèdent une activité tyrosine kinase (Rettenmier et al., 1985). La présence de ces protéines dans la membrane plasmique semble indispensable pour la transformation (Beug et Hayman, 1984 ; Roussel et al., 1984). Le mode d'action de ces oncogènes est encore mal défini. Ils pourraient induire la prolifération des cellules infectées en mimant la présence constante d'un facteur de croissance sur son récepteur ou en mimant la fonction du récepteur activé en absence des facteurs.

#### b. La transmission du signal mitotique.

La transmission du signal mitotique met en jeu des protéines membranaires (phospholipases, protéines kinases) ainsi que les seconds messagers.

Certains v-onc transformant des cellules hématopoïétiques interviennent probablement dans cette transmission : parmi eux, deux oncogènes v-abl et v-sea dont les produits sont des tyrosines kinases membranaires. Les tyrosines kinases peuvent être regroupés en deux familles : les tyrosines kinases trans-membranaires qui sont des récepteurs ; les tyrosines kinases associées ou non aux membranes cytoplasmiques qui ne sont pas des récepteurs. Les produits de v-abl et v-sea n'appartiennent pas aux récepteurs tyrosines kinases (Mathey-Prevot et Baltimore, 1988 ; Hayman et al., 1985). Les domaines tyrosines kinases de ces protéines sont très conservés entre eux avec les autres protéines de la famille des tyrosines kinases telle pp60<sup>v-src</sup> (Hunter et Cooper, 1985).

Le domaine tyrosine kinase est très important pour la fonction spécifique de la protéine de v-abl. Quand il est remplacé par le domaine tyrosine kinase de pp60<sup>v-src</sup>, le produit de v-abl ne peut plus transformer les cellules lymphoïdes (Mathey-Prevot et Baltimore, 1988). Le métabolisme et l'importance de ces deux protéines tyrosines kinases ne sont pas encore démontrées. Cependant, il n'y a même pas encore d'évidence directe du rôle de l'activité tyrosine kinase de pp60<sup>v-src</sup> sur son effet biologique. Simplement des mutants dans v-src affectant l'activité kinase, affectent également le pouvoir transformant de v-src (Iba et al., 1984).

D'autres oncogènes intervenant dans la transmission du signal mitotique sont les v-onc appartenant à la famille de v-ras : v-Ki-ras dérivé du virus Kirsten MSV et v-Ha-ras dérivé du virus



Harvey MSV et qui sont traduits sous forme d'une protéine de 21 Kd , p21<sup>ras</sup>. Les p21<sup>ras</sup>, associées à la surface de la membrane plasmique, ont le pouvoir de fixer le GTP ou le GDP et sont capables d'hydrolyser le GTP (Gibbs et al., 1984 ; Hurley et al., 1984 ; Mc Grath et al., 1984 ; Sweet et al., 1984).

La protéine p21<sup>ras</sup> peut également exercer le contrôle de l'adénylate-cyclase chez la levure (Gilman, 1984). L'adénylate-cyclase qui régule la production de l'AMPc est contrôlée par la famille des protéines G qui fixent le GTP. Les protéines G interagissent avec des récepteurs de substances activant ou déprimant l'activité de l'adénylate-cyclase. Une des protéines G, la transducine qui peut activer la phosphodiesterase, a une certaine homologie avec v-ras (Lochrie et al., 1985). L'analogie entre la protéine p21<sup>ras</sup> et les protéines G est encore renforcée par le fait que dans la levure, la protéine p21<sup>ras</sup> est capable de stimuler l'activité adénylate-cyclase de ces cellules (Toda et al., 1985), mais ras n'est pas d'une protéine G. Toutefois, chez les mammifères, la stimulation de l'activité adénylate-cyclase par la p21<sup>c-ras</sup> activée n'a pas encore été détectée (Beckner et al., 1985).

### c. La réaction nucléaire.

La réaction nucléaire inclut les oncogènes dont les produits se localisent dans le noyau. Dans les cellules hématopoïétiques, plusieurs protéines d'oncogènes nucléaires tels que les produits de v-myb, v-myb-ets, v-myc, v-rel et v-erbA sont mises en jeu. Nous en reparlerons plus en détail dans le chapitre : Oncogènes Nucléaires.

### B. Coopération d'oncogènes dans le système hématopoïétique.

La prolifération et la différenciation des cellules sont des mécanismes à étapes multiples et donc des mécanismes complexes ; ainsi l'intervention de deux oncogènes activés au niveau de deux stades de l'évolution vers la transformation de cellules et la formation de tumeurs n'est pas étonnante. D'ailleurs, cette notion d'étapes multiples dans la transformation était déjà connue en cancérologie clinique, ou en cancérogénèse chimique (Cairns, 1975 ; Henning et al., 1983).

L'étude du mécanisme multi-étapes de la transformation des cellules hématopoïétiques chez le poulet est rendue difficile par des conditions de cultures inhabituelles et par le fait que ces cellules ne sont pas transfectables. Un moyen de mettre en évidence une synergie entre oncogènes est fourni par des rétrovirus leucémogènes contenant naturellement plusieurs oncogènes comme MH2, AEV-ES4 et E26.

|  | TRANSFORMATION DES<br>MACROPHAGES | cMGF<br>INDEPENDANCE<br>DES<br>MACROPHAGES |
|--|-----------------------------------|--|
| <b>MH2</b>                                 | <b>+</b>                          | <b>+</b>                                   |
| <b>MH2<br/>MUTANTS<br/>MYC<sup>-</sup></b> | <b>-</b>                          | <b>-</b>                                   |
| <b>MH2<br/>MUTANTS<br/>MIL<sup>-</sup></b> | <b>+</b>                          | <b>-</b>                                   |

Figure 7: Coopération entre les oncogènes  
v-myc et v-mil dans les macrophages aviaires.

| V-ONC   | Cellule souche | BFU-E | CFU-E | Ebl. | Ecy. | CROISSANCE      |                 |                    |
|---|----------------|-------|-------|------|------|-----------------|-----------------|--------------------|
|   |                |       |       |      |      | Milieu complexe | Milieu standard | Dépendance en EPO. |
|   |                |       |       |      |      | +               | -               | +                  |
| v-erbA et v-erbB                                  |                |       |       |      |      | +               | +               | -                  |
| v-erbB ou v-src ou v-ras ou v-sea                 |                |       |       |      |      | +               | -               | -                  |
| 1) v-erbA et 2) v-erbB ou v-src ou v-ras ou v-sea |                |       |       |      |      | +               | +               | -                  |

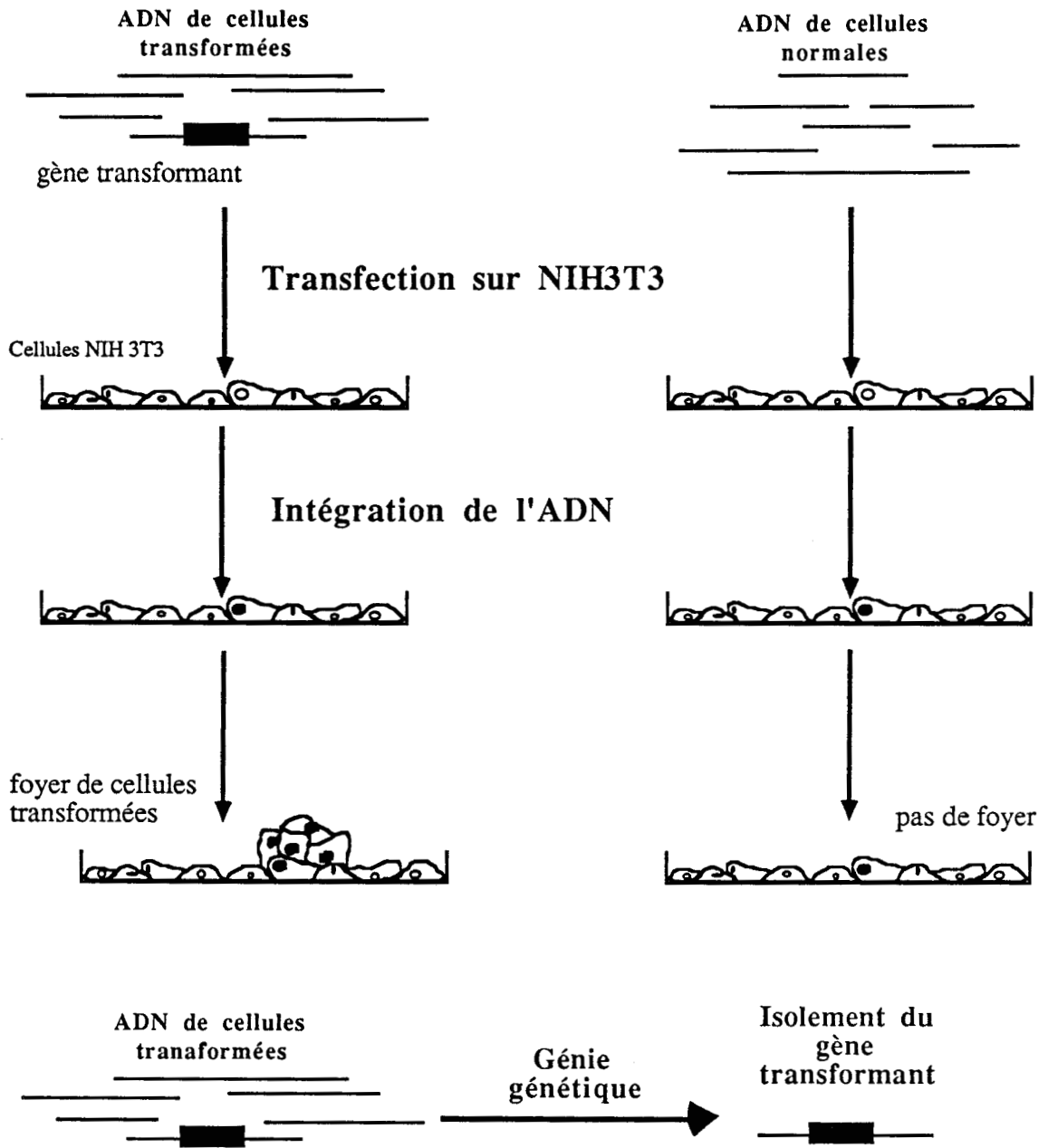
(v-erbA seul sans effets apparents)

**Figure 8: Coopération entre v-erbA et d'autres oncogènes viraux dans la transformation des érythroblastes.**

\* Le virus MH2. Le génome de MH2 contient l'oncogène v-myc trouvé également dans le génome des virus MC29, OK10, CMII (Roussel et al., 1979) et l'oncogène v-mil (Coll et al., 1983a). Comme ces trois virus, le virus MH2 induit des carcinomes du foie et du rein et transforme les fibroblastes et les macrophages *in vitro*. Cependant, la présence de l'oncogène v-mil au sein de son génome lui confère des propriétés biologiques particulières par rapport à celles des trois autres virus. Les macrophages transformés par les trois virus contenant uniquement v-myc ont besoin pour survivre d'un facteur de croissance surajouté le cMGF, alors que ceux transformés par MH2 croissent sans adjonction de cMGF (Leutz et al., 1984 ; Graf et al., 1986) (Figure 7). L'oncogène v-mil qui ne peut à lui seul induire la transformation des macrophages permet aux macrophages transformés par l'oncogène v-myc de produire du cMGF d'une façon autocrine. La tumorigénicité du virus MH2 et celles de mutants de délétion dans v-mil et dans v-myc ont été comparées chez des poulets nouveaux nés. Les mutants v-myc<sup>-</sup> ne donnent ni tumeurs ni leucémies ; les mutants v-mil<sup>-</sup>, par rapport au MH2 sauvage, induisent beaucoup moins efficacement des tumeurs de foie ou des leucémies monocytaires (Graf et al., 1986).

\* Le virus AEV. Le virus AEV ES4 cause des leucémies érythroïdes chez le poulet. *In vitro*, il transforme les érythroblastes provenant de moelle osseuse ainsi que des fibroblastes (Graf et Beug, 1983). Son génome contient deux oncogènes v-erbA et v-erbB (Vennström et Bishop, 1982). v-erbB seul est nécessaire et suffisant pour transformer les érythroblastes et les fibroblastes. En effet, des mutants v-erbA<sup>+</sup>, v-erbB<sup>-</sup> perdent toute activité transformante sur les cellules hématopoïétiques; des mutants v-erbA<sup>-</sup>, v-erbB<sup>+</sup> maintiennent leur pouvoir transformant à la fois sur les fibroblastes et sur les érythroblastes qui sont dépendants d'érythropoïétine pour se différencier (Frykberg et al., 1983). Les cultures de cellules érythroïdes transformées par le virus AEV ES4 sont constituées exclusivement d'érythroblastes qui prolifèrent rapidement, indiquant que AEV ES4 induit les cellules à s'auto-renouveler, et bloque leur capacité de différenciation. De plus, AEV ES4 rend ces cellules indépendantes de l'érythropoïétine pour la prolifération (Graf et Beug, 1983 ; Beug et al., 1982a ; Samarut et Gazzolo, 1982).

Une étude réalisée par Kahn et al. (1986) et portant sur la coopération entre le produit v-erbA et les produits d'autres oncogènes dans la transformation des érythroblastes a permis de définir deux étapes dans cette transformation. Les produits des oncogènes v-src, v-erbB, v-ras et v-sea permettent la prolifération des érythroblastes en absence d'érythropoïétine (Figure 8) (il faut noter ici que ces cellules restent dépendantes de l'hormone pour se différencier). Toutefois, ces cellules exigent un milieu de culture complexe pour proliférer. La sur-infection de ces cellules par un virus portant l'oncogène v-erbA seul (Frykberg et al., 1983) permet leur prolifération en milieu standard et bloque leur maturation vers le stade érythrocyte même en présence d'hormone. De plus v-erbA est capable à lui seul de stimuler la prolifération des fibroblastes de poulet *in vitro* (Gandrillon et al., 1987).



**Figure 9: Isolement par le test "NIH3T3" de c-onc activés**

| Proto-onco gène | Produits                         | Cellules d'origine  | Références                                    |
|-----------------|----------------------------------|---|---|
| Ha-RAS*         | p21 (Fixe le GTP et GTPase)      | EJ: carcinome de la vessie  | Santos et al.,1982                            |
| Ki-RAS*         |                                  | Carcinome pulmonaire  | Der et al.,1982                               |
| N-RAS           |                                  | SK-N-SH: neuroblastome  | Taparowsky et al.,1983                        |
| B-lym           | p8 (Apparentée aux transfélines) | Gène de souris activé   | Goubin et al.,1983                            |
| T-lym-1         |                                  | S49T: lymphome murin de type T  | Lane et al.,1984                              |
| RAF*            | Ser/Thr Kinase                   | Carcinome pulmonaire  | Shimizu et al.,1985                           |
| neu             | p185 (Tyrosine kinase)           | Neuroblastome   | Bargmann et al.,1986                          |
| TRK             | p64 (Tyrosine kinase)            | Carcinome du colon ascendant  | Martin-Zanca et al.,1986                      |
| MET             | Tyrosine kinase?                 | MNNG-HOS: lignée cellulaire humaine transformée par un carcinogène chimique | Cooper et al.,1984                            |
| mel             |                                  | NK14: mélanome  | Padua et al.,1984                             |
| dbl             |                                  | Lymphome B diffus   | Eva et Aaronson,1985                          |
| ret             |                                  | Lymphome de type T  | Takahashi et al.,1985                         |
| mcf-2 ROS*      | Tyrosine kinase?                 | MCF-7: carcinome mammaire   | Fasano et al.,1984a<br>Birchmeier et al.,1986 |
| MAS             | p33 (Transmembrane?)             | Carcinome épidermoïde   | Young et al.,1986                             |
| hst             |                                  | Carcinome gastrique   | Sakamoto et al.,1986                          |

\* Proto-oncogène ayant été transduit dans un rétrovirus.

**Table 5: Proto-oncogènes isolés par le test de transfection sur cellule NIH3T3 d'ADN de cellules transformées**

### II-3. ACTIVATION DE PROTO-ONCOGENES DANS LE SYSTEME HEMATOPOIETIQUE ET TUMORIGENICITE

Depuis la caractérisation des oncogènes viraux et de leurs équivalents cellulaires c-onc, de nombreuses études ont été entreprises pour déterminer si les c-onc pouvaient être impliqués d'une façon quelconque dans l'apparition de tumeurs spontanées. Leur implication dans ce processus est maintenant certaine, bien que le rôle exact du produit de ces gènes dans la transformation ne soit pas clairement établi.

La démonstration de l'existence d'oncogènes cellulaires activés et de leur implication dans certaines tumeurs a été apportée par les expériences de transfection d'ADN sur les cellules NIH3T3 (Shih et al., 1979). La formation de foyers au lieu d'un tapis constitué d'une monocouche de cellules ou la prolifération de colonies en agar mou rendent compte de la présence ou non d'un gène transformant dans l'ADN transfecté dans les cellules NIH3T3 qui se prêtent remarquablement à ce genre d'études (Figure 9). Ces expériences ont révélé la présence de gènes transformants dans environ 15 % des cancers humains ainsi que dans des tumeurs animales induites chimiquement. Pour rechercher des oncogènes qui échappent à la détection par induction de foyers sur NIH3T3, une nouvelle formule de détection a été mise au point (Fasano et al., 1984a). Les cellules NIH3T3 sont cotransfectées avec de l'ADN tumoral et un gène marqueur de sélection tel que le gène de résistance à la néomycine. Après la sélection des cellules transfectées, les cellules sont injectées à des souris dépourvues de système immunitaire (souris "nude"). L'apparition de tumeurs permet de déceler un gène transformant dans les cellules injectées. Plusieurs cycles de cotransfection et d'essai de tumorigénicité conduisent à la purification du gène activé.

Ces méthodes ont permis d'identifier un certain nombre de nouveaux proto-oncogènes dépourvus d'équivalents viraux (Table 5). Ainsi ret et TLym-I ont été détectés par transfection de l'ADN de lymphome T humain sur les cellules NIH3T3 (Takahashi et al., 1985 ; Lane et al., 1984). Certaines tumeurs ont permis de découvrir à nouveau des oncogènes déjà connus de par leur transduction dans des rétrovirus et de préciser les mécanismes d'activation de telles séquences.

L'activation d'oncogènes cellulaires peut dériver de différents mécanismes moléculaires :

1) Des mutations ponctuelles ou des tronquations. L'activation d'oncogènes cellulaires par mutations ponctuelles a été beaucoup étudié sur oncogène ras, mais cela n'est pas dans le système hématopoïétique. c-fms, l'homologue du récepteur du CSF-1, est activé par mutation : quarante acides aminés à l'extrémité carboxyterminale du produit de c-fms sont remplacées par onze acides aminés différents du produit de v-fms ; ceci élimine le résidu tyrosine (Tyr

| Tumeurs ou lignées                                    | Oncogène amplifié | Produit             | Amplification | Références                |
|---|-------------------|---------------------|---------------|---------------------------|
| HL60 (Lignée promyélocytaire humaine)                 | MYC               | p64/67 Nucléaire    | 20            | Nowell et al., 1983       |
| COLO 320 (Carcinome colique humain)                   | MYC               |                     | 50            | Alitalo et al., 1983a     |
| Adénocarcinome gastrique humain                       | MYC               |                     | 15 à 30       | Shibuya et al., 1985      |
| SCLC (Carcinome pulmonaire humain à petites cellules) | MYC               |                     | 20 à 76       | Little et al., 1983       |
| SCLC  | L-MYC             |                     | 10 à 20       | Nau et al., 1985          |
| Neurolastomes (Lignées ou tumeurs humaines)           | N-MYC             | p62/64 Nucléaire    | 140           | Schwab et al., 1983a      |
| Y79 (Lignée de rétinoblastome humain)                 | N-MYC             |                     | 20            | Schwab et al., 1984       |
| MCF7 (Carcinome mammaire humain)                      | N-RAS             | p21 Fixe GTP GTPase | 10            | Fasano et al., 1984b      |
| Y1 (Tumeur adénocorticale de souris)                  | c-Ki- RAS         |                     | 50            | Schwab et al., 1983b      |
| K562 (Lignée de leucémie myéloïde chronique humaine)  | ABL               | p145                | 10            | Collins et Groudine, 1983 |
| COLO 201/205 (Carcinome colique humain)               | MYB               | p83 Nucléaire       | 10            | Alitalo et al., 1984      |
| A431 (Carcinome épidermoïde humain)                   | ERB B             | p70 Tyr. K.         | 10            | Linn et al., 1984         |
| Glioblastomes humains                                 | ERB B             |                     | 10 à 60       | Libermann et al., 1985    |
| MAC117 (Carcinome mammaire humain)                    | NEU               | p185 Tyr. K.        | 10            | King et al., 1985         |

**Table 6: Exemples d'amplification de proto-oncogènes dans des tumeurs humaines.**



| Translocation ou remaniements   | c-onc "implique" | Cancer associé                                      | Références              |
|---|------------------|---|-------------------------|
| 5 → 5q <sup>-</sup>   | FMS              | Leucémie myéloïde aigüe.<br>Anémies.                | Nienhuis et al.,1985    |
| t (9 ; 22) (q34 ; q11)<br>Chromosome Philadelphie                               | ABL<br>BCR       | Leucémie myéloïde chronique.                        | Shtivelman et al.,1985  |
| t (7 ; 9) (q36 ; q 34)  | ABL              | Lymphome T.   | Westbrook et al.,1987   |
| t (9 ; 11) (p22 ; q23)  | ETS1             | Leucémie monocytique aigüe.                         | Diaz et al.,1986        |
| t (4 ; 11) (q21 ; q23)<br>t (8 ; 21) (q22 ; q22)                                | ETS1<br>ETS2     | Leucémies aigües.                                   | Sacchi et al.,1986      |
| t (8 ; 14) (q24 ; q32)<br>t (8 ; 22) (q24 ; q11)<br>t (2 ; 8) (p11 à p13 ; q24) | MYC              | Lymphome de Burkitt.                                | Berger et Bernheim,1985 |
| t (3 ; 8) (p14 ; q24)   | MYC              | Carcinome rénal héréditaire.                        | Drabkin et al.,1985     |
| t (14 ; 18) (q32 ; q21)   | BCL2             | Lymphome folliculaire.                              | Tsujimoto et al.,1985   |
| t (11 ; 14) (q13 ; q32)   | BCL1             | Lymphome B diffus.<br>Leucémie lymphoïde chronique. | Tsujimoto et al.,1984   |
| t (15 ; 17) (q22 ; q21)   | P53              | Leucémie promyélocytique aigüe.                     | Le Beau et al.,1985     |

**Table7: Quelques exemples de translocations chromosomiques impliquant des oncogènes cellulaires**

969) dont la phosphorylation est probablement la régulation négative de l'activité du récepteur kinase. La cotransfection du gène CSF-1 soit avec le c-fms normal (Tyr<sup>969</sup>) soit avec le c-fms dont le Tyr<sup>969</sup> a été remplacé par Phe<sup>969</sup> montre que la transformation est plus importante avec c-fms (Phe<sup>969</sup>) qu'avec c-fms (Tyr<sup>969</sup>) (Roussel et al., 1987). Ce site de phosphorylation des tyrosines a son analogue également dans le récepteur de l'EGF ; il est également éliminé lors de la formation de l'oncogène v-erbB (Ullrich et al., 1984 ; Downward et al., 1984). Mais récemment, Roussel et al., (1988) ont montré qu'une seule mutation (serine en leucine 301) dans le domaine extracellulaire du c-fms peut induire la transformation des cellules NIH3T3 et que la mutation dans le domaine intracytoplasmique (Tyr en Phe 969) peut augmenter cette activation.

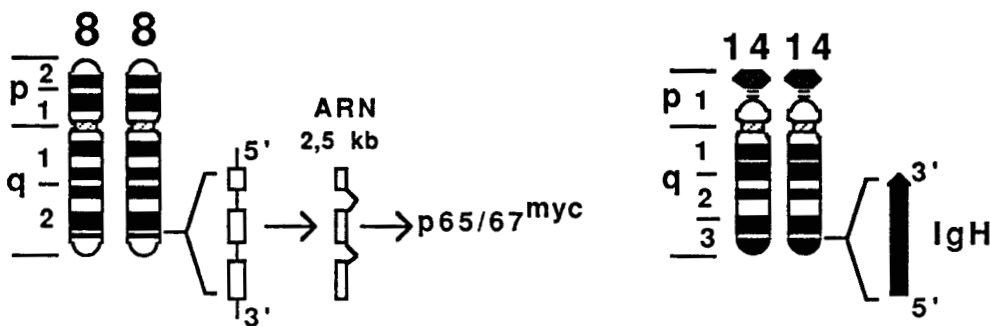
2) L'activation par des promoteurs viraux. L'intégration d'éléments promoteurs viraux à proximité ou dans des gènes cellulaires augmente l'expression de ces gènes. Gisselbrecht et al. (1987) ont prouvé que l'insertion provirale dans le site fim-2, qui est fréquemment le site d'intégration de F-MuLV (Friend murine Leukaemia virus) *in vitro* et *in vivo* dans des leucémies myéloblastiques (Sola et al., 1986), induit une sur-expression de c-fms normal dans des leucémies myélomonocytiques. Ce type d'activation a déjà été présenté dans la partie "Rétrovirus Leucémogènes peu transformants".

3) L'amplification d'oncogènes cellulaires. Des amplifications géniques ont été décrites chez certaines espèces en tant que processus normal intervenant dans les étapes du développement embryonnaire (Spradling et Mahowald, 1980) et aussi en tant que mutation accidentelle conférant un avantage sélectif (Mouches et al., 1986). Chez l'homme, l'amplification génétique de nombreux c-onc est associée avec des développements malins (Table 6). Cette amplification se manifeste généralement sous deux formes d'anomalies cytogénétiques: Les double minute chromosomes (DM) qui apparaissent comme de petites structures chromosomiques sans centromère et les régions HSR ("Homogeneously Staining chromosomal Region") qui présentent une intensité intermédiaire uniforme plutôt que l'alternance normale de bandes sombres et claires dans les préparations de chromosomes traités à la trypsine et colorés au Giemsa. L'amplification de proto-oncogènes observée dans certains tumeurs passe par l'existence de DM ou d' HSR. Ainsi dans une lignée de cellules provenant d'un carcinome du colon (Colo 320) (Alitalo et al., 1983a), environ 30 copies de c-myc sont cartographiées soit sur les régions HSR d'un marqueur chromosomique soit sur des DM isolés. Cependant l'amplification de proto-oncogène ne s'accompagne pas nécessairement de DM ou d' HSR .

4) La translocation chromosomique. Ce phénomène est trouvé dans des nombreuses pathologies (Table 7). Ces anomalies peuvent impliquer les loci de proto-oncogènes et par ce biais soit activer transcriptionnellement ces oncogènes (tel c-myc), soit les éliminer (tel c-fms), soit réaliser des fusions entre deux gènes (tel bcr-abl).

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

Cellule normale



Cellule de Lymphome de Burkitt

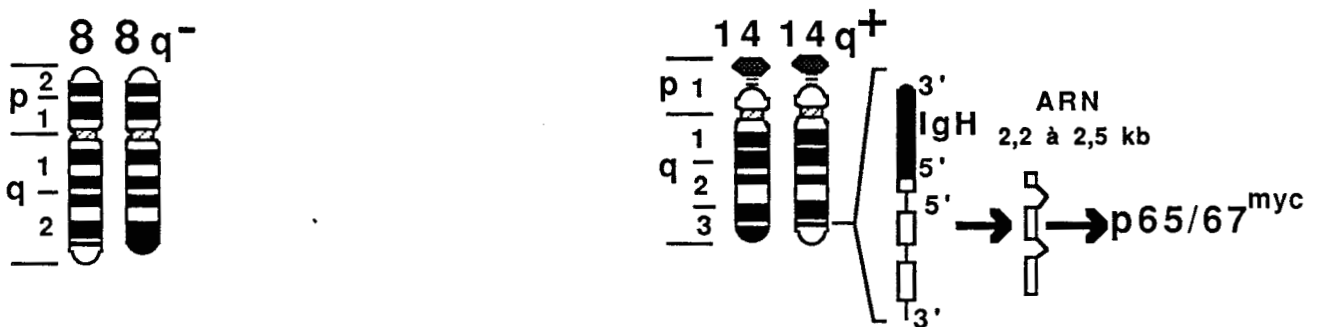


Figure 10: Exemple d'une translocation Chromosomique du gène c-myc dans un lymphome de Burkitt.

Dans 100 % des lymphomes de Burkitt décrits, la translocation se traduit par un échange de matériel génétique entre, d'une part, le chromosome 8q24 portant l'oncogène c-myc (Neel et al., 1982) et, d'autre part, les chromosomes 14q32, 2q13, ou 22q11 (Manolova et al., 1979 ; Bernheim et al., 1981) (Figure 10) portant respectivement les gènes codant pour la chaîne lourde ou pour les chaînes légères des immunoglobulines (Kirsch et al., 1982 ; Malcolm et al., 1982 ; Taub et al., 1982). Ceci permet l'augmentation de l'expression de c-myc. Ces échanges génétiques dans l'environnement de c-myc stimulent l'expression de c-myc de différentes manières : par une dérégulation transcriptionnelle (Leder et al., 1983 ; Croce et al., 1984 ; Rabbitts et al., 1983), ou une régulation post-transcriptionnelle (Dani et al., 1984) ou encore une régulation traductionnelle (Persson et al., 1986).

En ce qui concerne l'élimination d'oncogène, on peut donner l'exemple de c-fms dans le syndrome de 5q<sup>-</sup> (Nienhuis et al., 1985). Le syndrome de 5q<sup>-</sup> associé à une différenciation hématopoïétique anormale semble dériver de la perte de l'expression de c-fms dont la présence est très importante pour la différenciation des cellules hématopoïétiques puisque ce gène code pour le récepteur du M-CSF.

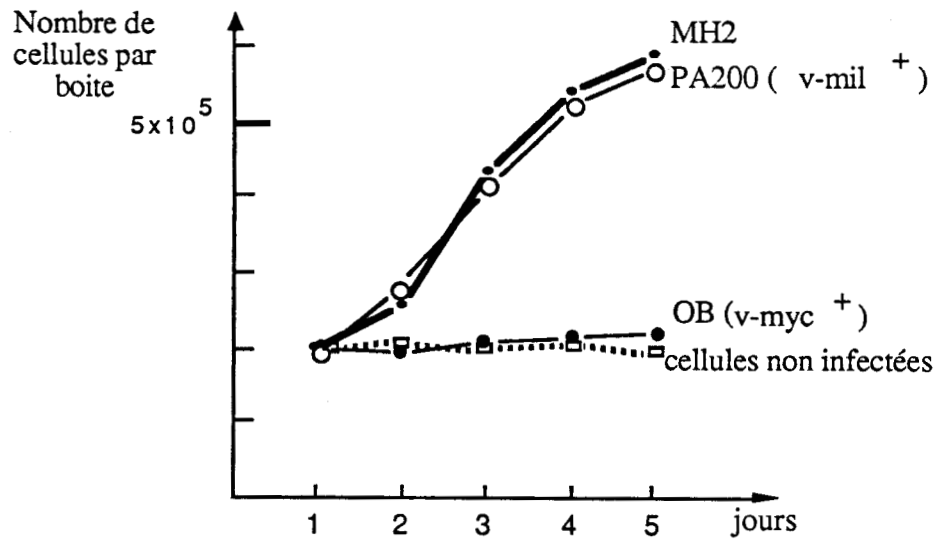
Dans le cas de fusion, la translocation la mieux documentée implique le proto-oncogène c-abl. Ce gène fait partie du segment chromosomique remanié dans la translocation Philadelphie(9, 22) (q 34 q 11) spécifique des leucémies myélocytiques chroniques (De Klein et al., 1982) et des leucémies lymphocytiques aiguës. Il est ainsi transféré du chromosome 9 vers le chromosome 22. Sur le chromosome 22, la translocation affecte toujours la même région BCR (pour "Break point Cluster Région") (Groffen et al., 1984). Dans les deux cas de translocation Philadelphie sont produits deux nouveaux ARN messagers (8.5 Kb et 7 Kb) ; ils codent respectivement pour deux protéines tyrosines kinases de fusion P210<sup>bcr-abl</sup> et P190<sup>bcr-abl</sup> (Ben-Neriah et al., 1986 ; Hermans et al., 1987 ; Konopka et al., 1984 ; 1985). Le remplacement de la partie 5' de c-abl normale par bcr rappelle le mécanisme de fusion de l'oncogène viral v-abl au gène gag dans le virus A-MuLV. De plus, contrairement au produit normal du gène c-abl, la protéine de fusion bcr-abl possède une activité tyrosine kinase tout comme l'oncogène v-abl (Reddy et al., 1983) .

#### II-4. ONCOGENES ET AUTRES SYSTEMES BIOLOGIQUES ( EX: Cellules de Neurorétine de Poulet)

Certains v-onc ne peuvent transformer ou faire proliférer qu'un seul type de cellules ; par contre, d'autres v-onc peuvent transformer ou faire proliférer des cellules de différentes lignées . L'utilisation de systèmes cellulaires différents pourra faciliter l'étude de certains v-onc. L'étude de l'oncogène v-mil est un bon exemple.

Nous avons déjà parlé de la transformation par le virus MH2, des fonctions différentes de v-myc et v-mil et de la coopération entre v-myc et v-mil dans le système hématopoïétique. Il faut

## courbes de croissance



## tableau récapitulatif

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

Figure 11: Coopération des oncogènes v-myc et v-mil dans le système de cellules de neurorétine de poulet.

noter toutefois que v-mil seul est incapable de faire proliférer les cellules hématopoïétiques et qu'il faut que ces cellules soient transformées par v-myc pour que v-mil puisse jouer son rôle et pour que l'on puisse observer son action. Par contre, dans le cas des cellules de neurorétine de poulet (CNR), il faut que les cellules soient induites à proliférer sous l'effet de v-mil pour qu'on puisse observer la transformation par v-myc. On peut ainsi observer l'action de v-mil sans l'effet de v-myc.

L'effet du virus MH2 sur les cellules de neurorétine de poulet a été décrit en 1985 (Bechade et al., 1985). Les cellules de neurorétine de poulet (CNR) infectées par MH2 sont capables de proliférer et sont transformées. Des virus mutants de délétion n'exprimant que l'un ou l'autre des oncogènes de MH2 montrent que l'expression de v-mil est nécessaire et suffisante pour faire proliférer les CNR sans toutefois les transformer, alors que v-myc seul n'est capable d'induire ni la transformation ni la prolifération dans des conditions de culture bien définies (Bechade et al., 1985) (Figure 11). Ainsi la prolifération et la transformation des CNR par le virus MH2 nécessite la coopération des deux oncogènes v-mil et v-myc. Ainsi donc ce système nous facilite l'étude de la fonction v-mil. Il faut noter ici que l'oncogène v-myc seul peut transformer des CNR dans un milieu plus riche et dans des boîtes de culture pré-traitées au collagène.

Est-ce que v-mil agit de la même façon sur la prolifération des CNR que sur des macrophages, c'est à dire que v-mil ferait produire un facteur de croissance particulier spécifique des CNR comme c' est le cas du cMGF pour les macrophages ? Cela n'est pas encore éclairci. Mais l'étude d'oncogènes dans des systèmes différents nous aide à mieux comprendre la fonction des oncogènes dans des mécanismes différents de prolifération et de différenciation.

### III. ONCOGENES A LOCALISATION NUCLEAIRE.

#### III-1. LES ONCOGENES DONT LES PRODUITS DE TRADUCTION SONT LOCALISES DANS LE NOYAU.

Comme nous l'avons déjà vu, les produits des oncogènes peuvent être regroupés en classes différentes selon leurs fonctions : protéines apparentées à des facteurs de croissance ou à des récepteurs de facteur de croissance, protéines kinases, protéines associées à la membrane et fixant le GTP, et enfin protéines localisées dans le noyau dont certaines fixent l'ADN.

Au sein du dernier groupe (Table 8), on trouve les produits des oncogènes v-myb (Klempnauer et al., 1984), v-fos (Curran et al., 1984), v-ski (Barkas et al., 1986), v-jun (Bos et al., 1988), v-myc (Donner et al., 1982 ; Alitalo et al., 1983b ; Hann et al., 1983), v-rel (dans le noyau et dans le cytoplasme (Gilmore et Temin, 1986), v-erbA (Sap et al., 1986), la protéine de

| ONC  | Virus   | Maladie              | Hôte   | Pro. v-onc          | Activité                    | Pro. c-onc | Activité                            | Référence              |
|------|---------|----------------------|--------|---------------------|-----------------------------|------------|-------------------------------------|------------------------|
| fos  | FBj-MSV | Ostéo-sarcome        | Souris | v-fos<br>p55        | Affinité pour l'ADN         | p55        | Affinité pour l'ADN                 | Curran et al.,1984     |
| myb  | AMV     | Myélobl.             | Poulet | v-myb<br>p45        | Affinité pour l'ADN         | p75        | Affinité pour l'ADN                 | Klempnauer et al.,1984 |
|      | E26     | Myélobl.Erythro.     | Poulet | gag-myb-est<br>P135 |                             |            |                                     |                        |
| myc  | MC29    | Myélocyto. Carcinome | Poulet | gag-myc<br>P110     | Affinité pour l'ADN         | p58        | Affinité pour l'ADN                 | Patshinsky et al.,1986 |
|      | CMII    | Myélocyto.           | Poulet |                     |                             |            |                                     |                        |
|      | OK10    | Endothé.             | Poulet |                     |                             |            |                                     |                        |
|      | MH2     | Endothé. Carcinome   | Poulet | v-myc<br>p61/63     |                             |            |                                     |                        |
| jun  | ASV17   | Sarcome              | Poulet | gag-jun<br>P65      | Activateur de Transcription | p39        | Activateur de Transcription         | Bohmann et al.,1987    |
| rel  | REV-T   | Réticulo-endothél.   | Dinde  | env-rel<br>P59      |                             | p68        |                                     | Gilmore et Temin,1986  |
| ski  | SKV-ASV | Carcinome            | Poulet | gag-ski-pol<br>P110 |                             |            |                                     | Barkas et al.,1986     |
| erbA | AEV-ES4 | Sarcome Erythro.     | Poulet | gag-erbA<br>P75     | Affinité pour l'ADN         | p40/46     | Récepteur de l'Hormone Thyroïdienne | Sap et al.,1986        |

**Table 8: Oncogènes à localisation nucléaire**

fusion myb-ets et les produits de leurs homologues cellulaires c-myb, c-fos, c-jun, c-myc, c-ets et erbA (seules les localisations des produits de c-rel et c-ski n'ont pas été déterminées), enfin, la protéine p53 qui est produit d'un oncogène cellulaire n'ayant pas d'équivalent viral connu (Weinberg, 1985). Les différents membres de ce groupe pourraient être localisés dans des compartiments différents du noyau : nucléoplasme, chromatine et matrice ; mais leur fonction au sein d'un compartiment n'est pas encore connue.

Généralement, les oncogènes nucléaires peuvent coopérer avec des oncogènes cytoplasmiques (Weinberg, 1985). Cependant, récemment, nous avons ont découvert une coopération entre deux oncogènes nucléaires (myb-ets et v-myc) dans le système de neurorétine de poulet (Amouyel et al., 1989).

La présence dans le noyau pour certains oncogènes n'est ni suffisante, ni nécessaire pour induire la transformation. Cela dépend du type de cellules que l'on considère. Le produit de v-rel p59<sup>v-rel</sup> se localise dans le noyau des fibroblastes non transformés et le fait de l'envoyer dans le cytoplasme n'induit pas la transformation des fibroblastes. De même v-rel est présent dans le cytoplasme des cellules de rate transformées, mais le fait de l'envoyer dans le noyau ne perturbe pas l'activité transformante de la p59<sup>v-rel</sup> sur ces cellules (Gilmore et Temin, 1988). Un autre exemple, pour le produit de v-myb, p45<sup>v-myb</sup> va être présenté plus en détail dans la partie IV.

### III-2. LES MECANISMES POSSIBLES DE LA TRANSFORMATION PAR CES ONCOGENES.

Les protéines localisées dans le noyau font partie des contrôles de la prolifération et la différenciation cellulaire. Bien évidemment, ces protéines sont induites par des événements en amont. La transcription de c-fos et c-myc est induite par le TPA (12-0-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate) qui stimule l'activité de la PKC au niveau membranaire (Greenberg et Ziff, 1984 ; Kruijer et al., 1984 ; Kelly et al., 1983).

De par leur localisation nucléaire et leur capacité à se lier à l'ADN, ces protéines oncogènes pourraient soit déréguler ou activer la transcription de certains gènes , y compris leurs propres ARN messagers, soit agir sur la synthèse d'ADN.

Des expériences d'expression *in vitro* ont montré que le produit du gène myc pouvait réguler le promoteur d'un gène codant pour une protéine de choc thermique de drosophile (hsp 70) (Kingston et al., 1984). L'oncogène v-fos est également capable d'agir en "trans" sur la transcription de certains gènes (Setoyama et al., 1986). On peut supposer que c'est par cette capacité à induire la transcription d'autres gènes que les produits d'oncogènes à localisation nucléaire peuvent induire la transformation cellulaire.



Le rôle du produit de certains oncogènes cellulaires sur la prolifération cellulaire est suggérée par l'augmentation transitoire des ARN messagers des oncogènes c-myc, c-fos et c-myb très rapidement après un signal mitogène faisant passer la cellule du stade G<sub>0</sub> à G<sub>1</sub> (Kelly et al., 1983 ; Greenberg et Ziff, 1984 ; Reed et al., 1985 ; Torelli et al., 1985).

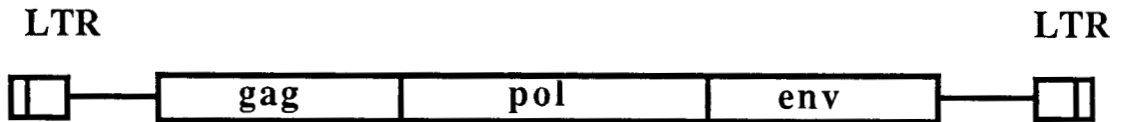
Des expériences de micro-injection de protéines dans le noyau ont permis de montrer que certaines protéines oncogènes à localisation nucléaire pourraient agir sur la synthèse d'ADN. La micro-injection d'anticorps spécifiques du produit de c-fos bloque la synthèse d'ADN dans les fibroblastes et inhibent la prolifération de ces cellules ; dans ce cas, il semble que l'expression de c-fos soit nécessaire à l'initiation de la synthèse d'ADN pour que les cellules puissent passer de la phase G<sub>0</sub> à la phase G<sub>1</sub> (Riabowol et al., 1988). La micro-injection de protéines c-myc dans le noyau de cellules 3T3 quiescentes a montré que cette protéine remplace l'action du PDGF dans l'établissement de la compétence pour ces cellules (Kaczmarek et al., 1985). Cela suggère que l'activation de c-myc après la fixation du PDGF par son récepteur (Kelly et al., 1983) est directement responsable de l'activation de gènes rendant ces cellules sensibles aux produits d'autres facteurs de croissance permettant la synthèse d'ADN.

Bohmann et al. (1987) ont pu montrer que le produit du proto-oncogène c-jun est homologue au facteur de transcription Ap1 d'un point de vue structural et fonctionnel. C'est la première fois qu'on a montré l'action directe d'un proto-oncogène sur la transcription. Avec la protéine c-fos immunoprécipite une protéine de 39Kd qui est le produit du proto-oncogène jun (Rauscher III et al., 1988). Les protéines fos et jun interagissent entre elles et cette interaction augmente l'efficacité de fixation sur l'ADN (Nakabeppu et al., 1988), sur la même séquence que le facteur de transcription AP1 (Franza et al., 1988). Les protéines de ces deux oncogènes ont une région homologue constitué d'un domaine d'acides aminés basiques et d'une série de leucine répétées ("Leucine Zipper") (Kouzarides et Ziff, 1988). Cette structure est nécessaire pour l'interaction entre ces protéines et aussi pour leur fixation à l'ADN.

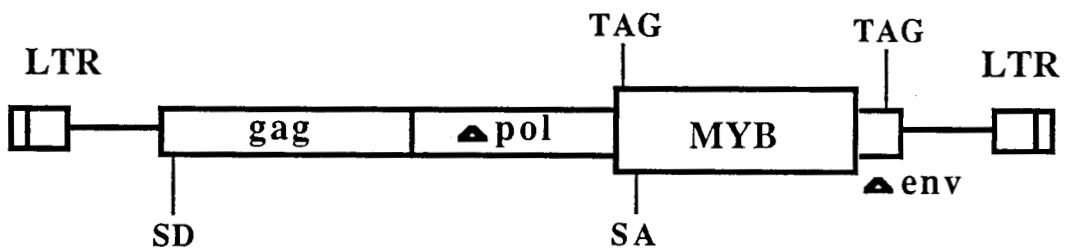
Dans la catégorie des protéines nucléaires, on peut également ranger l'oncogène v-erbA. Cet oncogène code pour le récepteur des hormones thyroïdiennes T3 et T4, bien qu'il ait perdu le site de fixation de l'hormone. La localisation de la P75<sup>gag-erbA</sup> est nucléaire (Sap et al., 1986). Les récepteurs d'hormones stéroïdes et apparentés agissent de façon intra-nucléaire en activant ou en réprimant l'expression de certains gènes (Yamamoto, 1985).

#### IV. RETROVIRUS AMV. ONCOGENE V-MYB ET PROTO-ONCOGENE C-MYB

### Provirus MAV-1



### Provirus AMV



SA - site accepteur d'épissure

SD - site donneur d'épissure

TAG - codon de fin de lecture

**Figure 12: Structure du provirus AMV**

## IV-1. LE RETROVIRUS DE LA MYELOBLASTOSE AVIAIRE : AMV

### A. Structure du génome du virus AMV

AMV est le fruit d'une recombinaison entre son virus "helper" naturel, le virus de l'ostéopétrose aviaire MAV-1 et une séquence d'origine cellulaire c-myb (Roussel et al., 1979). En 5', cette recombinaison s'est faite 111 bp en amont du codon de fin de lecture du gène pol de MAV (Klempnauer et al., 1982). La disparition de la région 3' du gène pol permet d'expliquer pourquoi la protéine P<sub>gag-pol</sub> n'est pas maturée et ne produit pas de rétrotranscriptase fonctionnelle (Duesberg et al., 1980). En 3', la recombinaison s'est effectuée 33 nt en amont du codon de terminaison du gène env. La majeure partie du gène env est donc absente dans le génome du virus AMV (Gonda et al., 1981) (Figure 12). Par conséquent, AMV est défectif pour la réplication et ne peut se propager qu'accompagné d'un virus "helper" (Beard, 1963 ; Moscovici, 1975).

### B. Biologie du virus AMV.

AMV appartient au groupe des DLV et plus précisément au sous-groupe des rétrovirus myéloblastosants. Il peut induire des leucémies myéloblastiques chez le poulet et chez la caille (Beard, 1963 ; Moscovici et al., 1981). *In vitro*, et en présence de facteurs de croissance, AMV peut transformer les cellules aux différents stades de la lignée myélomonocytaire, depuis les progéniteurs déjà engagés dans la voie de différenciation jusqu'au macrophage mature. Par contre, il ne peut pas transformer des fibroblastes (Graf et Beug, 1978). Les cellules monocytaires transformées par AMV peuvent être obtenues soit à partir de cellules de moelle osseuse de poulet ou de cellules de sac vitellin, soit à partir de macrophages normaux obtenus par culture de moelle osseuse (Gazzolo et al., 1979 ; Graf et al., 1979 ; Moscovici, 1967 ; Moscovici et al., 1975 ; Boettiger et Durban, 1984). Quelle que soit leur origine, les cellules transformées sont morphologiquement identiques et présentent les mêmes propriétés fonctionnelles ainsi que les mêmes antigènes de surface. Ces cellules sont généralement non adhérentes et rondes, avec un noyau large, excentré, entouré d'une couronne de cytoplasme contenant de petits granules. Bien que le terme puisse prêter à confusion, ces cellules sont connues sous le terme générique de "myéloblastes".

Les cellules transformées par le virus AMV sont des myéloblastes et sont moins matures que celles transformées par les virus MC29, CMII, OK10 et MH2 qui, elles, ressemblent à des macrophages. Certains marqueurs spécifiques de la lignée myélomonocytaire sont exprimés à la surface de ces cellules et ont été utilisés pour les identifier. Les cellules transformées par le virus AMV présentent à leur surface des antigènes spécifiques des myéloblastes. Mais elles expriment faiblement des récepteurs pour la partie Fc des Ig, des antigènes spécifiques des macrophages et ne sont pas capables de phagocyter des bactéries. En revanche, les cellules transformées par les virus

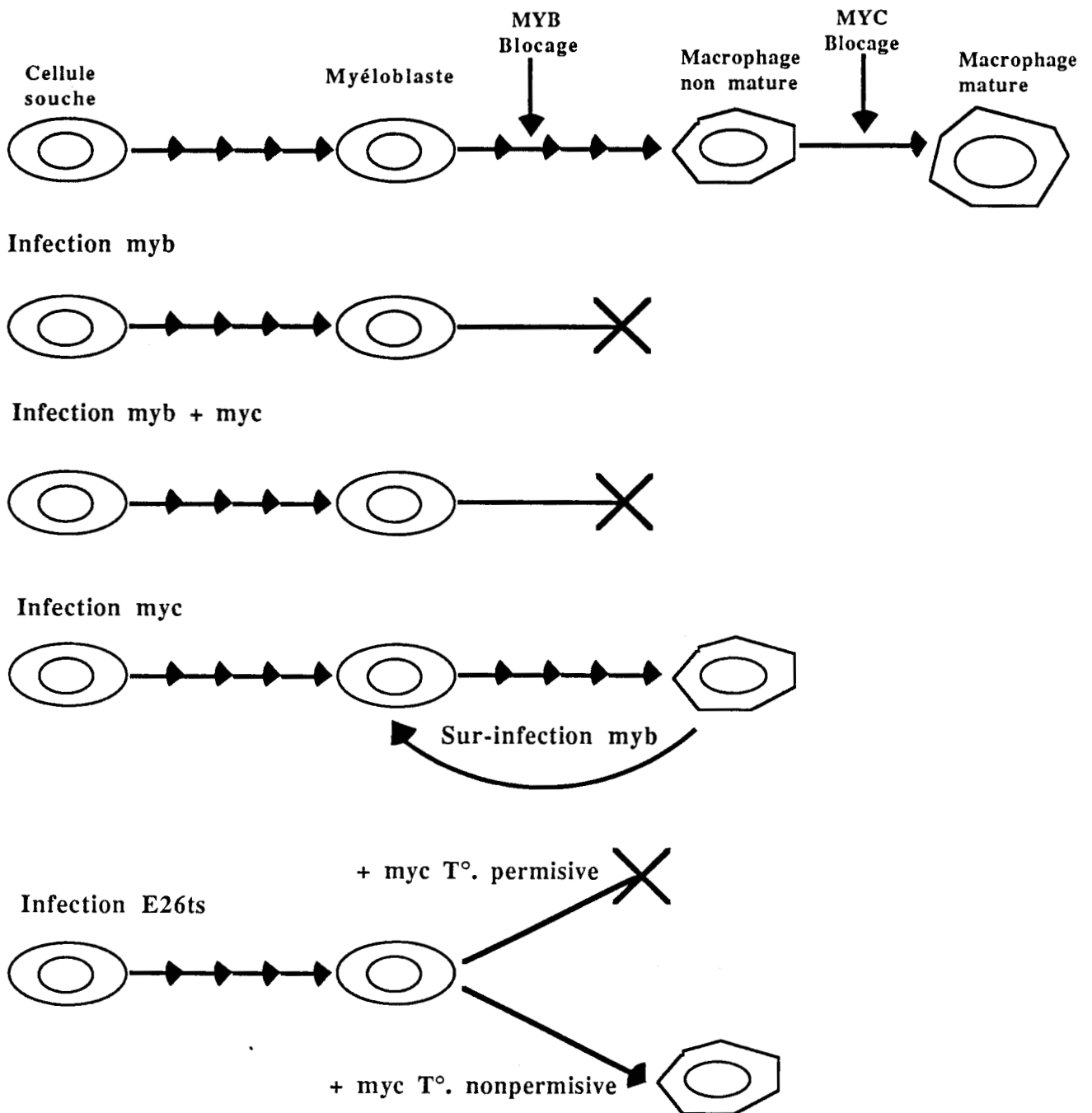


Figure 13: La transformation des cellules myéloïdes par v-myb domine celle par v-myc

MC29, CMII, OK10 et MH2 expriment ces paramètres de manière différente, puisque ce sont des cellules plus matures (Beug et al., 1979). Ness et al. (1987) ont pu montrer que v-myb provenant des virus AMV et E26 est dominant par rapport à v-myc provenant des virus MC29, OK10, CMII et MH2. v-myb bloque des cellules hématopoïétiques à un stade plus précoce que celui de cellules transformées par v-myc. Les cellules transformées à la fois par v-myb et v-myc sont indistinguables des cellules transformées par v-myb seul. Une fois les myéloblastes transformés par v-myb, la sur-infection de ces cellules par un virus portant v-myc ne change rien à la morphologie cellulaire. De plus, la sur-infection par v-myc ne change pas la morphologie des cellules transformées par des mutants de E26 thermosensibles pour la transformation myéloïde à la température permissive, mais change la morphologie de ces cellules à la température non permissive où leur gène myb n'est plus actif. Par contre, une fois les macrophages transformés par v-myc, la sur-infection par v-myb entraîne l'apparition de cellules présentant une morphologie myéloblastique (Figure 13). v-myc induit la prolifération des cellules sans affecter la différenciation, alors que v-myb induit la prolifération des cellules, bloque leur différenciation et peut également induire une "dédifférenciation".

### C. Mutants thermosensibles du virus AMV.

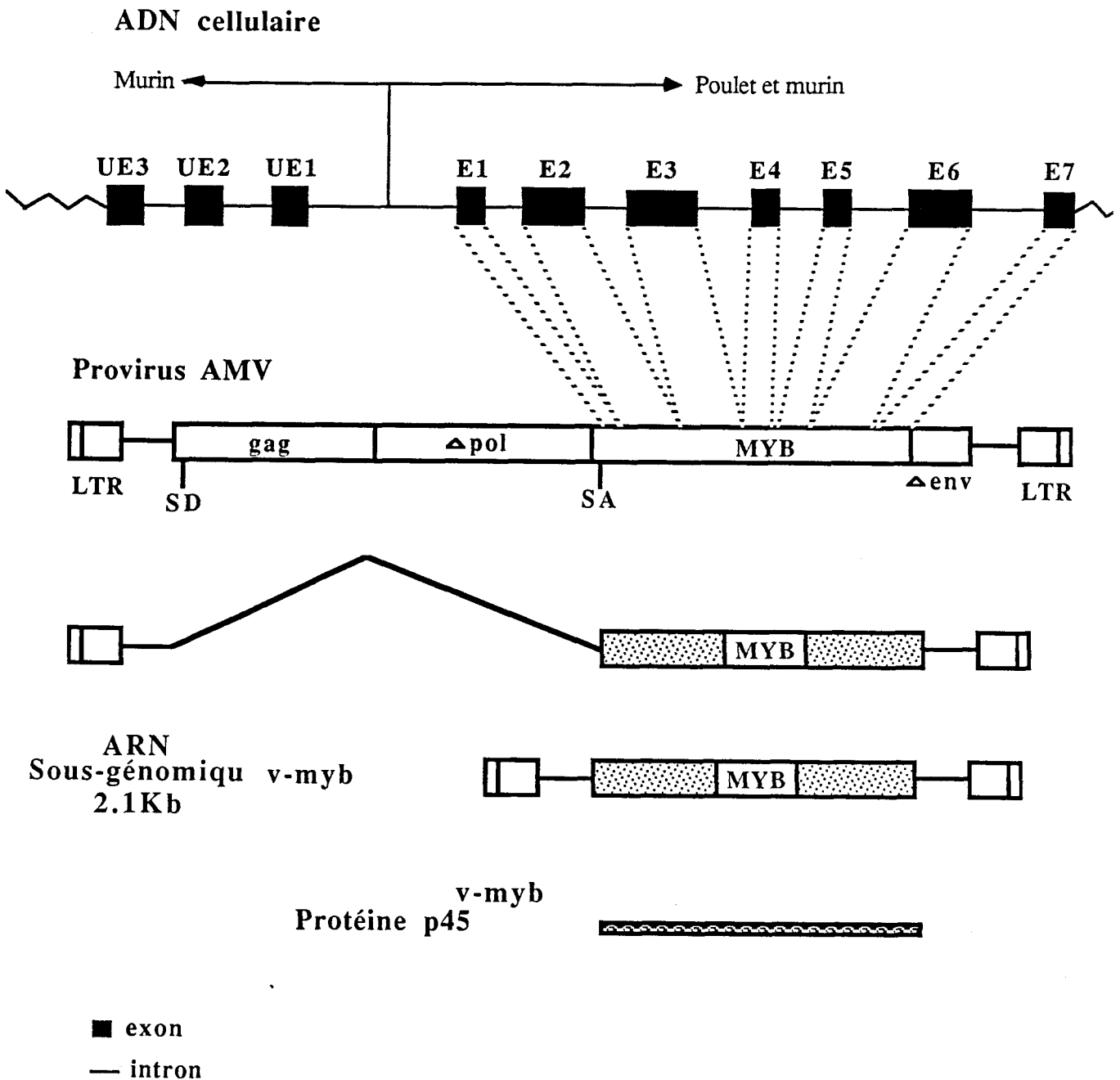
Un mutant thermosensible du virus AMV, GA907/7, a été obtenu à partir de cellules transformées par AMV après un traitement mutagène. Ce virus n'est plus capable de transformer les cellules myéloïdes à 41°C (température non permissive). Quand les cellules myéloïdes, transformées par GA907/7 à la température permissive (35.5°C), sont mises à 41°C, elles se différencient en des cellules plus matures et adhérentes, qui n'atteignent cependant pas le stade de macrophage mature. De plus, à la surface des cellules, on retrouve un plus grand nombre de marqueurs macrophagiques (Moscovici, 1983). Cet effet biologique est dû à la diminution de la transcription ou la déstabilisation de l'ARN messager v-myb à température non permissive, suivi d'une diminution de la production de la protéine v-myb (Moscovici et al., 1985). Ce mutant serait donc plus un mutant d'épissage qu'un mutant fonctionnel de la protéine v-myb.

## IV-2. MODE D'EXPRESSION ET PRODUITS PROTEIQUES DES GENES V-MYB ET C-MYB

### A. Structure de v-myb et des gènes cellulaires c-myb.

#### a. Formation de v-myb

L'ARN génomique d'AMV (7.2 Kb) possède le gène gag complet et fonctionnel, la plupart du gène pol et le gène v-myb à la place du gène env (Gonda et al., 1981). v-myb est exprimé à



**Figure 14: L'oncogène v-myb du virus AMV:  
Formation et Mode d'expression**

partir d'un ARN sous-génomique de 2.1 Kb (Gonda et al., 1981), sous forme d'une protéine p45<sup>v-myb</sup> observée dans les cellules infectées par AMV (Klempnauer et al., 1983). La traduction de la p45<sup>v-myb</sup> s'effectue à partir de l'ARN sous-génomique, débute sur le codon d'initiation du gène gag et s'achève sur le codon de terminaison du gène env. Ainsi, la protéine p45<sup>v-myb</sup> contient à son extrémité aminotermine six acides aminés du gène gag, à son extrémité carboxyterminale, onze acides aminés du gène env.

v-myb peut être divisé en sept régions, notées de E1 à E7 de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3', homologues à sept exons du gène cellulaire c-myb (Figure 14). Le cadre de lecture utilisé dans le virus AMV pour l'expression de v-myb est le même que celui utilisé pour l'expression du gène c-myb. Les régions E2, E3, E4, E5, E6 représentent cinq vrais exons c-myb raboutés par épissure correcte des séquences introniques cellulaires (Klempnauer et al., 1982). La région E1 correspond à un exon cellulaire complet, flanqué en 5' d'une région intronique. Elle fournit d'une part le site accepteur d'épissure celui de l'exon cellulaire correspondant qui, avec le site donneur situé dix-huit nucléotides en aval du début du gène gag permet la formation de l'ARN sous génomique v-myb de 2.1 Kb. Ainsi le codon d'initiation, les six premiers acides aminés de gag et les séquences v-myb sont joints en phase et permettent l'expression de la protéine p45<sup>v-myb</sup>. Elle fournit d'autre part le codon de fin de lecture de la protéine virale P180<sup>gag-pol</sup>. En effet, v-myb présente un cadre de lecture continu avec les gènes gag et pol et interrompu par un site terminateur situé 84 nt en aval du point de recombinaison. Ainsi, l'oncogène v-myb fournit les 27 derniers acides aminés de la protéine P180<sup>gag-pol</sup>. La région E7 correspond à un exon cellulaire tronqué dans sa partie 3'. En effet, le cadre de lecture ouvert du gène c-myb se prolonge au delà de l'extrémité 3' de la région virale E7. Dans le virus, E7 est lu en phase avec les onze derniers codons du gène env qui apporte le codon de fin de traduction (UAG) de la protéine p45<sup>v-myb</sup>.

#### **b. c-myb chez le poulet, la souris, l'homme et la drosophile**

L'expression de c-myb fut d'abord étudiée chez le poulet. Un ARN messager de 4.0 Kb majeur (Gonda et Bishop, 1983) et un ARN messager de 5.2 Kb mineur sont détectés. Une protéine p75<sup>c-myb</sup> a également été décrite. Chez la souris, un ARN messager compris entre 3.8 Kb et 4.0 Kb a été montré (Gonda et Metcalf, 1984 ; Sheiness et Gardinier, 1984 ; Bender et Kuehl, 1986). Cet ARN est codé par au moins dix exons couvrant 50 Kb du génome de la souris. Les exons (E1-E7) sont homologues à v-myb ; trois exons (UE1-UE3) en amont d'E1 et des exons en aval d'E7 ne sont pas encore identifiés. Dans certains types de cellules, tels les thymocytes qui ont été très étudiés, l'utilisation de différents sites d'initiation donne des espèces d'ARN messagers de taille hétérogène comprise entre 4.3 Kb et 5.6 Kb (Watson et al., 1987). Chez l'homme, Leprince et al. (1983a) ont décrit un ARN messager de 3.8 Kb. Dans le cas de leucémie humaine ou de cellules promyélocytaires HL60 non différenciées, un transcrit de 3.4 Kb est retrouvé, ainsi qu'une protéine p85<sup>c-myb</sup> (Slamon et al., 1986). Des transcrits de c-myb (3.0 Kb et 3.8 Kb), qui

|     |       |            |               |                      |                     |                     |            |
|-----|-------|------------|---------------|----------------------|---------------------|---------------------|------------|
| Ck  | C-myb |            | PKSGKRHLGK    | TRW <u>T</u> TREEDEK | LKKLVEQNGT          | DDW <u>K</u> VIANYL |            |
| Hu  | C-myb |            | -----         | -----                | -----               | -----               |            |
| Dr  | C-myb |            | -----         | -----                | -----               | -----               |            |
| E26 | V-myb |            |               | RWQKVLNPEL           | IKGPW <u>T</u> KEED | QRVIELVQKY          | GPKRWS*VIK |
| AMV | V-myb | PNRTDVQCQH | -----         | N-----               | -----H-----         | -----*D-----        |            |
| Ck  | C-myb | -----      | -----         | -----                | -----               | -----*              |            |
| Hu  | C-myb | -----      | -----         | -----                | -----               | -----*              |            |
| Dr  | C-myb | -D-L---V-Q | --A-----      | -----RD--            | DM--K--RNF          | ---K-T*L--R         |            |
| Zm  | C1    |            | MG -R-CCAKEGV | KR-A--SK--           | -ALAA-Y-KAH         | -EG--REVPQK         |            |
| E26 | V-myb |            | HLKGRIGKQC    | RERW <u>H</u> NHLNP  | EVKKT <u>S</u> WTEE | EDRIIYQAHK          | RLGNRWAEIA |
| AMV | V-myb | -----      | -----         | -----                | -----               | -----               |            |
| Ck  | C-myb | -----      | -----         | -----                | -----               | -----               |            |
| Hu  | C-myb | -----      | -----         | -----                | -----               | -----               |            |
| Dr  | C-myb | Y-N-----   | -----         | NL---A---K           | --E-----L           | EL--Q--K--          |            |
| Zm  | C1    | AGLR-C--S- | -L--L-Y-R-    | -IRRGNISYD           | -EDL-IRL-R          | L---R-SL--          |            |
| E26 | V-myb |            | KLLPGRTDNA    | IKNH <u>W</u> NSTMR  | RKVEQEGYPQ          | ESSKAGPPSA          | TTGFQKSSHI |
| AMV | V-myb | -----      | -----         | -----                | -----               | -----               |            |
| Ck  | C-myb | -----      | -----         | -----                | -----               | -----               |            |
| Hu  | C-myb | -----      | -----         | -----                | -----               | -----               |            |
| Dr  | C-myb | -R-----    | -----         | --YDV-RRSV           | NA-SSDLK-S          | R-HLITLIKS          |            |
| Zm  | C1    | G-----E    | ---Y---LG     | -RAGAGAGAG           | GSWVVVAPDT          | GS-ATPAATS          |            |
| E26 | V-myb |            | AFAHNPPAGP    | LPGAGQAPLG           | SDYPYHIAE           | PQNVPGQIPY          | PVALHINIIN |
| AMV | V-myb | -----      | -----         | -----                | -----               | -----               |            |
| Ck  | C-myb | -----      | -----         | -----                | -----               | -----               |            |
| Hu  | C-myb | -----      | -----         | -----                | -----               | -----               |            |

W : Localisation des résidus Tryptophane répétés

**Figure 15: La région aminotermine conservée des protéines myb virales et cellulaires.**



codent pour une protéine d'au moins 55 Kd, ont également été identifiés chez la drosophile (Katzen et al., 1985).

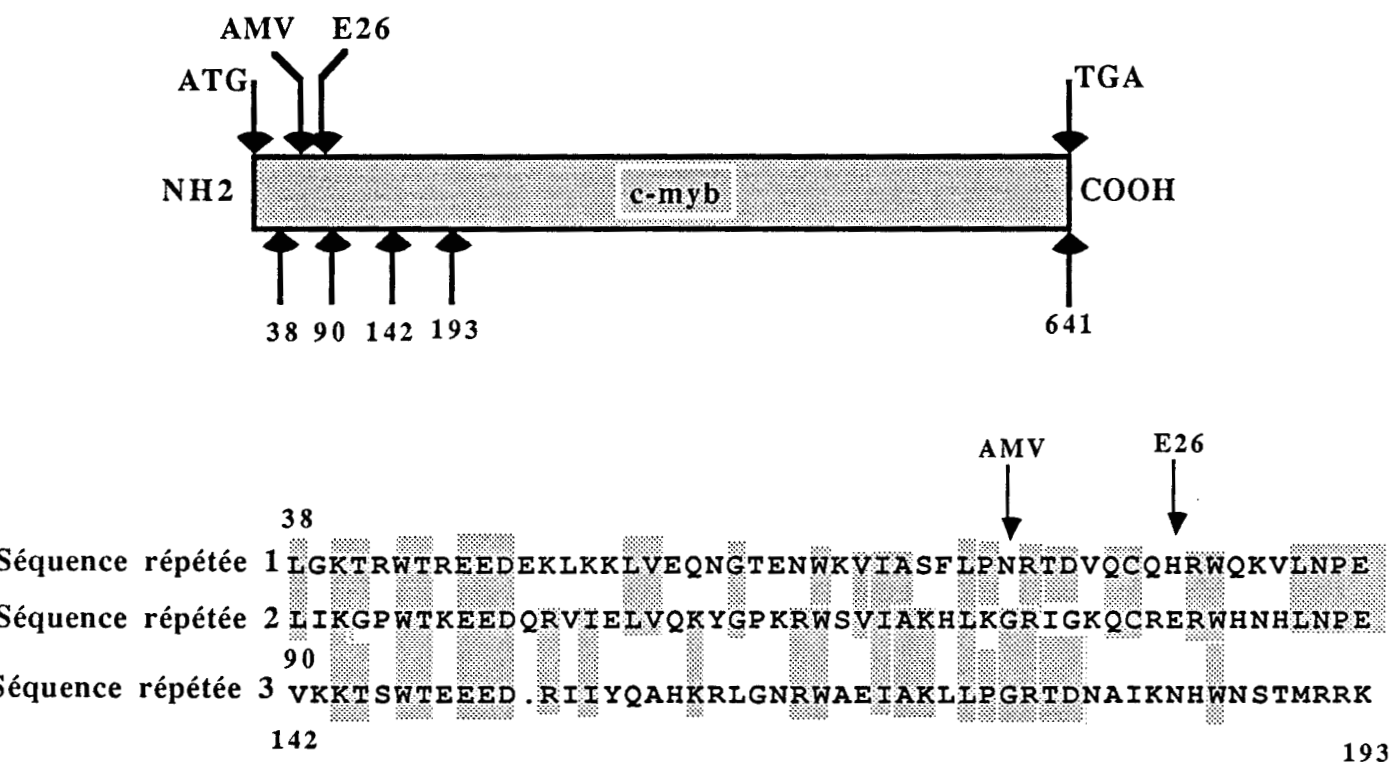
### c. Homologie entre v-myb et c-myb et conservation de c-myb dans des espèces différentes

Les fragments d'ADN complémentaires ou ADNc des ARN myb de poulet, de souris, de drosophile ainsi qu'une portion de l'ADNc humain ont été isolés et séquencés. L'ADNc myb chez le poulet possède un cadre de lecture ouvert qui s'étend sur 699 acides aminés et qui peut coder pour un polypeptide de poids moléculaire 77 Kd, ceci est en accord avec la taille présumée de la protéine p75<sup>c-myb</sup> (Rosson et Reddy, 1986). L'ADNc myb de souris contient un cadre de lecture ouvert de 648 acides aminés et pourrait coder pour une protéine de 71 Kd (Gonda et al., 1985). L'ADNc myb chez la drosophile possède un cadre de lecture ouvert de 482 acides aminés. Enfin, la portion du ADNc myb humain séquencée ne recouvre pas toute la séquence codante du gène c-myb humain, mais laisse présumer l'existence d'un cadre de lecture codant pour une protéine de plus de 65 Kd (Slamon et al., 1986).

Les protéines codées par ces types de ADNc sont très homologues les unes aux autres : 85 % des résidus sont conservés du poulet à l'homme, 73 % du poulet à la drosophile et 90 % de la souris à l'homme. Les régions d'homologie importante se situent d'une part au niveau d'une région correspondant aux exons E1 et E2 du génome c-myb de poulet (il y a 100 % d'homologie entre les ADNc humain et aviaire, et un seul acide aminé différent dans l'ADNc murin) (Figure 15), d'autre part au niveau de l'exon E5 on trouve une séquence présentant 97 % d'homologie entre les ADNc humain et aviaire.

L'analyse de la séquence peptidique obtenue à partir de ces types d'ADNc révèle aussi la présence dans le domaine aminoterminal des protéines cellulaires aviaire, murine et humaine, de trois séquences de 52 résidus chacune relativement répétées qui ne sont plus que deux dans le cas des deux protéines myb virales et de la protéine c-myb de drosophile (Figure 16). La première de ces séquences est présente en amont de E1 et a donc été tronquée lors de la transduction de c-myb dans les virus AMV et E26; les deux suivantes sont présentes dans les régions E1 et E2. L'importance de cette région va être approfondie dans la partie suivante.

En plus des six acides aminés de gag et onze acides aminés d'env à l'extrémité amino et carboxy terminal de v-myb d'AMV, il existe onze différences en acides aminés entre v-myb d'AMV et la partie équivalente du gène c-myb du poulet (Klempnauer et al., 1982). Par mutation, il a été montré que les 6 résidus gag, les 11 résidus env et les 11 acides aminés substitués ne sont pas nécessaires pour maintenir le pouvoir transformant de p45<sup>v-myb</sup> (Lipsick et Ibanez, 1987; Stober-Grässer et Lipsick, 1988).



↓ Les flèches indiquent le début des protéines v-myb<sup>AMV</sup> et v-myb<sup>E26</sup>

**Figure 16: Les séquences répétées dans la partie 5' des protéines myb cellulaires.**

## B. Expression de c-myb

L'expression de c-myb, comme celle de c-myc et c-fos, intervient probablement dans le processus de différenciation et de prolifération de cellules. La fonction de v-myb dans la transformation de cellules appartenant à la lignée monocyttaire a été démontrée ; il permet la prolifération des myéloblastes et bloque leur différenciation. Bien qu'aucune preuve directe n'ait montré que l'expression de c-myb contrôle directement la différenciation et la prolifération de ces cellules, différentes expériences suggèrent que la fonction principale de c-myb serait d'intervenir dans la prolifération cellulaire et que l'expression de c-myb serait reliée à certaines étapes du cycle cellulaire.

L'expression de c-myb a été détectée spécifiquement dans les tissus hématopoïétiques tel le sac vitellin, le moelle osseuse et le thymus et tout particulièrement dans les cellules immatures (Chen, 1980 ; Gonda et al., 1982 ; Coll et al., 1983b ; Sheiness et Gardinier, 1984 ; Gonda et Metcalf, 1984). Dans le sac vitellin de l'embryon de onze jours, seules 5% des cellules expriment c-myb mais elles l'expriment à des taux très élevés (100-400 copies/cellules) similaires à ceux observés dans des myéloblastes transformés par v-myb. Ce chiffre de 5 % est en étroite corrélation avec le pourcentage de cellules du sac vitellin sensibles à la transformation par le virus AMV (Duprey et Boettiger, 1985).

Thompson et al., (1986) ont montré que différents types cellulaires (fibroblastes embryonnaires normaux de poulet, cellules lymphoïdes B normales provenant de la bourse de Fabricius, ou cellules lymphoïdes T transformées par le virus de Mareck) préalablement synchronisés par culture pendant 48 heures dans un milieu appauvri en sérum de veau foetal, expriment le gène c-myb lorsqu'ils sont induits à proliférer par adjonction de sérum. Ainsi, le fait que c-myb ait été jusqu'ici décrit comme étant exprimé spécifiquement dans les cellules hématopoïétiques immatures et pas dans les cellules matures pourrait être dû au fait que les cellules qui se différencient ne prolifèrent pas. La baisse de l'expression de c-myb dans les cellules se différenciant reflèterait donc une diminution de la prolifération de ces cellules. L'expression de c-myb est importante dans les thymocytes immatures et diminue lorsque les cellules T se différencient *in vivo* (Sheiness et Gardinier, 1984). De la même façon l'expression de c-myb disparaît lorsque les cellules myéloïdes immatures sont induites à se différencier (Craig et Bloch, 1984 ; Gonda et Metcalf, 1984). Cette diminution de l'expression de c-myb est toujours à corréler avec le fait que les cellules qui se différencient ne prolifèrent pas.

Par contre, une expérience *in vitro* a démontré que l'expression constitutive de c-myb bloque la différenciation des cellules de la lignée érythroïde (Clarke et al., 1988). Un ADNc de 3.4 Kb de c-myb humain correspondant à un ARN messager présentant dans les cellules hématopoïétiques humaines et codant pour une protéine myb normale a été placé sous contrôle du promoteur de SV40 (Simian virus 40) et transfecté dans les cellules F-MEL (Friend Murine Erythro-Leukemia). L'expression élevée et constitutive de c-myb inhibe la différenciation de ces cellules ; même

l'addition d'un agent chimique (DMSO) ne peut pas induire leur différenciation.

Le mécanisme moléculaire de prolifération cellulaire semble dépendre de la fixation de facteurs de croissance aux cellules (Heldin et Westermark, 1984). L'effet de ces ligands conduit à l'expression de certains gènes (Greenberg et Ziff, 1984 ; Kelly et al., 1983). Les cellules T stimulées par traitement à l'interleukine 2 (IL-2) expriment c-myb durant la phase de progression de G1 à S (Stern et Smith, 1986 ; Pauza, 1987). Les cellules MSB1 en phase exponentielle de croissance expriment un taux maximum de c-myb lorsqu'elles sont en phase S ; par contre, les fibroblastes embryonnaires de poulet quiescents, cultivés en présence de sérum commencent à exprimer c-myb en fin de phase G1. Au vu de ces données, il semble que la relation précise entre les étapes du cycle cellulaire et les variations de l'expression de c-myb soit difficile à déterminer et semble dépendre du type de cellules que l'on considère et du traitement que l'on leur fait subir. Le taux de transcription du gène c-myb, mesuré au niveau du noyau, ne varie pas ou très peu entre les fibroblastes et les cellules MSB1 quiescentes ou en phase exponentielle de croissance. En revanche, l'augmentation du taux d'ARN myb peut être induite par traitement de ces cellules à la cycloheximide (inhibiteur de la synthèse protéique). Il se pourrait donc que dans les cellules quiescentes stimulées par la présence de sérum, la stabilité des ARN myb augmente (Thompson et al., 1986). Donc les variations des taux d'ARN c-myb durant ce type de prolifération cellulaire semblent être principalement le résultat d'un contrôle post-transcriptionnel.

Enfin, il n'est pas étonnant que certains facteurs puissent exister dans certains tissus spécifiques pour contrôler l'expression de c-myb. Dans les myéloblastes transformés par AMV, l'expression de c-myb est inhibée par v-myb *in vitro* et *in vivo*. Par contre, dans les érythroblastes, c-myb peut être exprimé en même temps que v-myb (Lipsick, 1987). Il est possible qu'un facteur, existant dans les myéloblastes mais pas dans les érythroblastes transformés par v-myb, inhibe l'expression de c-myb.

### C. Produits de traduction de v-myb et c-myb.

L'oncogène v-myb code pour une protéine de 45 Kd, p45<sup>v-myb</sup> (Souza et al., 1980 ; Gonda et al., 1981 ; Klempnauer et al., 1982, 1983 ; Rushlow et al., 1982 ; Boyle et al., 1983). Cette protéine est une version tronquée de la protéine p75<sup>c-myb</sup> trouvée dans les cellules aviaires exprimant le gène c-myb (Klempnauer et al., 1983). Les produits des gènes c-myb humain et drosophile ont été identifiés respectivement comme une protéine de 80 Kd, p80<sup>c-myb</sup> et une protéine de 74 Kd, p74<sup>c-myb</sup> (Katzen et al., 1985 ; Peters et al., 1987).

#### a. Localisation des protéines

Ces protéines (p45<sup>v</sup>-myb, p75<sup>c</sup>-myb<sub>poulet</sub>, p80<sup>c</sup>-myb<sub>humaine</sub> et p74<sup>c</sup>-myb<sub>drosophile</sub>) sont toutes localisées dans le noyau. 80 à 90 % des protéines myb présentés dans le noyau sont relarguées en faible concentration saline ou après une digestion du noyau par une DNase ; par contre, 10 à 20 % des protéines myb restent associées au noyau même en présence de haute concentration saline (2M NaCl) et cette association est résistante à la digestion par une DNase (Klempnauer et Sippel, 1986). Ceci suggère que la plupart des protéines myb sont associées à la chromatine mais qu'une petite portion reste associée à la matrice nucléaire. De plus, la quantité de protéines myb associées à la matrice nucléaire augmente de façon importante quand les noyaux sont digérés de 0°C à 37°C par une DNase (Klempnauer et al., 1986). Cette association à la matrice nucléaire inductible par la température semble être une propriété des protéines nucléaires myb et myc (Evan et Hancock, 1985).

Les protéines myb ont une durée de demie vie brève d'environ une heure en accord avec leur rôle putatif de régulation dans le noyau. Cela semble être encore une caractéristique des produits d'oncogènes localisés dans le noyau tels les produits de c-myc, la protéine E1A d'adénovirus et la p53 (Hann et Eisenman, 1984 ; Spindler et Berk, 1984 ; Reich et al., 1983).

#### b. Structure et fixation des protéines à l'ADN

L'examen de la séquence en acides aminés des protéines c-myb permet de prédire différentes propriétés à partir de caractéristiques structurales. Deux domaines , l'un situé dans la partie aminoterminal et l' autre dans la partie carboxyterminale sont très conservés entre les protéines myb virales et cellulaires. La conservation phylogénétique de domaines de protéines pouvait refléter une fonction biologique importante. Ceci a été clairement démontré pour le domaine aminoterminal .

Ce domaine aminoterminal est riche en acides aminés basiques. Par exemple, l'analyse de la protéine c-myb murine nous précise qu'une région basique d'environ 200 résidus est située dans la partie aminoterminal (Gonda et al., 1985). Le reste de la molécule montre une distribution équilibrée entre résidus acides et basiques. La méthode de Garnier et al. (1978) qui prédit la structure secondaire des protéines suggère que 46 % de la protéine peuvent être constituées d'hélice  $\alpha$ , que la protéine présenterait peu de feuillet  $\beta$  et qu'elle pourrait donc être globulaire. Ces propriétés, vue la forte homologie de séquence observée entre les différents produits myb, peuvent être extrapolées aux autres protéines de la famille.

De plus, chacune des séquences répétées (3 dans le cas de protéines cellulaires, 2 dans le cas des protéines virales) contient trois résidus Tryptophane, conservés dans toutes les protéines et séparés respectivement par 18, 19 et 18 acides aminés (Anton et Frampton 1988). Ces auteurs proposent que cette répétition de résidus tryptophane joue un rôle important à la fois dans la structure et dans la fonction des protéines myb. Cette répétition périodique de Tryptophane pourrait être caractéristique d'une nouvelle classe de protéines se liant à l'ADN et ne possédant ni résidus

cystéine organisés en doigts ("Zinc-Finger") ni répétition de leucine ("Leucine-Zipper").

D'autre part, la partie aminotermine conservée est impliquée dans le mécanisme de fixation des protéines myb à l'ADN comme l'ont montré des expériences réalisées avec p45<sup>v</sup>-myb et la protéine myb humaine. D'abord, des anticorps monoclonaux dirigés contre différentes parties de p45<sup>v</sup>-myb montrent que, i) un anticorps monoclonal dirigé contre la partie médiane de la protéine ne change pas la fixation de p45<sup>v</sup>-myb à l'ADN, ii) un anticorps monoclonal dirigé contre la partie aminotermine inhibe la fixation de p45<sup>v</sup>-myb à l'ADN. Ensuite, la protéine v-myb exprimée dans un système bactérien est capable de fixer l'ADN. Par contre, des protéines v-myb amputées dans leur domaine aminotermine ne fixent plus l'ADN (Klempnauer et Sippel, 1987). Bading et al. (1987) ont purifié la protéine myb humaine en utilisant un anticorps monoclonal. Ils ont montré que la protéine se fixe sur l'un des fragments de l'ADN du bactériophage lambda, mais qu'elle n'interagit pas avec la région du promoteur ou de l'"enhancer" de SV40. Récemment, Biedenkapp et al. (1988) ont pu montrer que v-myb reconnaît spécifiquement la séquence pyAACG/TG.

Néanmoins, l'activité de liaison à l'ADN n'est pas requise pour la localisation nucléaire de la protéine p45<sup>v</sup>-myb. De plus, l'activité "DNA-binding" et la localisation nucléaire de p45<sup>v</sup>-myb ne sont pas suffisantes pour induire une transformation de cellules myéloïdes (Ibanez et al., 1988).

Le rôle et la fonction biochimique du domaine conservé dans la partie carboxyterminale sont moins bien connus. Ce domaine peut être délété sans que la transformation morphologique des "myéloblastes" soit affectée ; par contre ce domaine est absolument requis pour la croissance de ces "myéloblastes" en agar mou (Ibanez et Lipsick, 1988). Dans E26 ce domaine carboxyterminal est absent; il serait donc tentant de spéculer que les séquences ets puissent remédier à cette absence.

### c. Fonction biologique des protéines myb

Les protéines myb font partie de la famille des protéines nucléaires tels les produits de myc, fos, ski, jun et rel. Elles interviennent dans le processus de différenciation et de prolifération des cellules hématopoïétiques. Leur présence dans le noyau semble être nécessaire mais pas suffisante.

Les myéloblastes transformés par AMV sont induits à se différencier en cellules myélomonocytaires en présence de lipopolysaccharides. Ces cellules devenues non adhérentes peuvent être maintenues en lignée plus de six mois (Symonds et al., 1984). Cette lignée de cellules peut être encore induite à se différencier en cellules proches des macrophages en additionnant du TPA. Cette différenciation s'accompagne d'une redistribution de la protéine v-myb ; la majeure partie de la protéine se retrouve dans la région périnucléaire. Cette relocalisation de v-myb du noyau vers le cytoplasme suggère que la présence des protéines myb dans le noyau est très importante pour le contrôle de la prolifération et de la différenciation des cellules. Mais la présence de la protéine v-myb dans le noyau des fibroblastes n'est pas suffisante pour induire la

transformation des fibroblastes.

#### IV-3. IMPLICATIONS DE C-MYB DANS LA TUMORIGENESE

Les mécanismes d'activation des proto oncogènes ont été décrits plus haut. Dans certaines leucémies, on a pu mettre en évidence des activations de c-myb.

##### A. Activation de c-myb par insertion virale.

Le gène c-myb pourrait être activé par insertion virale dans toute une série de tumeurs induites par le virus Abelson et identifiées comme des lymphosarcomes plasmacytoïdes (ABPL) (Shen-Ong et al., 1984). Cette activation par insertion virale pourrait impliquer deux types de stratégie: impliquant un LTR et / ou une troncature de la protéine.

Dans six cas de tumeurs, le virus leucémogène murin Moloney (Mo-MuLV) s'est inséré, dans la même orientation transcriptionnelle, en amont de l'exon c-myb E1 (premier exon homologue à v-myb). Cette insertion dans le locus c-myb s'accompagne d'une expression de formes altérées des ARN myb. Les ARN de cinq des six tumeurs contiennent un (ou des) transcrit(s) épissés grâce à un site donneur d'épissure contenu dans la région gag de Mo-MuLV et un site accepteur dans l'exon vE1. Ainsi, l'insertion du provirus dans ces tumeurs de souris résulte dans la synthèse d'une protéine myb qui est amputée de la même région aminoterminal que la protéine v-myb d'AMV (Shen-Ong et al., 1986).

Rosson et al., (1987) ont étudié la séquence nucléotidique d'un ADNc myb dans un autre cas d'ABPL. Ces résultats ont montré que l'intégration du virus induisait des erreurs d'épissage à la fois dans la partie 5' et 3' du locus myb. En 5', la transcription était initiée par le promoteur viral (LTR) et donnait naissance à un transcript chimère (LTR-myb) d'où sont absents les trois premiers exons codant de la protéine myb normale. En 3' un mécanisme d'épissage aberrant utilisant des sites donneur et accepteur d'épissage localisé dans l'intron séparant les exons 6 et 7 aboutit à l'insertion de 121 acides aminés en 3' de la protéine myb. En fait, le virus semble dans ce cas avoir favorisé un mécanisme d'épissage alternatif utilisé de façon mineure dans les cellules normales (Sheng Ong, 1987).

Dans un autre cas, l'amputation du gène c-myb par insertion virale se fait seulement en 3'. Dans des cellules NFS60 dépendantes de l'interleukine 3 (lignée établie à partir de tumeurs induites par le virus leucémogène murin Cas Br Moloney), l'insertion virale s'est faite, suivant l'orientation transcriptionnelle 5' 3', au niveau de l'exon E6, exactement 103 nucléotides en aval de la fin des séquences c-myb homologues au v-myb de E26 (voir "Rétrovirus E26"). Le LTR 5' du provirus

intégré fournit un codon de terminaison pour la synthèse de la protéine ; les 240 derniers acides aminés de c-myb ne sont donc pas présents dans la portion carboxyterminale des protéines myb tumorales (Shen-Ong et al., 1986 ; Weinstein et al., 1986).

L'activation de c-myb n'a pas été détectée uniquement dans des tumeurs ABPL. Une activation de c-myb par l'insertion de Mo-MuLV a été détectée dans les deux lignées cellulaires obtenues à partir de leucémies monocytaires (Gonda et al., 1987) où deux nouveaux ARN messagers sont produits. Cette activation est similaire à celle observée dans les ABPL et conduit à la synthèse de protéines myb tronquées. Récemment, une activation de c-myb a été également mise en évidence chez le poulet par insertion d'un virus ALV. Cette activation peut induire des lymphomes de type B. Dans des tumeurs examinées, le provirus est intégré dans la partie 5' du locus c-myb, et conduit à la synthèse d'une protéine légèrement différente de p75<sup>c-myb</sup> mais en tout cas beaucoup moins tronquée que dans les tumeurs murines (ABPL et Cas Br) (Pizer et Humphries, 1989). Le clonage et le séquençage des cADNs permettrons de confirmer ce point.

#### B. Activation de c-myb par amplification

L'expression de c-myb est plus importante dans des cellules non matures ou dans des cellules en cours de la prolifération. Donc, un excès de production de c-myb peut probablement conduire ces cellules vers la voie de la prolifération. L'ADN de c-myb a été trouvé amplifié environ 10 fois dans des cellules de deux lignées (Colo 201 et Colo 205) provenant d'un adénocarcinome de colon humain (Alitalo et al., 1984). Cette amplification au niveau de l'ADN s'accompagne d'une production abondante d'ARN myb. L'ADN amplifié ne semble pas révéler d'anomalies quand on compare les sites de coupures de différents enzymes de restriction à celle du gène myb normal, et n'est pas porté par des HSR (Homogeneously Staining Regions).

#### C. Activation de c-myb par remaniement chromosomique

On retrouve souvent dans des leucémies lymphoblastiques et dans certaines leucémies myéloïdes humaines une délétion du bras long du chromosome 6 (6q<sup>-</sup>) sur lequel le proto-oncogène c-myb se localise en position q21-24 (Barletta et al., 1987). Cette délétion ne touche pas le locus c-myb et ne donne pas un réarrangement du locus c-myb. Par contre, une amplification (au niveau de l'ADN) du locus c-myb et une expression abondante des ARNs c-myb sont détectées. Il semble que la délétion du chromosome 6 s'accompagne d'une altération structurale et fonctionnelle du locus c-myb.

L'analyse de 176 types d'ADN provenant de tumeurs et tissus normaux a révélé, par digestion de l'ADN par l'endonucléase EcoRI, qu'il existe un polymorphisme du gène c-myb (Yokota et al., 1986, Dozier et al., 1987). Dans 36 paires d'ADN (ADN normal/ADN tumoral), il y a hétérozygotie au niveau du c-myb ; dans 37 paires, il y a homozygotie au niveau du c-myb.



### Provirus E26



ARN  
Génomique  
5.7Kb



gag-myb-ets  
Protéine P135



**Figure 17: Structure génomique et mode d'expression du virus E26.**

Dans quatre paires d'hétérozygotes, les intensités de bandes relatives au polymorphisme sont plus faibles dans l'ADN tumoral que dans l'ADN normal, suggérant la perte d'un allèle dans ces tumeurs. Cette perte pourrait conduire à l'expression d'une mutation sur l'autre allèle ou pourrait s'accompagner de la perte de gènes de régulation proches du gène v-myb. Cette délétion semble plus fréquente dans les sarcomes et carcinomes que dans les autres tumeurs.

## V. RETROVIRUS E26. ONCOGENE V-ETS ET GENES CELLULAIRES C-ETS-1 ET C-ETS-2

### V-1. RETROVIRUS E26

#### A. Structure et Mode d'expression du virus E26

##### a. Structure génomique de E26

Le virus E26 est le fruit d'une recombinaison entre un virus "helper" et deux séquences d'origine cellulaire c-myb, ce que justifie son classement dans le sous-groupe des virus myeloblastosants, et c-ets (Leprince et al., 1983b; Nunn et al., 1983). L'ADN proviral de E26 contient une partie du gène gag ( $\Delta$  gag), les deux oncogènes (v-myb et v-ets), une partie du gène env ( $\Delta$  env) et deux LTR. La protéine transformante du virus E26 est une protéine de fusion de 135 kd, P135gag-myb-ets (Figure 17).

En 5', la jonction du gène myb au gène gag se fait au niveau des nucléotides 1195 et 1196 du gène gag (Schwartz et al., 1983). A la jonction, deux résidus sont identiques entre le gène gag et le gène v-myb. En 3', la séquence v-ets est jointe à des séquences env qui sont légèrement différentes de celles du virus RSV (Schwartz et al., 1983). La comparaison des séquences du gène gag du virus RSV, du proto-oncogène c-myb (Klempnauer et al., 1982) et de la jonction gag-myb dans le génome du virus E26 montre que la recombinaison qui lie le gène gag au gène myb E26 n'implique pas des homologies de séquence entre les deux gènes. Il y a probablement eu recombinaison illégitime entre l'exon E1 de c-myb et le gène gag d'un rétrovirus. Il semble également qu'il y ait eu recombinaison illégitime entre l'exon F du gène c-ets et le gène env d'un même rétrovirus. La recombinaison entre v-myb et v-ets s'est faite par une épissure dont le site donneur est dans l'exon E6 de c-myb et le site accepteur est dans l'exon  $\alpha$  de c-ets-1 (Leprince et al., 1988). Ceci sera détaillé dans le paragraphe "Structure de v-ets et de son homologue cellulaire ets-1".

##### b. Protéine transformante de E26 : P135gag-myb-ets.

Les cellules transformées ou simplement infectées par le virus E26 synthétisent une protéine virale d'un poids moléculaire apparent de 135 Kd : la séquence nucléotidique du provirus E26 a été décrite (Nunn et al., 1983 ; 1984). Elle montre que le cadre de lecture ouvert codant pour la protéine tripartite P135 est continu sur 1046 codons incluant 272 codons gag, 283 codons myb et 481 codons ets. Le codon d'initiation est dans la portion gag et le codon de terminaison à proximité de la fin de l'oncogène ets. Néanmoins ce codon de terminaison n'est pas celui du gène c-ets-1; il a été généré lors du mécanisme de transduction, et il est d'origine inconnue (Gégonne et al., 1987; Leprince et al., 1988).

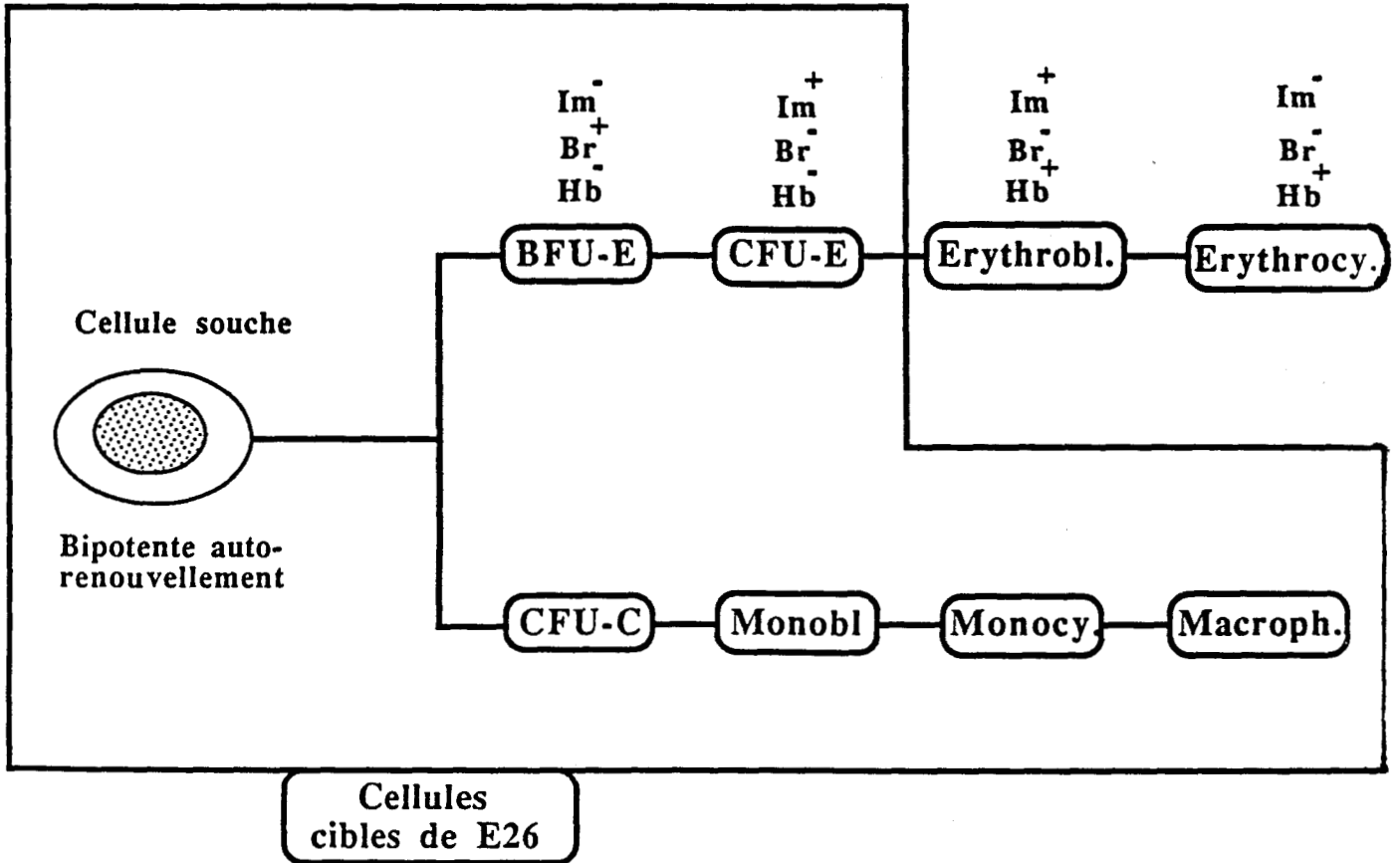
La comparaison des séquences myb E26 et myb AMV confirme que E26 contient une portion interne du v-myb AMV (Klempnauer et al., 1982). Le domaine v-myb de P135gag-myb-ets a une taille d'environ 30 Kd alors que le virus AMV code pour une protéine v-myb de 45 Kd (Boyle et al., 1983).

## B. Biologie du virus E26

### a. Leucémies induites par le virus E26

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

Les cellules sanguines des animaux leucémiques infectés par E26 ou les cellules de moelle en culture infectées par E26 peuvent être cultivées *in vitro* soit en milieu CFU-M (Myeloid Colony Forming Unit) soit en milieu CFU-E (Erythroid Colony Forming Unit). Le milieu CFU-M est un milieu de croissance complété avec le surnageant de cellules de rate de poulet stimulées à la concanavaleine A. Ce milieu permet la formation de colonies de cellules normales de type macrophage mais ne permet pas la croissance de précurseurs érythroïdes. Les cellules de rate traitées à la concanavaleine A produisent un facteur (cMGF) qui stimule la croissance des cellules myéloïdes normales ou transformées (Beug et al., 1982b) (Leutz et al. 1984 ; 1988). Le milieu CFU-E est un milieu de croissance complété avec du sérum de poulet anémique comme source d'érythropoïétine. Ce milieu permet la survie et la différenciation des cellules progénitrices de type



**Figure 18: Interférence du virus E26 dans deux voies de différenciation hématopoïétiques**

érythroïde (Samarut et Bouabdelli, 1980). Ainsi des cellules érythroïdes ou myéloïdes peuvent être propagées sélectivement à partir des cellules leucémiques mises en culture en présence respectivement de milieu CFU-E ou CFU-M (Radke et al. 1982 ; Moscovici et al., 1983). Ces expériences ont réconcilié les données obtenues lors des premières mises en culture de cellules transformées *in vivo* par E26 avec la leucémie induite *in vivo*.

**b. Transformation des cellules hématopoïétiques par le virus E26 *in vitro*.**

Les cellules hématopoïétiques transformées par E26 *in vitro* proviennent de l'infection de suspensions cellulaires obtenues à partir soit de la moelle osseuse de poussin soit de l'embryon de poulet de 1 à 3 jours (Blastoderme).

D'une part, des cultures de cellules de moelle osseuse infectées par E26 et ensemencées dans un milieu de type CFU-M semi-solide (ce milieu de culture est additionné de Méthocel) donnent des colonies de cellules myéloïdes transformées, alors qu'en milieu CFU-E semi-solide, elles donnent des colonies érythroïdes (Radke et al., 1982).

D'autre part, les cellules de blastoderme aux stades de développement "ligne primitive" ou "12 somites" ont été infectées par E26. Les cellules infectées au stade "ligne primitive" développent quelque soit le milieu (CFU-E ou CFU-M) des colonies hétérogènes, différentes des colonies érythroïdes ou myéloïdes obtenues à partir de cellules de moelle osseuse infectées. La morphologie de la colonie diffère d'une colonie à l'autre. Certaines des colonies obtenues sur milieu CFU-E contiennent de l'hémoglobine. Les colonies hétérogènes réensemencées en milieu CFU-E ou CFU-M donnent 60 % de colonies érythroïdes ou myéloïdes et 40 % de colonies mixtes constituées d'un mélange de cellules immatures myéloïdes et érythroïdes. Ces colonies mixtes peuvent être maintenues en culture plusieurs semaines en utilisant différents régimes de culture. Ces résultats suggèrent que E26 peut infecter et transformer une cellule souche bipotente et que donc des cellules du blastoderme (au stade "12 somites") infectées par E26, cultivées en milieu sélectif CFU-E ou CFU-M développent des colonies érythroïdes ou myéloïdes et un petit nombre de colonies mixtes (Moscovici et al. 1983).

L'identification des cellules cibles érythroïdes de E26 a été rendue possible grâce à l'obtention de deux antisera, l'un dirigé contre des antigènes de cerveau (anti Br) et l'autre dirigé contre des antigènes de maturation (Im) (Gazzolo et al., 1980) caractérisant respectivement les cellules progénitrices érythroïdes BFU-E et CFU-E. Ainsi les colonies érythroïdes, obtenues à partir des cellules infectées au stade "12 somites" expriment un taux d'antigène Br plus faible que celui des BFU-E et un taux d'antigènes Im identique à celui des CFU-E suggérant que les cellules cibles de E26 sont des cellules à un stade de développement intermédiaire entre les cellules BFU-E et CFU-E. En revanche, les colonies hétérogènes obtenues à partir des mêmes cellules infectées aux

stades "12 somites" sont constituées de cellules ne possédant ni les antigènes Br ni les antigènes Im et d'un mélange de cellules érythroïdes et myéloïdes. Ceci suggère que ces colonies hétérogènes sont le résultat de la transformation d'une cellule souche bipotente (Figure 18).

Les myéloblastes transformés par E26 comme ceux transformés par AMV ont besoin de facteur de croissance le cMGF ou "chicken myelomonocytic growth factor" pour proliférer *in vitro*. Les cellules infectées par E26, incubées en présence de la fraction IgG de l'antisérum anti cMGF ne prolifèrent plus, suggérant que les cellules sont dépendantes de la sécrétion de cMGF. Adkins et al. (1984) ont montré que des virus contenant un oncogène de la famille *src* peuvent induire la production de façon autocrine d'un facteur de croissance de type cMGF. Des myéloblastes transformés par E26 puis surinfectés par des rétrovirus ayant transduit des oncogènes présentant des homologies avec la famille *src*, poussent indépendamment de la présence de cMGF. Le milieu conditionné par ces myéloblastes contient une activité de stimulation de croissance similaire au cMGF. Cette activité est réduite de plus de 80 % quand le milieu conditionné est absorbé contre un antisérum anti cMGF.

### c. Effets du virus E26 sur les fibroblastes de caille et de poulet.

E26 et AMV sont les seuls virus défectifs des leucémies aviaires incapables de provoquer des tumeurs solides chez l'animal et de transformer des fibroblastes embryonnaires de poulet. Par contre E26 peut transformer des fibroblastes embryonnaires de caille (Graf et al., 1979). Cependant, les foyers que forment les fibroblastes "transformés" par E26 en milieu semi-solide sont très diffus, et sans commune mesure avec ceux formés par des fibroblastes transformés par des virus tels MC29 ou MH2 (Palmieri et al., 1983).

Récemment, Jurdic et al. (1988) ont montré que E26 ne transformait pas les fibroblastes de poulet mais avait un effet mitogène sur ces cellules. En effet, les fibroblastes infectés par E26 ne présentent aucun des paramètres classiquement associés à la transformation (morphologie, croissance en milieu semi-solide, incorporation d'hexose, et désorganisation des câbles d'actin). Par contre la croissance de ces cellules était activée puisqu'elles pouvaient être maintenues à long terme dans du milieu contenant une faible concentration de sérum. De plus ces cellules poussaient même si on les ensemait à faible densité cellulaire dans le milieu à faible concentration de sérum.

L'intégration et le nombre de copie de l'ADN proviral de E26 dans les fibroblastes infectés et dans les cellules hématopoïétiques transformées étaient similaires. Par contre, l'expression de l'ARN génomique de E26 dans les cellules hématopoïétiques était beaucoup plus importante que celle observée dans les fibroblastes. De plus au niveau de la traduction de E26, la protéine P135 n'était pas détectable dans des fibroblastes. Ceci suggère que le niveau d'expression du provirus E26 est beaucoup plus faible dans les fibroblastes que dans les cellules hématopoïétiques, que

l'efficacité de transformation par E26 dépend de son niveau d'expression dans les cellules.

### C. Mutants thermosensibles du virus E26.

Quatre mutants thermosensibles pour la transformation des myéloblastes (tsE26 : ts21, ts137, ts138 et ts 143) ont été isolés (Beug et al., 1984). A la température permissive (37°C), les cellules myéloïdes transformées par les ts E26 ressemblent aux cellules myéloïdes transformées par le virus E26 de type sauvage et prolifèrent rapidement en présence de cMGF. Cultivées à la température non permissive (42°C), elles arrêtent de proliférer, acquièrent plusieurs caractères de macrophages (adhérence, taille plus importante, large vacuole et inclusion cytoplasmique, petit noyau excentré) et également la capacité de phagocyter des bactéries. Cependant, certains antigènes spécifiques des macrophages ne sont pas exprimés suggérant que ces cellules ne sont pas terminalement différenciées. Après quatre jours de culture à 42°C et trois jours de traitement au TPA, elles prennent une morphologie de macrophage et expriment tous les marqueurs antigéniques macrophagiques. Les myéloblastes transformés par les ts E26 se différencient et arrêtent leur prolifération même en présence de cMGF. Cependant, ils produisent un facteur de croissance de type cMGF. Enfin les mutants thermosensibles de E26 restent leucémogènes et maintiennent leur capacité à transformer les érythroblastes à température non permissive. Ainsi les érythroblastes transformés par les ts E26, isolés à 37°C et cultivés ensuite à 42°C, présentent les mêmes caractéristiques que les érythroblastes transformés par le virus E26 sauvage à 42°C. Au vu de ces résultats et des données littéraires avec AMV, il semblait que la transformation des myéloblastes soit due à v-myb alors que la transformation des érythroblastes est due à v-ets. Il était de plus probable, que les lésions dans les ts E26 se trouvent dans leur gène v-myb. Ceci est argumenté par les propriétés de fixation d'ADN de la p135gag-myb-ets des virus thermosensibles (Moelling et al., 1985). Les P135gag-myb-ets purifiés à partir des ts E26 ont soit perdu leur habilité à fixer l'ADN, ou cette interaction entre les protéines et l'ADN est devenue thermosensible.

Récemment, un nouveau mutant de E26 thermosensible pour la transformation érythroïde mais non pour la transformation myéloïde a été caractérisé (Golay et al., 1988). Ce virus E26 ts1.1 possède une seule mutation dans la partie 3' de v-ets. Les érythroblastes transformés à la température permissive (37°C) par ce virus se différencient en érythrocytes normaux quand ils sont cultivés à la température non permissive (42°C). Les cellules myéloïdes transformées par ce virus sont des promyélocytes - les précurseurs des granulocytes neutrophiles - plutôt que des myéloblastes immatures. Une infection de macrophages par ce virus induit une conversion des macrophages en promyélocytes. Ceci suppose que la partie v-ets de E26 joue un rôle non seulement sur la différenciation des cellules érythroïdes mais aussi sur la différenciation des cellules myéloïdes.

### D. Virus E26 et virus AMV

### a. Différences structurales entre E26 et AMV

Le génome de E26 est différent de celui d'AMV au niveau de son contenu génétique et au niveau de son mode d'expression.

L'oncogène v-myb de E26 est une version tronquée de l'oncogène v-myb d'AMV. v-myb AMV est constitué de sept régions cellulaires notées de E1 à E7. Par contre, v-myb E26 contient les régions E2, E3, E4, E5 mais est amputé de la majeure partie de E1, d'une partie de E6 et de tout E7 (Klempnauper et al., 1982 ; Nunn et al., 1983, 1984). Donc par rapport à v-myb d'AMV, il est réduit respectivement de 27 nucléotides en 5' et 237 nucléotides en 3'. Au niveau de la protéine, la portion v-myb de P135 est tronquée respectivement de 9 acides aminés dans sa région aminoterminal et 79 acides aminés dans sa région carboxyterminale. Il existe 11 acides aminés différents entre v-myb AMV et c-myb de poulet, mais uniquement un seul acide aminé différent entre v-myb E26 et c-myb de poulet (Nunn et al., 1984).

La séquence des LTR de E26 a été comparée avec celle de différents LTR connus. Les régions U5 des LTR des virus E26 et AMV sont colinéaires et différent seulement par quelques mutations ponctuelles. La région U3 des LTR de E26 est différente de celle d'AMV mais colinéaire et très homologue à la région U3 de MH2 ou de RSV. Ainsi, puisque les séquences U3 de E26, RSV et MH2 sont très homologues et que ni RSV ni MH2 n'ont un tropisme pour les érythroblastes, il semble que la région U3 n'ait pas un rôle à jouer dans la transformation érythroblastique par E26 (Nunn et al., 1984).

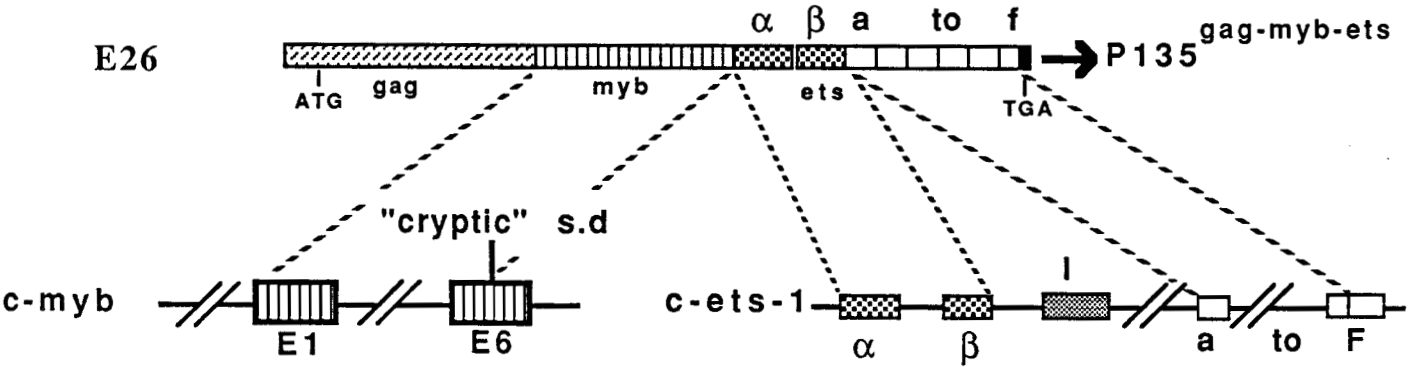
AMV transcrit un ARN sou-génomique de 2.1Kb dont la protéine transformante est une protéine de 45Kd (p45<sup>v-myb</sup>). Par contre, E26 transcrit un ARN génomique de 5.7Kb dont la protéine transformante est une protéine fusionnée de 135Kd (P135gag-myb-ets).

### b. Différence biologique entre E26 et AMV.

Il est clair que AMV ne peut pas transformer des érythroblastes. Par contre, les colonies obtenues en condition de culture érythroïde à partir de cellules de moelle infectées par E26 sont principalement constituées d'érythroblastes. On peut également trouver dans ces colonies des cellules érythroïdes plus matures indiquant que le virus E26 ne bloque pas la différenciation de ces cellules de façon aussi stricte que le virus de l'érythroblastose aviaire (AEV).

Les myéloblastes transformés par le virus AMV à partir de culture de moelle osseuse peuvent spontanément se différencier et peuvent être induits à se différencier en macrophages de façon très efficace par traitement au TPA. Les myéloblastes transformés par E26 à partir de culture de moelle osseuse ne peuvent pas l'être. Ceci suggère que E26 bloque la différenciation des cellules myéloïdes de façon plus rigide que AMV (Beug et al., 1984).





**Figure 19: Formation de la séquence myb-ets du virus E26 par un mécanisme d'épissage aberrant.**

## V-2. MODE D'EXPRESSION ET PRODUITS DE TRADUCTION DE GENES V-ETS , C-ETS-1 ET C-ETS-2

### A. Expression de v-ets et c-ets

#### a. Structure de v-ets et de son homologue cellulaire c-ets-1

L'oncogène v-ets est exprimé sous la forme d'ARN messager tripartitif gag-myb-ets. La partie v-ets peut être divisée en huit régions, notées  $\alpha, \beta$  et a à f de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3', apparentées à huit exons du gène cellulaire c-ets-1 (Figure 19) (Gegonne et al., 1987).

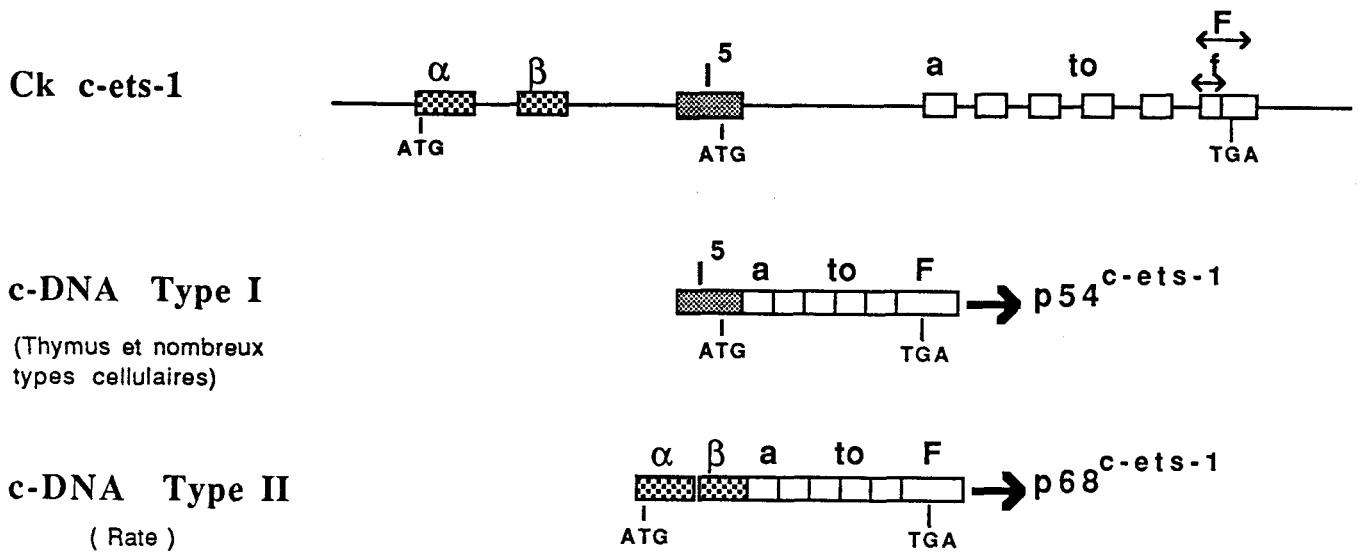
Les séquences cellulaires homologues à l'oncogène v-ets sont réparties sur deux domaines (de 6.0 et 18 kbp) séparés par environ 40 Kbp de région non homologues à v-ets. Le domaine 5' (6.0 kbp) contient les exons  $\alpha$  et  $\beta$  homologues aux 224 premiers nucléotides de v-ets. Le domaine 3' (18.0 kbp) contient 6 exons (a à F) homologues à la majeure partie de v-ets (1202 nt) (Gegonne et al., 1987 ; Leprince et al., 1988).

Récemment, deux espèces de ADNc ont été isolés et identifiés chez le poulet (Chen, 1988 ; Duterque-Coquillaud et al., 1988 ; Leprince et al., 1988) (Figure 20). Tous les deux possèdent les exons communs (a à F) en 3'. Dans le domaine 5', l'un possède un exon nommé I<sup>54</sup>, qui se localise dans les séquences de 40 Kbp non apparentées à v-ets; l'autre possède les exons  $\alpha$  et  $\beta$ . Les deux espèces de ADNc proviennent du même locus c-ets-1 et sont formées grâce à un mécanisme d'épissage alterné (Leprince et al., 1988). Ces ADNc exprimés dans les cellules COS-1 dirigent la synthèse respectivement d'une protéine de 54 kd (p54<sup>c-ets-1</sup>), et d'une protéine de 68 kd (p68<sup>c-ets-1</sup>) qui sont différentes uniquement dans leur partie aminoterminal.

La région de v-ets correspondant aux exons de a à f possède seulement cinq mutations ponctuelles par rapport à c-ets-1 ; parmi elles, deux mutations sont conservatives; (Duterque-Coquillaud et al., 1988). La région f de v-ets est une version tronquée d'un exon de c-ets noté F, dont 39 nucléotides sont remplacés dans v-ets par 48 nucléotides dont l'origine n'est pas encore identifiée (Gegonne et al., 1987, Leprince et al., 1988).

#### b. Structure et expression des gènes c-ets-1 et 2.

Deux gènes cellulaires distincts Hu c-ets-1 et Hu c-ets-2 présentant des homologies de séquence avec l'oncogène v-ets ont été identifiés (de Taisne et al., 1984 ; Waston et al., 1986). Le



**Figure 20: Deux types de cADN c-ets-1  
chez le poulet.**

locus Hu c-ets-1 localisé sur le chromosome 11 dans la région q23 est très homologue au locus c-ets-1 de poulet progéniteur de v-ets (de Taisne et al., 1984 ; Watson et al., Kerckaert, communication personnelle). Le locus Hu c-ets-2 est localisé sur le chromosome 21, et correspond à un locus récemment identifié chez le poulet (Boulukos et al., 1988) et présentant des homologies avec la partie 3' et une région 5' de v-ets. D'autres membres de la superfamille ets mais de parenté plus éloignée ont été mis en évidence ; erg (Rao et al., 1987) ; elk (Rao et al., 1989).

Chez l'homme, le locus ets-1 s'exprime par l'intermédiaire d'un ARN messager (ARNm) de 6.8 kb, le locus ets-2 par l'intermédiaire de trois ARNm respectivement de 4.7 kb, 3.2 kb et 2.7 kb (Watson et al., 1985). Chez la souris, le locus ets-1 code pour un ARNm majeur de 5.3 kb et trois ARNm mineurs de 4.0 kb, 2.5 kb et 2.2 kb (Bhat et al., 1987). Chez le poulet, ets-1 code pour trois ARNm de 7.5 kb, 2.0 kb et 1.5 kb (Leprince et al., 1983b; Chen, 1985 ; Watson et al., 1985), ets2 code pour un ARNm de 4.0 kb (Boulukos et al., 1988). Il faut noter ici qu'il existe deux ARNm de 7.5 kb différents (Leprince et al., 1988) : l'un est exprimé dans la plupart de tissus et surtout dans les lymphocytes T et B et code probablement pour la p54<sup>c-ets-1</sup>. L'autre beaucoup plus rare, n'a été trouvé jusqu'à présent que dans les cellules de rate et code pour p68<sup>c-ets-1</sup>.

Les locus ets sont complexes, le mode d'expression de ces locus n'est pas totalement élucidé. On peut cependant généraliser 3 points :

- 1) c-ets-2 est exprimé dans la plupart des tissus examinés.
- 2) c-ets-1 est exprimé à un taux élevé dans le thymus.
- 3) c-ets-1 et c-ets-2 sont très exprimés dans les tissus jeunes et très peu exprimés dans les tissus adultes à l'exception du thymus.

L'étude du foie en régénération chez la souris a montré que l'expression de c-ets-2 est conjuguée à la prolifération des cellules et a lieu avant la synthèse d'ADN et après les expressions de c-fos et c-myc (Bhat et al., 1987). Pendant la régénération de foie, et en absence de la synthèse de protéines une super-induction d'ARNm ets-2 peut avoir lieu, mais pas de ets-1. Il semble donc que les deux gènes c-ets aient des modes d'expression et de régulation différents.

## B. Produits de traduction de c-ets

### a. Protéines de c-ets

Chez le poulet, une protéine de 54 kd (p54<sup>c-ets-1</sup>) dans le noyau (Pognonec et al., 1989) est détectée à un taux élevé dans le thymus et les lymphocytes provenant de la bourse de Fabricius et à un faible taux dans la plupart des cellules (Ghysdael et al., 1986a). Une autre protéine p68<sup>c-ets-1</sup>

progénitrice de v-ets est détectée dans les cellules de rate (Leprince et al., 1988).

Une série de protéines p58-p64<sup>c-ets-2</sup> (p58, p60, p62 et p64) pour c-ets-2 est exprimée à un taux élevé dans des macrophages (Ghysdael et al., 1986b ; Boulukos et al., 1988). Lorsque les myéloblastes transformés par AMV et traités au TPA se différencient en macrophages, cette différenciation s'accompagne de la synthèse à taux élevés des p62 et p64. Puisque p58-64 sont des protéines nucléaires (Boulukos et al., 1988), ces protéines seraient induites par une série d'événements déclenchés à la suite de l'activation de la PKC par le TPA.

En utilisant des anticorps spécifiques à ets-1 et ets-2, une protéine 51 kd (p51<sup>c-ets-1</sup>) pour ets-1 et une protéine de 56 kd (p56<sup>c-ets-2</sup>) pour ets-2 sont immunoprécipitées dans les cellules humaines (Fujiwara et al., 1988). La protéine p51<sup>c-ets-1</sup> se localise dans le cytoplasme et la protéine p56<sup>c-ets-2</sup> dans le noyau. Leurs localisations différentes suggèrent que les deux protéines ont des fonctions différentes. La localisation de la protéine p51<sup>c-ets-1</sup> humaine dans le cytoplasme est contradictoire avec celle de la protéine p54<sup>c-ets-1</sup> de poulet dans le noyau. La localisation nucléaire de p56<sup>c-ets-2</sup> humaine est en accord avec celle de la protéine c-ets-2 de souris qui se comporte comme les membres du groupe des oncogènes nucléaires (Bhat et al., 1987).

#### b. Phosphorylation des protéines c-ets

La protéine p54<sup>c-ets-1</sup> peut être phosphorylée en une protéine de poids moléculaire apparent 56 Kd et super-phosphorylée en deux protéines p66 et p73 (Pognonec et al., 1988). Les protéines p60<sup>c-ets-2</sup> et p64<sup>c-ets-2</sup> représentent les formes phosphorylées des protéines p58<sup>c-ets-2</sup> et p62<sup>c-ets-2</sup> respectivement (Boulukos et al., 1988).

Pognonec et al. (1988) ont montré que la phosphorylation des protéines c-ets-1 et c-ets-2 dépend de la concentration en Ca<sup>2+</sup> extracellulaire. Cette phosphorylation des protéines c-ets-1 se fait sur des résidues sérines plutôt que sur des résidues thréonines. La protéine p55<sup>c-ets-1</sup> humaine et la protéine p63<sup>c-ets-1</sup> murine sont également phosphorylées sur des résidues sérines.

Dans les thymocytes où l'expression de c-ets-1 est importante par rapport à celle observée dans d'autres cellules, la protéine c-ets-1 est phosphorylée après la stimulation à la concanavaleine A ; cette phosphorylation dépend de la concentration en ions Ca<sup>2+</sup> extracellulaire. Ceci suggère que le produit de c-ets-1 joue un rôle dans des événements médiés par le calcium dans l'activation de cellules T.

Récemment, Pognonec et al. (1989) ont montré que p54<sup>c-ets-1</sup> se liait à l'ADN.

### V-3.IMPLICATIONS DE C-ETS DANS LA TUMORIGENESE

Est-ce que c-ets intervient dans le développement des tumeurs *in vivo* induites ? Il n'y a pas encore de preuves directes. Certaines expériences ont montré que c-ets pouvait être modifié dans certaines tumeurs.

1) Translocation chromosomique. Dans de nombreux leucémies myélomonocytiques, Hu-ets-1 est transféré du chromosome 11q23 vers le chromosome 4q21 (t(4;11) (q21 ; 23)) ou Hu-ets-2 est transféré du chromosome 21q22 vers le chromosome 8q22 (t(8;21) (q22;q22)) (Sacchi et al., 1986). Ces translocations s'associent respectivement avec une diminution de l'expression de Hu-ets-1 et une disparition de l'expression de certains ARNm de Hu-ets-2.

2) Amplification et réarrangement. Hu-ets-1 est amplifié de 10 à 30 fois et réarrangé dans l'ADN de certains patients atteints de leucémies myélomonocytiques (Rovigatti et al., 1986). Cette amplification et ce réarrangement interviennent sur le chromosome 11 et sont toujours accompagnés d'une translocation ou d'un changement des autres gènes présents sur le chromosome 11.

De plus, l'éventuelle liaison de l'expression de c-ets à la tumorigénicité a été testée dans des cellules humaines de carcinomes par la fabrication d'hybrides cellulaires entre ces cellules de carcinomes et cellules diploïdes normales humaines. Dans les cellules hybrides, une diminution de l'expression de c-fos et c-ets-2 et une augmentation de l'expression de c-myb sont détectées par rapport aux cellules tumorigènes de départ (O'Hara et al., 1987). Il est possible que l'expression de ces c-onc soit coordonnée et intervienne dans la régulation de ces cellules ou dans la tumorigénicité.

## **RESULTATS**

**1<sup>ère</sup> PARTIE : CARACTERISATION DES MUTATIONS PRESENTES  
DANS L'ONCOGENE V-MYB D'UN MUTANT DU VIRUS E26,  
ts143 E26, THERMOSENSIBLE POUR LA TRANSFORMATION  
MYELOIDE  
(Résumé de l'article I)**

**INTRODUCTION**

En 1984, le groupe de T.Graf à Heidelberg (Allemagne) a isolé une série de rétrovirus E26 (ts21, ts137, ts138 et ts143 E26) (Beug et al., 1984) thermosensibles pour la transformation myéloïde sans que la transformation érythroïde ne soit affectée. A la température permissive (37°C), les myéloblastes transformés par ces mutants thermosensibles de E26 prolifèrent rapidement en présence de cMGF. Lorsqu'ils sont cultivés à la température non permissive (42°C), ils s'arrêtent de proliférer et commencent à se différencier en présence du cMGF en cellules de type macrophage.

En 1985, K.Moelling en collaboration avec le groupe de T.Graf a montré que l'activité fixant l'ADN de la protéine P135gag-myb-ets était principalement associée à la partie myb, puisque de 80 % à 90 % de cette activité est inhibée par l'anticorps anti-myb spécifique. De plus les protéines P135gag-myb-ets produites par les virus E26 thermosensibles et purifiées, sont thermosensibles pour leur interaction avec l'ADN (Moelling et al., 1985). Ces données s'ajoutaient aux différences de spectre oncogène des virus E26 et AMV pour suggérer de façon indirecte que v-ets était un oncogène. Depuis ceci a été démontré de façon plus directe par la construction *in vitro* de mutants de délétion dans v-ets (Nunn et al., 1989) mais surtout par les travaux de Golay et collaborateurs. Ces auteurs ont isolé un mutant de E26 (ts 1.1 E26) thermosensible pour la transformation des érythroblastes et ne possédant qu'une mutation ponctuelle dans la partie 3' de v-ets (Golay et al., 1988).

**OBJECTIF :**



gag ——— myb  
 ↓

ATCACAAGACTGGCTGATACGGTCAGAACTAAGGGCTTGCATCCCGGTGGCAGAAAGTATTAAACCCAGAACTTATCAAAGGTCCATGG  
 IleThrArgLeuAlaAspThrValArgThrLysGlyLeuArgSerArgTrpGlnLysValLeuAsnProGluLeuIleLysGlyProTrp

ACTAAAGAGGAGGATCAAAGGTAATAGAACTCGTGCAGAAATACGGTCCAAAGCGCTGGTCGGTCATTGCTAAGCATTGAAGGGAAGG  
 ThrLysGluGluAspGlnArgValIleGluLeuValGlnLysTyrGlyProLysArgTrpSerValIleAlaLysHisLeuLysGlyArg

ATTGAAAACAGTGCAGGGAGAGGTGGCACAACCATCTGAATCCAGAAGTGAAGAAAACCTCCTGGAGAGAAGAGGAAGATAGAATTATT  
 IleGlyLysGlnCysArgGluArgTrpHisAsnHisLeuAsnProGluValLysLysThrSerTrpArgGluGluGluAspArgIleIle

C  
 Thr

TACCAGGCACACAAGAGACTGGGAAACAGATGGCAGAAATGCAAAGTTGCTGCCTGGACGGACTGATAACGCTATCAAGAACCACTG  
 TyrGlnAlaHisLysArgLeuGlyAsnArgTrpAlaGluIleAlaLysLeuLeuProGlyArgThrAspAsnAlaIleLysAsnHisTrp

AATTCACCATGCGCCGGAAGGTCGAGCAGGAGGTTACCTGCAGGAGTCTCCAAAGCCGGCCTGCCCTCGGCAACCACCGGCTTCCAG  
 AsnSerThrMetArgArgLysValGluGlnGluGlyTyrLeuGlnGluSerSerLysAlaGlyLeuProSerAlaThrThrGlyPheGln

AAGAGCAGCCACCTGATGGCCTTTGCCACAACCCACCTGCAGGCCCGCTCCCGGGGGCCGCGCCAGGCCCGCTGGGCAGTGACTACCCC  
 LysSerSerHisLeuMetAlaPheAlaHisAsnProProAlaGlyProLeuProGlyAlaGlyGlnAlaProLeuGlySerAspTyrPro

TACTACCACATTGCTGAGCCACAAAATGTCCCTGGTCAGATCCCATATCCAGTAGCACTGCATGTAAATATTGTCAATGTTCTCAGCCA  
 TyrTyrHisIleAlaGluProGlnAsnValProGlyGlnIleProTyrProValAlaLeuHisValAsnIleValAsnValProGlnPro

GCTGTGTCAGCTATTCAGAGACACTATAATGATGAAGACCCTGAGAAAGAAAAACGAATAAAGGAATTAGAGTTGCTACTTATGTGCGACT  
 AlaAlaAlaAlaIleGlnArgHisTyrAsnAspGluAspProGluLysGluLysArgIleLysGluLeuGluLeuLeuMetSerThr

GAGAACTGAAAGGGCAGCAGGCATTACCAACACAGAACCACACAGCAAACCTACCCCGGCTGGCAGAGTACCACGGTTGCTGAGAAAT  
 GluAsnGluLeuLysGlyGlnGlnAlaLeuProThrGlnAsnHisThrAlaAsnTyrProGlyTrpHisSerThrThrValAlaGluAsn

C  
 Ser

C  
 Asp

myb ——— ets  
 ↓

ACCATGACCAGTGGTGACAATGCACCTGTTTCTGTTTGGGGGAACATCACCAGTACTCCATCTCCACCAGTGGATCATGGCACCTCA  
 ThrMetThrSerGlyAspAsnAlaProValSerCysLeuGlyGluHisHisHisCysThrProSerProProValAspHisGlyThrSer

GAGATGATGAGTTACTACATGGACACAACCATGGCAGCAGGGTTCCTTATCCTTTGGCTCGCCCTGGAGTGATGCAAGGTGCTAGCAGC  
 GluMetMetSerTyrTyrMetAspThrThrIleGlySerThrGlyProTyrProLeuAlaArgProGlyValMetGlnGlyAlaSerSer

TGCTGTGAGGACCCCTGGATGCCATGCAGGCTGCAGTCTGCCTGCTGCCCGCCAGGTCGTGTTGCCCGCCGTGGGATGAGGCGGCCATC  
 CysCysGluAspProTrpMetProCysArgLeuGlnSerAlaCysCysProProArgSerCysCysProProTrpAspGluAlaAlaIle

CAGGAAGTTCCCACTGGCCTGGAGCACTACAGCACAGACATGGAATGTGCAGATGTGCCTTTGTTA  
 GlnGluValProThrGlyLeuGluHisTyrSerThrAspMetGluCysAlaAspValProLeuLeu

**Figure 21: Séquence du gène myb du virus  
 ts143 E26**

Nous avons voulu cloner un provirus biologiquement actif du mutant ts143 E26 afin de déterminer au niveau moléculaire quelle était la (ou les) mutation(s) responsable(s) du phénotype de transformation thermosensible.

## **RESULTATS**

### **A) Clonage d'un provirus ts143 E26 biologiquement actif**

L'ADN proviral du virus ts143 E26 a été cloné à partir d'une banque d'ADN de myéloblastes de poulet transformés par ce virus. Cette banque de gène a été criblée avec des sondes v-ets, v-myb et avec des sondes correspondant aux gènes de structure viraux (gag et env présents dans E26). Un phage recombinant hybridant avec toutes ces sondes, lambda ts143 E26-1 a été isolé. L'ADN de ce clone a été digéré par différents enzymes de restriction, les fragments séparés par électrophorèse en gel d'agarose, et hybridés après transfert sur nitrocellulose avec les sondes LTR, gag, myb, ets et env. Cette étude a démontré d'une part que nous avons cloné un provirus ts143 E26 entier et d'autre part que sa structure était indistinguable par cette technique de celle des virus E26 de type sauvage décrits précédemment (Leprince et al., 1983 ; Nunn et al., 1983).

Enfin, nous avons démontré que le clone moléculaire obtenu était biologiquement actif c'est à dire que le virus produit par des fibroblastes embryonnaires de poulet transfectés par le clone ts143 E26-1 présentait les mêmes caractéristiques biologiques que le virus ts143 E26 (voir paragraphe C, construction des mutants et analyse de leurs propriétés biologiques).

### **B) Mise en évidence de mutations ponctuelles dans l'oncogène v-myb du virus ts143 E26**

Le virus AMV ne transforme que des myéloblastes et le virus ts143 E26 n'est thermosensible que pour la transformation des myéloblastes sans affecter la transformation des érythroblastes. Toutes ces données suggéraient donc fortement que les lésions du ts143 E26 pouvaient être localisées uniquement dans l'oncogène v-myb.

Nous avons donc séquencé le gène v-myb du virus ts143 E26 et comparé sa séquence nucléotidique à celle du gène v-myb du virus E26 sauvage (Nunn et al., 1983 ; 1984). Cette comparaison révèle l'existence de trois mutations ponctuelles (Figure 21) :

- la première touche le codon 68 ACA qui est changé en AGA dans le virus ts143 E26 (La numérotation utilisée a été obtenue en définissant arbitrairement comme codon 1 le premier

acide aminé du gène myb dans la protéine P135gag-myb-ets ).

- deux autres mutations très voisines touchent le codon 249 AGC qui est changé en AGT et le codon 254 GAC qui est changé en GAG dans le ts143 E26.

Néanmoins, ces trois mutations ponctuelles ne se traduisent que par un seul changement important dans la séquence en acides aminés. En effet, de par la dégénérescence du code génétique les codons AGC et AGT codent tous les deux pour une Sérine.

De même, la mutation du codon 254 peut être considérée comme chimiquement conservative puisque les codons GAC et GAG codent pour deux acides aminés de la même famille, acide aspartique et acide glutamique respectivement, ne différant que par un groupement CH<sub>2</sub> dans leur chaîne latérale acide. Par contre la mutation en position 68 change à la fois la taille et la charge de la chaîne latérale. Un acide aminé possédant une petite chaîne latérale polaire non chargée (une Thréonine codée par le codon ACA), est remplacé par un acide aminé possédant, une grande chaîne latérale basique (une Arginine codée par le codon AGA).

En plus de la nature de leur chaîne latérale, la localisation des mutations dans le domaine myb de la P135gag-myb-ets permet également d'évaluer leur contribution respective dans l'induction du phénotype thermosensible. La mutation 254 (Acide aspartique changé en Acide glutamique) est située dans une zone peu conservée au cours de l'évolution des protéines myb.

Par contre la mutation 68 est située dans la partie aminoterminal de la protéine, qui est responsable de l'activité "DNA-binding" de la protéine, 12 acides aminés en 3' du signal de localisation nucléaire putatif de la protéine AMV v-myb (positions 29 à 57). De plus, la Threonine en position 68 est présente dans les protéines myb virales aussi bien que dans les protéines cellulaires de drosophile, de poulet et de l'homme et même chez une protéine du maïs présentant une forte homologie de séquence avec le domaine NH<sub>2</sub> terminal des protéines myb eucaryotes (Paz-Ares et al.,1989)(Figure 15).

### C) Construction des mutants et analyse de leurs propriétés biologiques

#### a) Protocole général d'obtention des virus

Afin de démontrer qu'un ADN proviral cloné a gardé toutes les propriétés biologiques du virus de départ ou pour étudier celles d'un mutant construit *in vitro*, il faut obtenir à partir de l'ADN obtenu par génie génétique des particules virales. Pour cela on utilise classiquement la technique de transfection au phosphate de calcium.

Le problème consiste ensuite à sélectionner les cellules ayant reçu l'ADN. Dans le cas des virus transformants, les fibroblastes sont sélectionnés sur le critère de transformation. Dans le cas des virus ne transformant pas les fibroblastes, tels E26 et AMV, on peut utiliser un gène de sélection qui, couplé à l'emploi d'une drogue toxique, permettra de sélectionner les cellules ayant reçu l'ADN. Le système le plus couramment utilisé est constitué par :

- le gène bactérien du transposon Tn5 qui confère la résistance à la néomycine (néo) et à ses analogues structuraux (ex G418).

- une drogue toxique (G418) qui est un analogue structural de la néomycine, efficace sur les cellules eucaryotes. A des concentrations de 100-400  $\mu\text{g/ml}$  dans le milieu de culture, seules les cellules possédant le gène de résistance à la néomycine peuvent survivre (Gandullen et al., 1987).

Dans une première série d'expériences nous avons utilisé une co-transfection des ADN proviraux clonés avec un plasmide exprimant le gène néo sous le contrôle d'un promoteur efficace dans les cellules eucaryotes : pSV2néo.

Plus récemment, nous avons obtenu des vecteurs rétroviraux construits dans le laboratoire de J. Samarut (Lyon) et de J. Lipsick (San Diego) qui contiennent dans leur génome le gène de résistance à la néomycine ; l'avantage dans ce cas étant principalement la transmission possible par infection virale du phénotype résistant à d'autres cellules après sur-infection par un virus "helper". En effet, en règle générale, les titres viraux obtenus (exprimés en nombre de particules virales produites par ml de culture) sont faibles. D'autre part, les titres obtenus avec des cellules infectées sont en général bien supérieurs à ceux obtenus avec des cellules transfectées.

Après transfection de ces ADN sur fibroblastes de poulet, on obtient, après 2-3 semaines de culture en milieu sélectif contenant 200 à 400  $\mu\text{g/ml}$  de G418, des foyers de cellules résistantes à la néomycine. On peut ensuite recueillir des surnageants de culture contenant le virus. Ces surnageants peuvent être utilisés soit pour infecter des fibroblastes qui sont ensuite reselectionnés au G418 afin d'augmenter le titre viral ou directement pour essayer d'obtenir des cellules hématopoïétiques transformées par infection de cellules de moelle osseuse ou d'embryon de poulet de 2 ou 3 jours (blastoderme).

b) Le clone Lambda ts 143 E26-1 est biologiquement actif

Par commodité, le provirus ts 143 E26 cloné dans un vecteur phagique a été souscloné en utilisant des sites uniques KpnI et XbaI situés d'une part dans le polylinker du vecteur plasmidique pUC19 et d'autre part dans les bras du vecteur phagique. Le clone ainsi généré, pts 143 E26 a été

co-transfecté dans les fibroblastes secondaires de poulet en présence d'ADN de pSV2 néo dans un rapport (10/1).

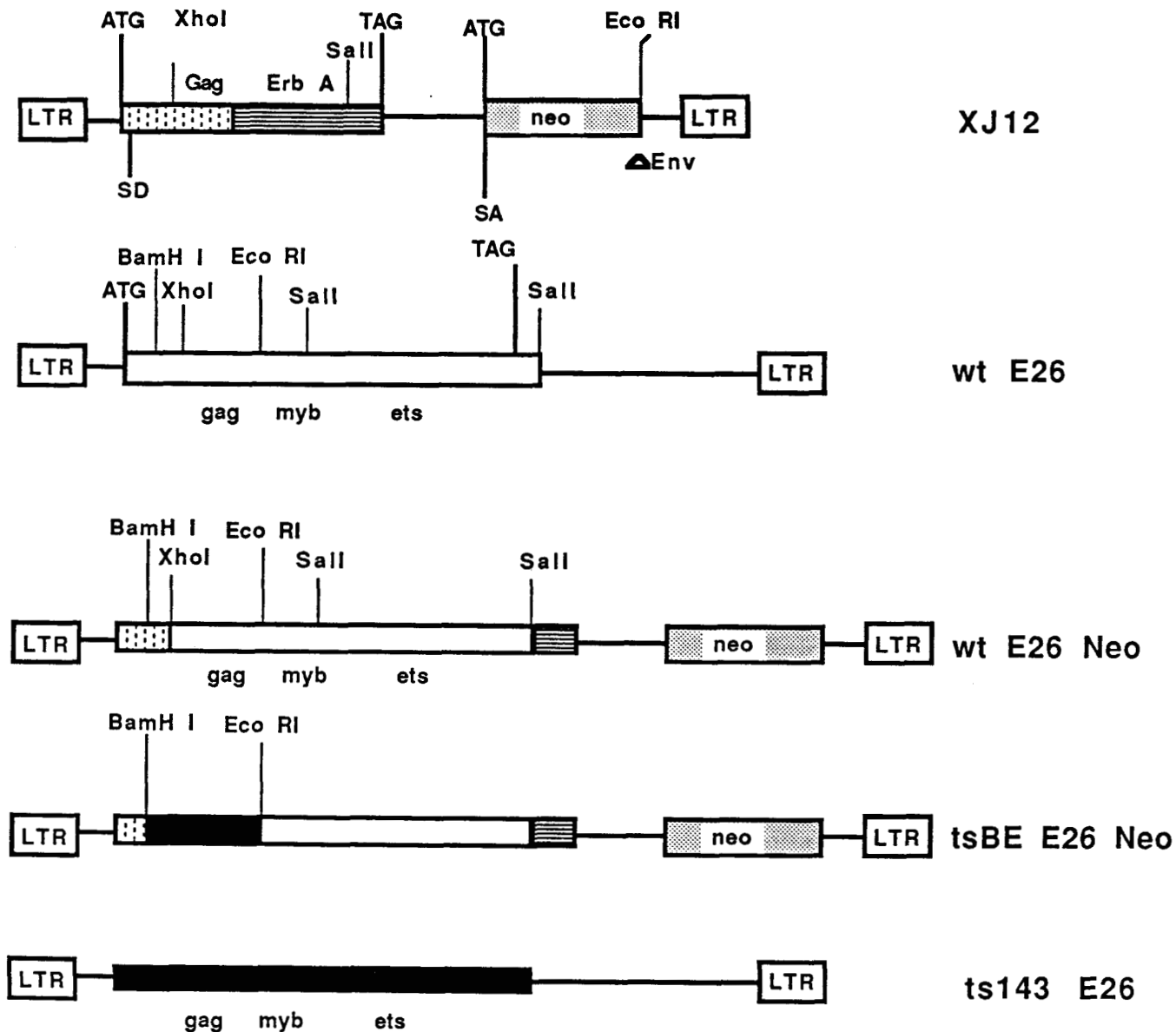
Après sur-infection par un virus "helper", RAV-1, et culture en milieu sélectif contenant 400 µg/ml de G418, les fibroblastes ainsi sélectionnés ont été cultivés en présence de cellules de moelle osseuse de poulet à 37°C afin d'obtenir des cellules myéloïdes transformées. Après 8-15 jours de culture en milieu riche contenant du cMGF, des cellules myéloïdes transformées, de morphologie ronde, proliférant rapidement et poussant en suspension sont apparues. Ces cellules présentent les caractéristiques phénotypiques de cellules myélomonocytiques immatures, encore désignées plus communément sous le terme de "myéloblastes" (Graf et al., 1979 ; Radke et al., 1982 ; Beug et al., 1984).

Ces cellules ont ensuite été cultivées en milieu riche semi-solide (contenant du Méthocel) à 37°C et 42°C afin de déterminer leur capacité de différenciation à chaque température. Les colonies transformées obtenus dans ces conditions à 37°C avec le virus ts 143 E26 obtenu à partir du clone moléculaire, présentaient un aspect très dense typique des colonies de cellules non différenciées ("myéloblastes"), alors qu'à 42°C, des colonies de cellules dispersées et constituées de cellules ressemblant à des macrophages étaient obtenues. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus précédemment avec l'isolat viral ts143 E26 (Beug et al., 1984). Nous pouvons en conclure que nous avons obtenu un clone moléculaire biologiquement actif du virus ts143 E26.

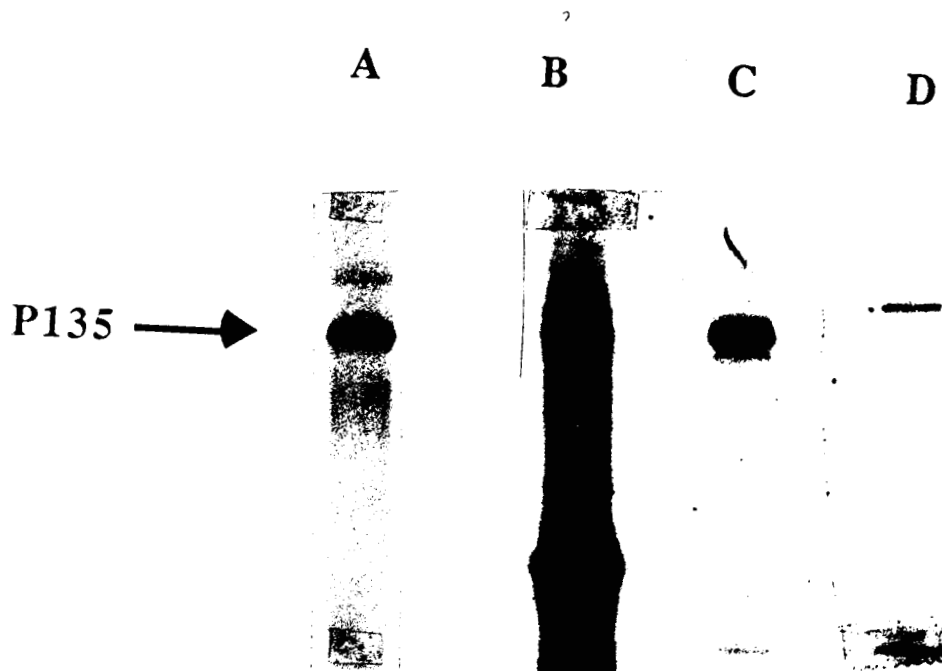
C) La mutation Thr⇒ Arg en position 68 est suffisante pour induire un phénotype thermosensible.

La séquence nucléotidique du gène v-myb du ts143 E26 ainsi que les données de la littérature concernant l'oncogène v-myb, nous incitaient à penser que la substitution de la Thréonine en position 68 par une Arginine pouvait être responsable du phénotype thermosensible des cellules myéloïdes transformées par ts143 E26.

Afin de démontrer cela, nous avons introduit cette mutation dans le génome d'un virus E26 de type sauvage. Par souci de commodité et afin d'éviter les inconvénients de la co-transfection de l'ADN viral avec celui de pSV2 néo (sélection de cellules ayant reçu seulement le gène néo) nous avons tout d'abord construit un virus E26 sauvage possédant dans son génome le gène néo. Nous



**Figure 22: Construction du provirus tsBE E26 Neo thermosensible**



A : Myéloblastes transformés par wtE26  
+ sérum anti-ets

B C D : Myéloblastes transformés par tsBE E26  
+ B: sérum anti-gag  
+ C: sérum anti-ets  
+ D: sérum non-immun

**Figure 23: Immunoprécipitation de la protéine transformante du virus ts BE E26neo dans des myéloblastes transformés à 34C°**

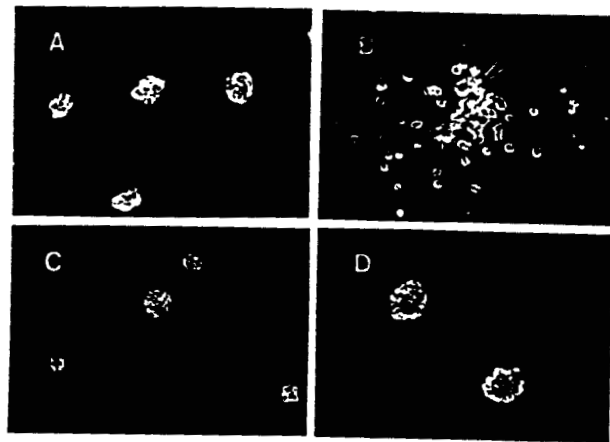
avons utilisé le vecteur XJ12 fourni par le Dr. J. Samarut (Figure 22). Le fragment 2,0 kbp XhoI - Sal I contenant la majeure partie de la capacité codante de la protéine P75<sup>gag-erbA</sup> a été remplacé par le fragment 3.5 kbp Xho - SalI contenant toute la capacité codante pour la protéine P135<sup>gag-myb-ets</sup> d'un virus E26 sauvage (Figure 22).

La transfection de cet ADN, nommé wt E26 neo, ainsi que l'infection de cellules hématopoïétiques, selon le protocole décrit plus haut, a démontré que le virus présentait les propriétés biologiques typiques d'un virus E26 de type sauvage bien que la capacité codante de la P135<sup>gag-myb-ets</sup> soit placée sous le contrôle des LTR du virus AEV (virus de l'Erythroblastose aviaire).

Nous avons ensuite construit le clone tsBE E26 neo (Figure 22) en remplaçant le fragment 0,9 kbp BamH I- EcoRI (gag-myb) du clone wt E26 neo par le fragment correspondant du virus ts143 E26, contenant le codon codant pour une Arginine au lieu d'une Thréonine en position 68 (Figure 21 et 22).

Les cellules myéloïdes ("myéloblastes") transformées par le virus tsBE E26neo à 37°C exprimant la protéine P135<sup>gag-myb-ets</sup> (Figure 23), acquéraient une morphologie de cellules ressemblant à des macrophages lorsqu'elles étaient cultivées à 42°C (Figure 24 et Table 9). Nous concluons donc que la substitution de la Thréonine en position 68 par une Arginine est suffisante pour convertir un virus E26 de type sauvage en un virus E26 ts pour la transformation des cellules myéloïdes.





Les colonies des myéloblastes transformés par tsBE (A,B)  
et par E26(C,D) à 37°C(A,C) et à 42°C(B,D).

**Figure 24: Morphologie des colonies des myéloblastes transformés par tsBE E26neo et wtE26neo à 37°C et 42°C.**

|             | Nombres de colonies obtenues à |           |           |           |
|-------------|--------------------------------|-----------|-----------|-----------|
|             | 37°C                           |           | 42°C      |           |
|             | compactes                      | disperses | compactes | disperses |
| tsBE E26neo | 316                            | 0         | 1         | 128       |
| wtE26       | 250                            | 0         | 188       | 13        |
| ts143E26    | 290                            | 1         | 1         | 115       |

**Table 9: Nombre et aspect des colonies de cellules myéloïdes obtenues en Méthocel après infection par les différents virus wt ou ts construits.**

## 5'Myb séquence

P135 Glu Val Lys Lys Thr Ser Trp **Thr** Glu Glu Glu Asp Arg Ile Ile  
 p45 5' 3'

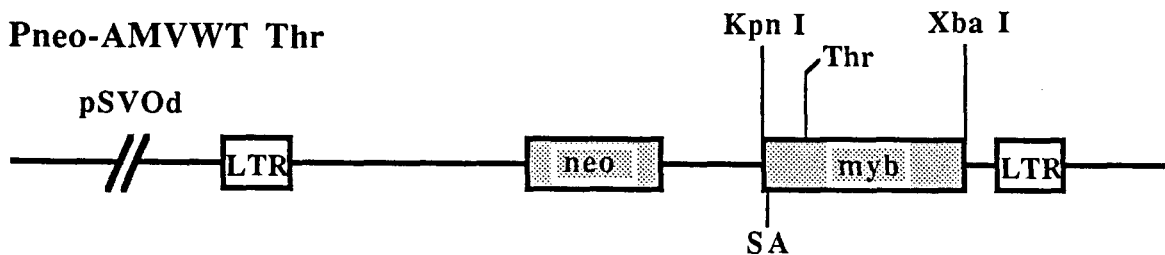
AMV v-myb GAA GTG AAG AAA ACC TCC TGG **ACA** GAA GAG GAA GAT AGA ATT ATT

ts143  
 E26 myb GAA GTG AAG AAA ACC TCC TGG **AGA** GAA GAG GAA GAT AGA ATT ATT

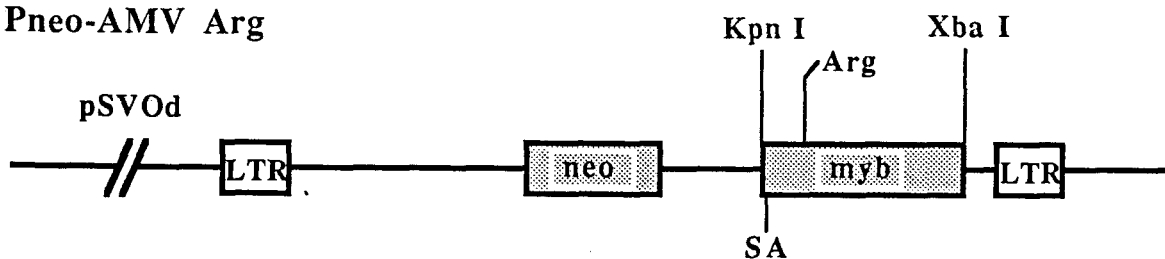
Oligonucléotide  
 synthétisé 3' TGG AGG ACC **TCT** CTT CTC CTT 5'

gag-myb-ets  
 ts143 P135 \* \* \* \* \* **Arg** \* \* \* \* \*

## Pneo-AMVWT Thr



## Pneo-AMV Arg



**Figure 25: Construction du provirus AMV contenant un résidu Arginine en position analogue à la position 68 du v-myb de E26.**

## II<sup>ème</sup> PARTIE : INTRODUCTION DE LA MUTATION Thr $\Rightarrow$ Arg DANS L'ONCOGENE V-MYB DU VIRUS AMV

### INTRODUCTION

Deux rétrovirus aviaires, AMV et E26 contiennent dans leurs génomes respectifs des versions apparentées mais différentes de l'oncogène v-myb. Les deux allèles connus jusqu'à présent de l'oncogène v-myb, v-myb<sup>AMV</sup> et v-myb<sup>E26</sup> présentent en effet de nombreuses différences tant au niveau de leur comparaison avec leur progéniteur commun, le proto-oncogène c-myb (poulet) que dans leur mode d'expression (voir Introduction générale).

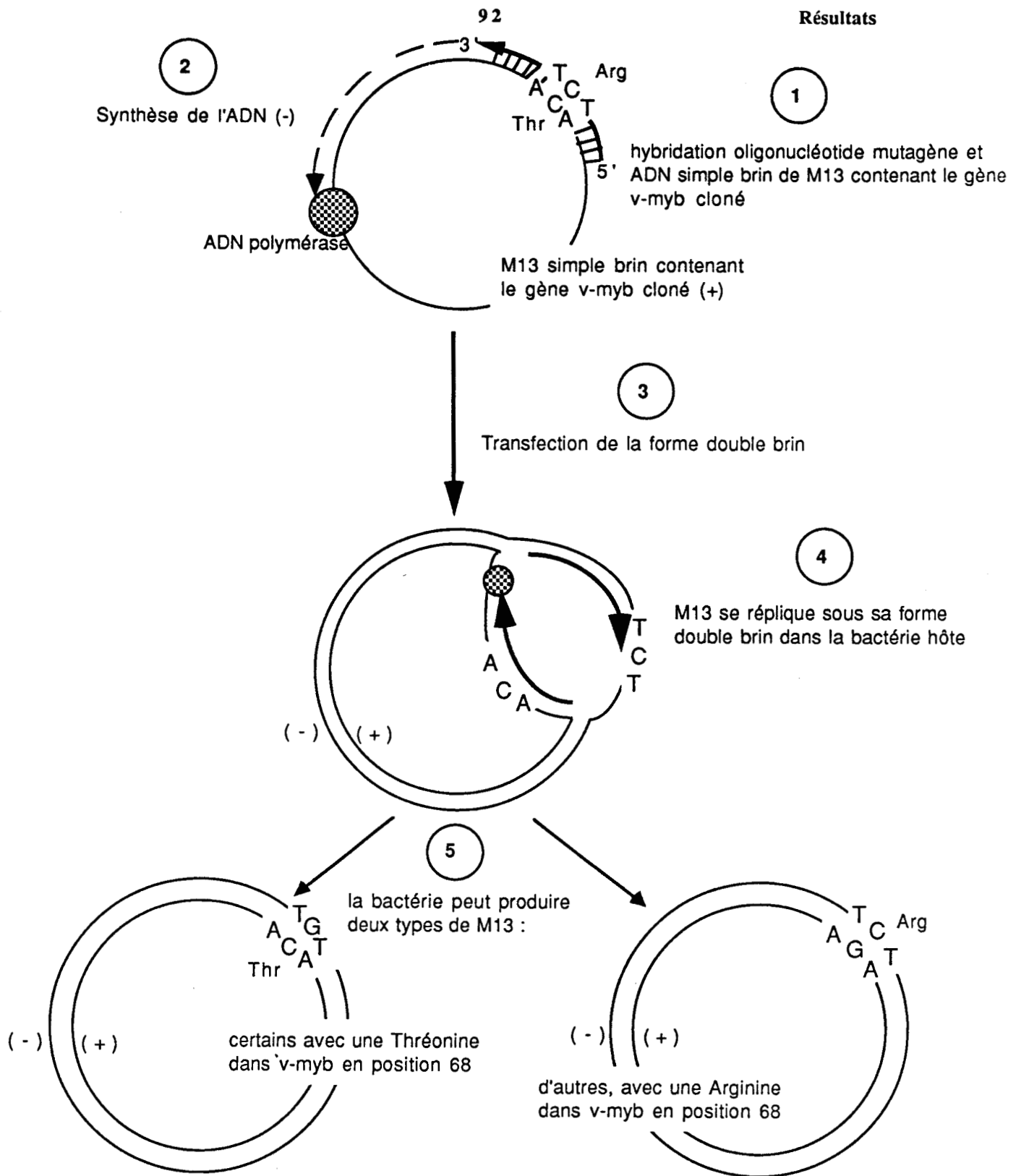
### OBJECTIF

Nous avons introduit la mutation Thr $\Rightarrow$  Arg dans le génome d'AMV afin de déterminer quelle serait l'effet, sur les propriétés biologiques du virus, de l'introduction de cette mutation dans un gène v-myb, mais exprimé dans un contexte différent de celui du virus E26.

### RESULTAT

#### I - Construction des virus Pneo - AMV Thr (wt) et Pneo-AMV Arg.

Nous avons introduit le gène v-myb (fragment KpnI - XbaI de  $\approx$  1,3 Kbp, préparé à partir d'un plasmide contenant la moitié 3' terminale du génome d'AMV originellement obtenu du Dr. Baluda) dans le vecteur Pneo AMV obtenu du Dr. Lipsick. Ce vecteur contient en fait un ADN proviral complet d'AMV mais une partie des gènes gag et pol a été remplacée par le gène néo rabouté en phase avec le gène gag. Ce virus permet donc la co-expression dans les cellules infectées de la protéine p45<sup>v-myb</sup> et d'une protéine de fusion gag-néo conférant à ces cellules, le caractère de résistance à la néomycine. Cette construction a été appelée Pneo-AMVThr ou Pneo-AMV wt (Figure 25).



**Figure 26: Principe de la mutagénèse dirigée**

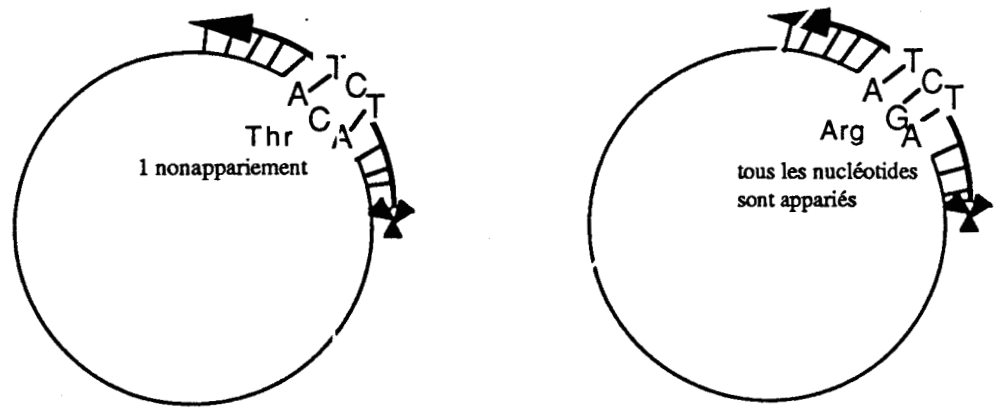
Pour réaliser la mutation ponctuelle située en 5' du gène v-myb (Thréonine remplacée par une Arginine), nous avons utilisé la technique de mutation dirigée à l'aide d'oligonucléotides de synthèse (Zoller et Smith, 1982) (Figure 26 et 27). Dans ce but, le gène v-myb (fragment KpnI/XbaI) a été introduit dans un bactériophage M13 mp18. Le bactériophage M13 est un phage ADN simple brin (virus bactérien) dont le génome se réplique sous la forme d'un ADN double brin dans les bactéries. Les deux brins d'ADN ne sont cependant 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 encapsidé dans les particules infectieuses lorsqu'elles quittent la bactérie par extraction.

Nous avons préparé une quantité importante d'ADN simple brin de M13 contenant le gène v-myb que nous y avons introduit. Un oligonucléotide de synthèse a ensuite été préparé. Cet oligonucléotide de synthèse est complémentaire de la région entourant le triplet codant pour la Thréonine qu'on desire muter, mais au niveau de cette Thréonine, l'oligonucléotide possède le triplet codant pour une Arginine. Dans la mesure du possible on choisit un triplet couramment utilisé par la bactérie en tenant compte des fréquences d'utilisation des codons.

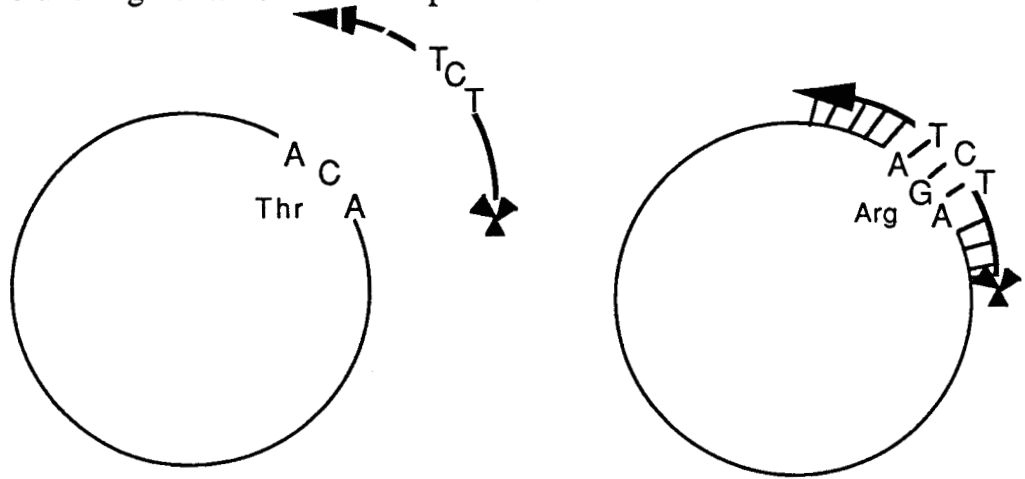
Après hybridation, l'oligonucléotide a servi d'amorce à une ADN polymérase pour la synthèse de l'ADN de polarité négative du M13. Nous avons obtenu ainsi des ADN double brin de M13 que nous avons transfectés dans les bactéries. Après la répllication de l'ADN double brin du phage M13 dans les cellules, les bactéries étaient capables de produire deux sortes de M13 : certains possédaient dans leur génome un codon Thréonine (ACA), les autres, un codon Arginine (AGA) (Figure 26). Pour identifier les phages, dont le génome présentait le codon Arginine muté dans v-myb, nous avons marqué l'extrémité 5' de l'oligonucléotide de synthèse au phosphate radioactif en utilisant une préparation purifiée de la polynucléotide kinase du phage T4. Environ deux cent clones ont été hybridés avec cette sonde dans les conditions où l'oligonucléotide hybride avec l'ADN sauvage et avec l'ADN muté. Par la suite, nous avons réalisé des lavages en augmentant la température. La complémentarité de l'oligonucléotide avec l'ADN possédant le codon Arginine étant totale (tous les nucléotides sont complémentaires), cette structure est plus stable que celle de l'oligonucléotide avec l'ADN possédant le codon Thréonine (où il y a une paire de nucléotides non appariés). Ainsi, les clones dont l'hybridation est plus stable en fonction de la température devraient être ceux qui possèdent un codon Arginine (Figure 27). Nous avons sélectionné de tels phages et vérifié, par séquençage nucléotidique, que ceux-ci contenaient bien la mutation voulue, c'est-à-dire, un codon Arginine en position voulue dans le gène v-myb.

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

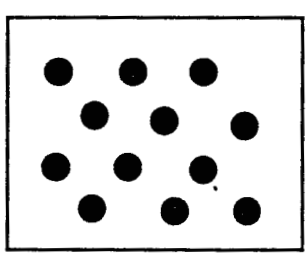
2) hybridation avec l'oligonucléotide mutagène marqué radioactivement en 5'



3) lavages accompagnés d'une augmentation de la température

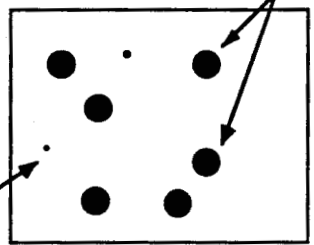


Feuille de nitrocellulose sur laquelle sont déposés l'ADN de différents clones. Ces ADN ont été hybridés avec la sonde oligonucléotidique marquée radioactivement.



lavage à la température ambiante

phage contenant probablement la mutation souhaitée (Arginine)



phage contenant probablement une Thréonine

lavage à la température Td -5°C  
Td=2x(A+T)+4x(G+C)

**Figure 27: Principe de repérage des phages possédant la mutation désirée**

Le fragment d'ADN (fragment KpnI/XbaI) obtenu à partir de la forme replicative de M13 contenant la mutation correcte a été réintroduit dans le vecteur Pneo-AMV. Nous avons ainsi obtenu deux types de provirus : un provirus de type sauvage Pneo-AMV wt et un provirus muté Pneo-AMV Arg qui possède une seule mutation Arginine en 5' du gène v-myb par rapport à l'AMV de type sauvage (Figure 25).

## II - Obtention des virus Pneo-AMV wt et Pneo-AMV Arg.

Ces ADN proviraux ont été transfectés dans des fibroblastes de poulet en présence de virus auxiliaire (RAV-1). Après culture en milieu sélectif contenant 400 µg/ml de G418 des cellules résistantes ont été isolées. Les fibroblastes ainsi sélectionnés ont été utilisés soit pour la production de surnageants contenant des particules virales infectieuses soit directement dans des expériences de co-culture avec des cellules hématopoïétiques.

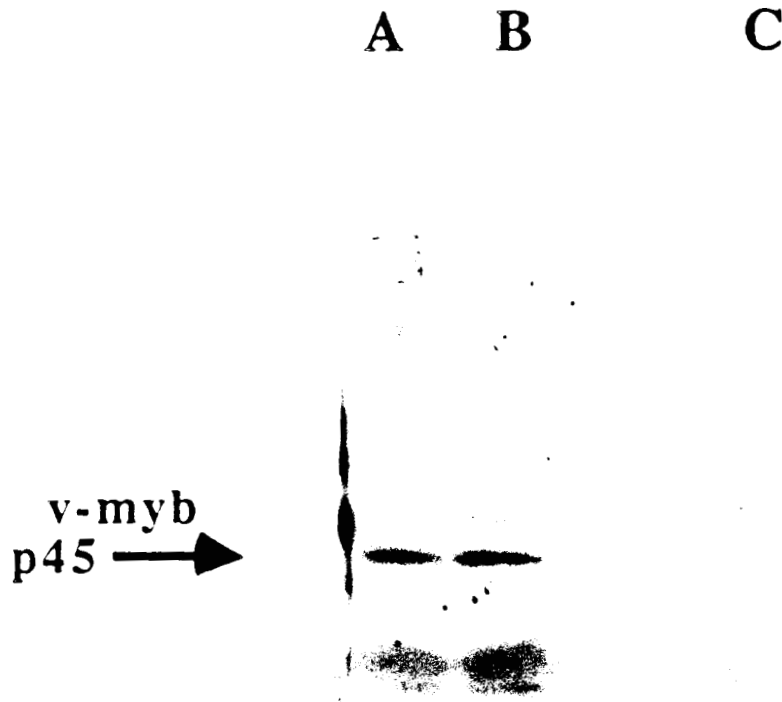
Des expériences de marquage métabolique à la Méthionine <sup>35</sup>S suivi d'une immunoprécipitation à l'aide de sérum dirigé contre v-myb ou des expériences utilisant la technique d'empreintes de protéines ("Western Blot") ont permis d'analyser la présence, la production et la stabilité des protéines p45<sup>v-myb</sup> dans les fibroblastes infectés par les virus Pneo-AMV wt ou Pneo-AMV Arg. Les résultats nous ont montré que la quantité de la protéine p45<sup>v-myb</sup> mutée était semblable à celle de la protéine p45<sup>v-myb</sup> sauvage à 37°C (Figure 28). Ainsi cela signifie que l'introduction de la mutation dans l'AMV type sauvage ne semblait avoir affecté ni la production ni la stabilité de la protéine p45<sup>v-myb</sup> mutée à 37°C.

## III - Propriétés biologiques des virus Pneo-AMV wt et Pneo-AMV Thr.

### A) Essai de transformation de cellules myéloïdes

Nous avons co-cultivé les fibroblastes, transfectés par les ADN proviraux de Pneo-AMV wt et Pneo-AMV Arg et sélectionnés en milieu contenant 400µg/ml de G418, avec des suspensions cellulaires obtenues à partir de sac vitellin d'embryon de poulet de 12 jours. Ce système biologique est très souvent utilisé dans des essais de transformation *in vitro* par le virus AMV. En effet le sac vitellin est l'un des organes hématopoïétiques principaux chez l'embryon de poulet. De plus au stade de 12 jours de développement, il est le siège d'une intense activité granulopoïétique et contient donc de nombreuses cellules sensibles à la transformation par le virus AMV (Durban et





A, B : sérum anti-myb  
C : sérum non-immun

Figure 28: Analyse par empreinte de protéine ("Western Blot") des fibroblastes infectés par les virus Pneo AMVwt et Pneo AMV Arg et sélectionnés en milieu sélectif contenant du G418.

Boettiger, 1984 ; Lipsich et al., 1986). Ces cultures ont été réalisées à 37°C puisque la mutation que nous avons introduite dans le v-myb<sup>AMV</sup> s'est révélée suffisante pour conférer un phénotype thermosensible aux cellules myéloïdes transformées par E26 (gag-myb-ets) (cf 1<sup>ère</sup> partie des résultats).

Dans le cas du virus Pneo-AMV wt, des cellules transformées "myéloblastes", proliférant rapidement en suspension et envahissant la culture, sont apparues après environ deux semaines de culture à 37°C. Dans le cas du virus Pneo-AMV Arg malgré de nombreuses tentatives, aucune apparition de cellules transformées n'a été observée même en maintenant les cultures à 37°C pendant des temps supérieurs à deux mois ou en diminuant la température d'incubation à 34°C.

Ce résultat négatif pouvait être interprété de trois façons différentes :

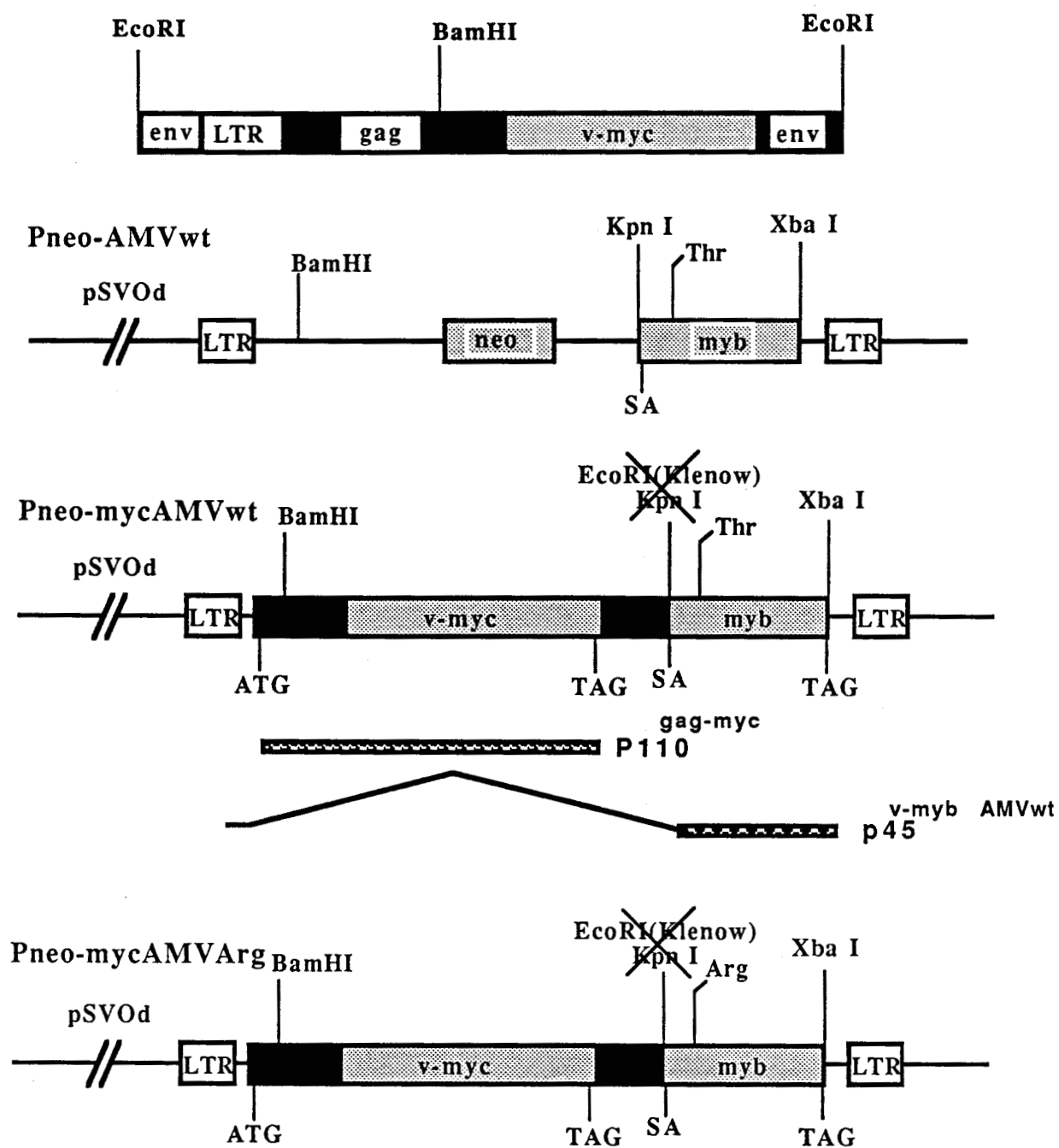
- i) le titre viral (en terme de particules virales produites par ml de milieu de culture) produit par les fibroblastes infectés par le virus Pneo-AMV Arg était trop faible pour permettre une infection efficace des cellules hématopoïétiques sensibles à AMV et par voie de conséquence l'émergence de cellules transformées.

- ii) le virus Pneo-AMV Arg infectait efficacement et transformait des précurseurs de cellules myéloïdes, mais ces cellules avaient besoin pour proliférer de facteur(s) de croissance non-présents dans le milieu.

- iii) la mutation Thr⇒ Arg qui conférait au gène v-myb<sup>E26</sup> un phénotype thermosensible pour la transformation des cellules myéloïdes abolissait complètement la propriété de transformation des cellules myéloïdes par l'oncogène v-myb<sup>AMV</sup>.

La première hypothèse paraît peu plausible en effet les surnageants viraux obtenus à partir des fibroblastes transfectés par le clone Pneo-AMV Arg contiennent effectivement des particules virales. Ceci est démontré par l'infection et la culture en milieu de sélection de fibroblastes de poulet par 5 ml de surnageant de culture des fibroblastes transfectés. L'apparition de foyers de cellules résistantes au G418 témoigne de l'existence de virus dans les surnageants de culture. De plus le nombre de particules virales mises en jeu dans cette expérience est bien inférieur à celui mis en jeu dans l'expérience de co-culture pendant plusieurs semaines de cellules hématopoïétiques avec des fibroblastes produisant continuellement du virus.

La deuxième hypothèse paraît elle aussi peu probable. En effet toutes les cultures de cellules hématopoïétiques ont été réalisées en milieu riche : milieu DMEM complétement de 20% (vol/vol) de sérum de veau foetal, 2% de sérum de poulet, et de 1% d'une solution de cMGF. Ce facteur de



**Figure 29: Structures des provirus Pneo-mycAMVArg et Pneo-mycAMVwt**

croissance, cMGF ou "chicken myelomonocytic growth factor" permet la prolifération des cellules de la lignée myélomonocytaire normales ou transformées par différents virus (Leutz et al., 1984 ; Leutz et al., 1988).

La troisième hypothèse pour être démontrée requièrerait donc un système biologique impliquant des cellules de la lignée myélomonocytaire où l'action du gène v-myb ne soit pas l'agent transformant principalement, mais puisse néanmoins avoir un effet mesurable. Par chance, un tel système existe, il s'agit de la dominance de l'oncogène myb sur l'oncogène myc dans les cellules myélomonocytaires de poulet transformées par ces deux oncogènes (Symonds et al., Ness et al., 1989). Les cellules myélomonocytaires de poulet transformées par l'oncogène v-myc ressemblent à des macrophages matures, alors que celles transformées par v-myb<sup>AMV</sup> ou gag-v-myb<sup>E26-ets</sup> présentent un phénotype plus immature. Par contre les cellules transformées à la fois par v-myc et par v-myb-ets sont apparemment phénotypiquement indistinguables (phénotype immature), de celles transformées par v-myb ou myb-ets seul, bien qu'elles synthétisent la protéine myc. Ces résultats démontrent que l'oncogène v-myb est dominant sur v-myc et que, alors que v-myc induit une prolifération cellulaire sans affecter la différenciation, v-myb induit dans les mêmes cellules cibles à la fois une prolifération ainsi qu'un blocage de la différenciation ou même une dédifférenciation dans le cas des cellules transformées par myc.

Nous avons donc construit deux provirus exprimant la protéine P110 gag-myc du virus de la myélocytomatose aviaire (MC 29) associé soit à la p45 v-myb du virus Pneo-AMV wt ou à la p45 v-myb du virus Pneo-AMV Arg (Figure 29). Les ADN proviraux ont été transfectés sur des cellules de caille sensible à la transformation par myc. Les clones de fibroblastes de caille transformés par chaque virus ont été isolés et les surnageants viraux produits sont en cours d'analyse (dans le laboratoire du Dr. T.Graf à HEIDELBERG).

Si à 37°C, les cellules myélomonocytaires transformées par le virus gag-myc/ myb Arg sont de type mature (phénotype myc) ceci démontrera que la mutation Thréonine⇒ Arginine abolit les capacités de transformation des cellules myéloïdes de l'oncogène v-myb<sup>AMV</sup>. Par contre, si à 37°C, ces cellules présentent un phénotype immature (de type myb + myc avec myb actif), il faudra réenvisager la première (problème de titre viral) et la deuxième hypothèse (problème de prolifération des cellules transformées dans le milieu de culture utilisé).



### III<sup>ème</sup> PARTIE : CONSTRUCTION DES VIRUS E26 MUTES DANS LES ONCOGENES v-myb ET/OU v-ets ET CARACTERISATION DE LEUR EFFET BIOLOGIQUE DANS LE SYSTEME DE CELLULES DE NEURORETINE DE POULET.

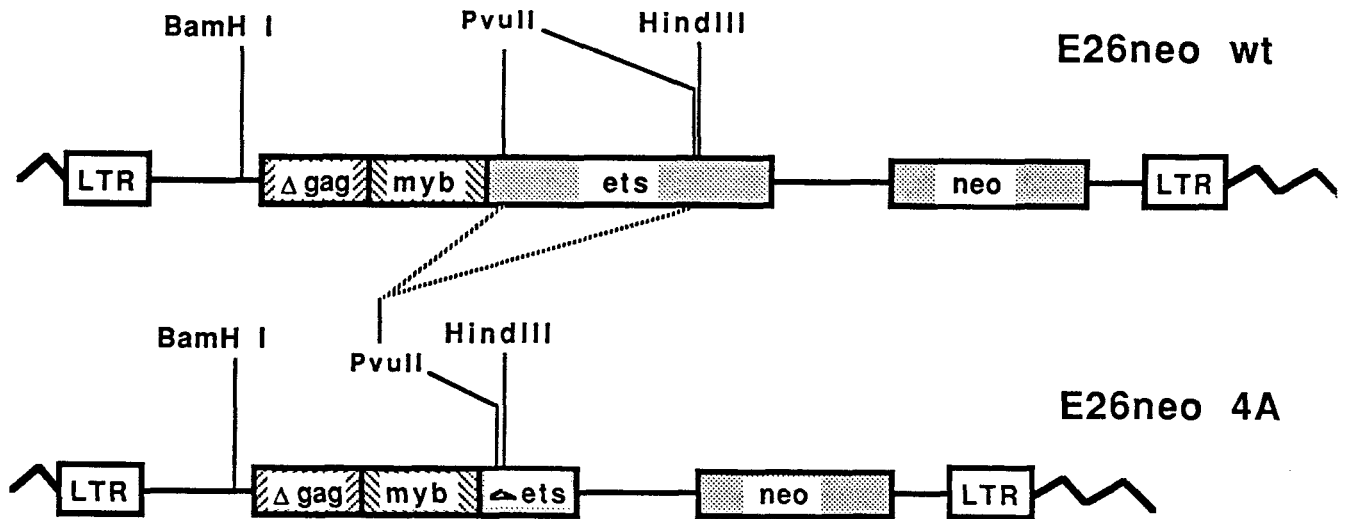
#### INTRODUCTION

La coopération entre v-mil et v-myc dans le système de neurorétine a été déjà décrite dans la partie "INTRODUCTION GENERALE". Brièvement, le gène v-mil fait proliférer des cellules de neurorétine de poulet (CNR) alors que le gène v-myc transforme des CNR en coopérant avec v-mil dans des conditions de culture bien définies. C'est une coopération entre deux oncogènes appartenant à des groupes différents : un oncogène cytoplasmique et un oncogène nucléaire (Weinberg et al., 1985 )

Récemment, nous avons réalisé au laboratoire une coopération entre une fusion d'oncogènes nucléaires et un autre oncogène nucléaire dans le système de CNR dans les mêmes conditions de culture (Amouyel et al., 1989). Nous avons montré que la protéine P135gag-myb-ets du virus E26 était capable de faire proliférer des CNR sans les transformer, et que le gène v-myc coopérait avec la P135gag-myb-ets pour transformer des CNR. Par contre, la fusion des oncogènes v-myb-ets n'était pas capable de coopérer avec l'oncogène v-mil.

#### OBJECTIF

En collaboration avec le groupe de Simon SAULE au laboratoire, nous avons voulu savoir si l'induction de la prolifération des CNR par la P135gag-myb-ets de E26 et sa coopération avec l'oncogène v-myc requieraient la présence des gènes v-myb-ets intacts ou simplement l'un de ces deux oncogènes (v-myb ou v-ets).



**Figure 30: Structure du provirus muté dans v-ets E26neo 4A**

Dans ce but, nous avons donc construit des mutants du virus E26 délétés soit dans la partie v-myb soit dans la partie v-ets de leur génome.

## **RESULTATS**

### **A) Construction et obtention des mutants de délétion**

Nous avons considéré le provirus E26 neo comme un virus E26 de type sauvage (cf RESULTATS 1<sup>ère</sup> PARTIE) et donc utilisé cet ADN proviral comme point de départ pour la construction des mutants. Deux types de provirus ont été construits ; soit des virus présentant une délétion dans le gène myb, soit un virus représentant une délétion de la majeure partie du gène ets.

La construction de la délétion dans le gène ets E26 neo4A a été réalisée par une digestion enzymatique partielle par l'enzyme de restriction PvuII (Figure 30). Le fragment délété, d'une taille de 1100 nucléotides couvre la majeure partie de v-ets. Il faut noter que les deux sites de coupure sont situés dans la même phase de lecture ; donc la délétion du fragment n'altère pas le cadre de lecture des séquences ets située en 3' du site de coupure. Ceci permet donc la détection par immunoprécipitation à l'aide de sérum anti-ets de la protéine codée par le mutant E26neo4A.

Pour réaliser les mutants de délétion dans le gène myb, nous avons dû utiliser la technique de mutation dirigée à l'aide d'oligonucléotides de synthèses pour deux raisons:

- afin de préserver le cadre de lecture des séquences ets situées en aval du gène myb et donc permettre leur expression.
- à cause de l'absence de sites de restriction permettant la réalisation simple des coupures adéquates.

La technique utilisée suit en grande partie le protocole décrit précédemment pour l'introduction de la mutation dirigée dans le virus AMV, avec cependant quelques modifications (Figure 31). En effet les oligonucléotides de synthèse sont complémentaires de deux régions qui sont situées de part et d'autre de la séquence à déléter. Au cours de l'appariement avec la matrice simple brin, il se créera donc une boucle correspondant exactement à la région qu'on désire éliminer. De plus, on veille à ce que certains nucléotides immédiatement en 5' et en 3' de la région à déléter constituent une séquence palindromique parfaite correspondant au site de coupure d'une enzyme de restriction. Pour vérifier la réussite de la délétion, on remplace l'étape fastidieuse de séquençage nucléotidique de chaque clone apparaissant comme correct après l'hybridation et les lavages

Oligonucléotide  
synthétisé

3' GGACCAGTCTAGAAATGGTTGTGTC 5'

ICTAGA  
Bgl II

Région à déléter

5' CCTGGTCAGATC  TTACCAACACAG 3'ICTAG

A

Hybridation de  
oligonucléotideICTAGA

Création d'un site Bgl II

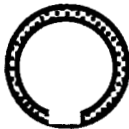
5' CCTGGTCAGATCTTACCAACACAG 3'  
3' GGACCAGTCTAGAAATGGTTGTGTC 5'

Figure 31: Stratégie d'obtention des mutants de délétion et exemple de création d'un nouveau site enzymatique.



successifs, par une simple digestion enzymatique démontrant l'existence du site de restriction prédit lors du choix de l'oligonucléotide (Figure 31).

Deux domaines du gène v-myb, un domaine à l'extrémité 5' de v-myb responsable de la fixation à l'ADN et une partie en 3' du gène sont conservés phylogénétiquement. En supposant que ces domaines conservés représentaient des régions critiques pour l'activité de la protéine myb, nous avons construit quatre ADN proviraux délétant respectivement ces régions (Figure 32A) :

- E26 neo Délétion A ou E26 neo D.A : 165 nucléotides conservés au cours de l'évolution et situés dans la partie 3' de v-myb ont été délétés (Figure 32B).

- E26 neo D.B : 130 nucléotides correspondant à la 1<sup>ère</sup> séquence répétée de v-myb, séquence impliquée dans la fixation à l'ADN, sont délétés (Figure 32C).

- E26 neo D.C : 75 nucléotides correspondant à la 2<sup>ème</sup> séquence répétée de v-myb sont délétés. La Thr 68 qui est mutée dans le gène myb du virus ts 143E26 est située dans cette région (Figure 32D).

- E26 neo D.D : une délétion de 303 nucléotides couvrant les deux parties conservées en 5' du gène v-myb (1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> séquences répétées ) a été effectuée (Figure 32E).

Les ADN proviraux ont été transfectés sur des fibroblastes de poulet qui ont ensuite été infectés par un virus auxiliaire, RAV-1, et cultivés en milieu de sélection contenant 400µg/ml de G418. Les surnageants de culture des fibroblastes résistant au G418 ont directement été utilisés pour infecter des cellules de neurorétine de poulet (CNR). Dans d'autres expériences les ADN ont été transfectés directement sur CNR.

#### B) Etude des capacités prolifératives des CNR infectées par les différents virus.

Le système de neurorétine de poulet est constitué de cellules prélevées dans l'oeil d'un embryon de poulet. 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*. Les cultures de CNR ainsi obtenues ont été infectées, par le surnageant de culture des fibroblastes transfectées par les différents mutants et sélectionnés.

Les résultats ont montré que le virus E26 neo D.B, D.C, D.D, qui avaient une délétion dans la partie 5' du gène v-myb, impliqué dans la fixation à l'ADN, ne pouvaient ni induire la

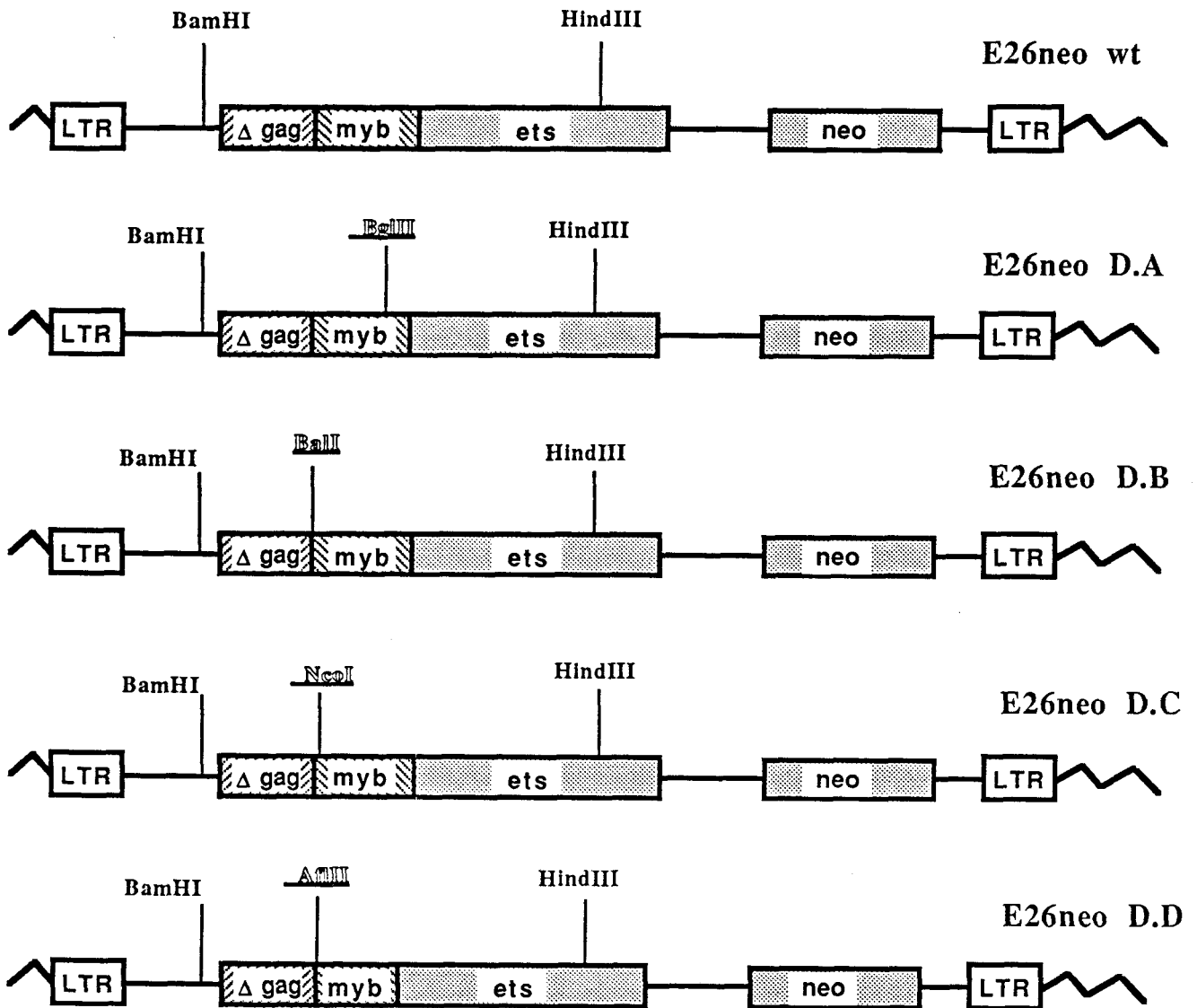


Figure 32A: Structure des provirus E26 mutés dans v-myb.

Oligonucléotide 3' ~~GGACCAGTCTAG~~ AATGGTTGTGTC 5'  
synthétisé

BglII

gag — myb

ATCACAAAGACTGGCTGATACGGTCAGAATAAGGGCTTGGGATCCCGGTGGCAGAAAGTATTAAACCCAGAACTTATCAAAGGTCCATGG  
IleThrArgLeuAlaAspThrValArgThrLysGlyLeuArgSerArgTrpGlnLysValLeuAsnProGluLeuIleLysGlyProTrp

ACTAAAGAGGAGGATCAAAGGGTAATAGAACTCGTGCAGAAATACGGTCCAAAGCGCTGGTCGGTCATTGCTAAGCATTGGAAGGGAAGG  
ThrLysGluGluAspGlnArgValIleGluLeuValGlnLysTyrGlyProLysArgTrpSerValIleAlaLysHisLeuLysGlyArg

ATTGGAAAACAGTGCAGGGAGAGGTGGCACAACCATCTGAATCCAGAAGTGAAGAAAACCTCCTGGACAGAAGAGGAAGATAGAATTATT  
IleGlyLysGlnCysArgGluArgTrpHisAsnHisLeuAsnProGluValLysLysThrSerTrpThrGluGluGluAspArgIleIle

TACCAGGCACACAAGAGACTGGGAAACAGATGGGCAGAAATTGCAAAGTTGCTGCCTGGACGGACTGATAACGCTATCAAGAACCCTGG  
TyrGlnAlaHisLysArgLeuGlyAsnArgTrpAlaGluIleAlaLysLeuLeuProGlyArgThrAspAsnAlaIleLysAsnHisTrp

AATTCCACCATGCGCCGGAAGGTGAGCAGGAGGGTTACCTGCAGGAGTCTCCAAAGCCGGCTGCCCTCGGCAACCACCGGCTTCCAG  
AsnSerThrMetArgArgLysValGluGlnGluGlyTyrLeuGlnGluSerSerLysAlaGlyLeuProSerAlaThrThrGlyPheGln

AAGAGCAGCCACCTGATGGCCTTTGCCACAACCCACCTGCAGGCCCGCTCCCGGGGGCCGCCAGGCCCGCTGGGCAGTGACTACCCC  
LysSerSerHisLeuMetAlaPheAlaHisAsnProProAlaGlyProLeuProGlyAlaGlyGlnAlaProLeuGlySerAspTyrPro

Nouveau site BglII

TACTACCACATTGCTGAGCCACAAAAATGTCCTGGTCAGATCCATATCCAGTAGCCACTGCATGTAAATATTGTCAATGTTCTCAGCCA  
TyrTyrHisIleAlaGluProGlnAsnValProGlyGlnIleProTyrProValAlaLeuHisValAsnIleValAsnValProGlnPro

3'GGACCAGTCTAG

GCTGCTGCAGCTATTCAAGACACTATAATGATGAAGACCTGAGAAAGAAAACGAATAAAGGAATTACAGTTGCTACTTATGTCGACT  
AlaAlaAlaAlaIleGlnArgHisTyrAsnAspGluAspProGluLysGluLysArgIleLysGluLeuGluLeuLeuLeuMetSerThr

GAGAATGAACGAAAGGGCAGCAGGCATTACCAACACAGAACCACACAGCAAACCTACCCCGGCTGGCACAGCACCACGGTTGCTGACAAT  
GluAsnGluLeuLysGlyGlnGlnAlaLeuProThrGlnAsnHisThrAlaAsnTyrProGlyTrpHisSerThrThrValAlaAspAsn

AATGGTTGTGTC 5'

myb — ets

ACCATGACCAGTGGTGACAATGCACCTGTTTCTGTTGGGGGAACATCACCACTGTACTCCATCTCCACCAGTGGATCATGGCACCTCA  
ThrMetThrSerGlyAspAsnAlaProValSerCysLeuGlyGluHisHisHisCysThrProSerProProValAspHisGlyThrSer

GAGATGATGAGTTACTACATGGACACAACCATGGCAGCAGGGTCTTATCCTTTGGCTCGCCCTGGAGTGATGCAAGGTGCTAGCAGC  
GluMetMetSerTyrTyrMetAspThrThrIleGlySerThrGlyProTyrProLeuAlaArgProGlyValMetGlnGlyAlaSerSer

TGCTGTGAGGACCCCTGGATGCCATGCAGGCTGCAGTCTGCCTGCTGCCCGCCAGGTCGTGTTGCCCGCCGTGGGATGAGGCGGCCATC  
CysCysGluAspProTrpMetProCysArgLeuGlnSerAlaCysCysProProArgSerCysCysProProTrpAspGluAlaAlaIle

CAGGAAGTTCCACTGGCCTGGAGCACTACAGCACAGACATGGAATGTGCAGATGTGCCTTTGTTA  
GlnGluValProThrGlyLeuGluHisTyrSerThrAspMetGluCysAlaAspValProLeuLeu

**Figure 32B: Une délétion dans la région conservée en 3' de v-myb: E26neo D.A.**

Oligonucléotide 3' TTTCCAGGTACCGGTCTTCACTTC 5'  
synthétisé

Bali

gag — myb

Nouveau site Bali

ATCACAAAGACTGGCTGATACGGTCAGAACTAAGGGCTTGCATCCCGGTGGCAGAAAGTATTAAACCCAGAACTTATCAAAGGTCCATGG  
IleThrArgLeuAlaAspThrValArgThrLysGlyLeuArgSerArgTrpGlnLysValLeuAsnProGluLeuIleLysGlyProTrp

3' TTTCCAGGTACC

ACTAAAGAGGAGGATCAAAGGGTAATAGAAGTCTGTCAGAAATACGGTCCAAAGCGCTGGTCGGTCAITGCTAAGCATTGAAGGGAAGG  
ThrLysGluGluAspGlnArgValIleGluLeuValGlnLysTyrGlyProLysArgTrpSerValIleAlaLysHisLeuLysGlyArg

ATTGGAAAACAGTGCAGCGAGAGGTGGCACAACCATCTCAATCCAGAAGTGAAGAAAACCTCCTGGACAGAAGAGGAAGATAGAATTATT  
IleGlyLysGlnCysArgGluArgTrpHisAsnHisLeuAsnProGluValLysLysThrSerTrpThrGluGluGluAspArgIleIle

GGTCTTCACTTC 5'

TACCAGGCACACAAGAGACTGGGAAACAGATGGGCAGAAATTGCAAAGTTGCTGCCTGGACGGACTGATAACGCTATCAAGAACCACTGG  
TyrGlnAlaHisLysArgLeuGlyAsnArgTrpAlaGluIleAlaLysLeuLeuProGlyArgThrAspAsnAlaIleLysAsnHisTrp

AATCCACCATGCGCCGAAGGTCGAGCAGGAGGTTACCTGCAGGAGTCTCCAAAGCCGGCCTGCCCTCGGCAACCACCGGCTTCCAG  
AsnSerThrMetArgArgLysValGluGlnGluGlyTyrLeuGlnGluSerSerLysAlaGlyLeuProSerAlaThrThrGlyPheGln

AAGAGCAGCCACCTGATGGCCTTTGCCACAACCCACCTGCAGGCCGCTCCCGGGGGCCGGCCAGGCCCGCTGGGCAGTGACTACCCC  
LysSerSerHisLeuMetAlaPheAlaHisAsnProProAlaGlyProLeuProGlyAlaGlyGlnAlaProLeuGlySerAspTyrPro

TACTACCACATTGCTGAGCCAAAAATGTCCCTGGTCAGATCCCATATCCAGTAGCACTGCATGTAAATATTGTCAATGTTCCCTCAGCCA  
TyrTyrHisIleAlaGluProGlnAsnValProGlyGlnIleProTyrProValAlaLeuHisValAsnIleValAsnValProGlnPro

GCTGCTGCAGCTATTCCAGAGACACTATAATGATGAAGACCCTGAGAAAGAAAAACGAATAAAGGAATTAGAGTTGCTACTTATGTGCGACT  
AlaAlaAlaAlaIleGlnArgHisTyrAsnAspGluAspProGluLysGluLysArgIleLysGluLeuGluLeuLeuLeuMetSerThr

GAGAATGAACTGAAAGGGCAGCAGGCATTACCAACACAGAACCACACAGCAAACCTACCCCGGCTGGCACAGCACCACGGTTGCTGACAAT  
GluAsnGluLeuLysGlyGlnGlnAlaLeuProThrGlnAsnHisThrAlaAsnTyrProGlyTrpHisSerThrThrValAlaAspAsn

myb — ets

ACCATGACCAGTGGTGACAATGCACCTGTTTCTGTTTGGGGAAACATCACCCTGTACTCCATCTCCACCAGTGGATCATGGCACCTCA  
ThrMetThrSerGlyAspAsnAlaProValSerCysLeuGlyGluHisHisHisCysThrProSerProProValAspHisGlyThrSer

GAGATGATGAGTTACTACATGGACACAACCATTTGGCAGCACGGGTCTTATCCTTTGGCTCGCCCTGGAGTGATGCAAGGTGCTAGCAGC  
GluMetMetSerTyrTyrMetAspThrThrIleGlySerThrGlyProTyrProLeuAlaArgProGlyValMetGlnGlyAlaSerSer

TGCTGTGAGGACCCCTGGATGCCATGCAGGCTGCAGTCTGCCTGCTGCCCGCCAGGTCGTGTTGCCCGCCGTGGGATGAGGCGGCCATC  
CysCysGluAspProTrpMetProCysArgLeuGlnSerAlaCysCysProProArgSerCysCysProProTrpAspGluAlaAlaIle

CAGGAAGTCCCACTGGCCTGGAGCACTACAGCACAGACATGGAATGTGCAGATGTGCCTTTGTTA  
GlnGluValProThrGlyLeuGluHisTyrSerThrAspMetGluCysAlaAspValProLeuLeu

**Figure 32C: Mutant de délétion dans la  
partie 5' de v-myb: E26neo D.B.**



Oligonucléotide 3' **TTGGGTCTTGAATTCAGCTCGTC** 5'  
 synthétisé

**AflIII**  
 gag ————— myb **Nouveau site AflIII**

ATCACAAGACTGGCTGATACGGTCAGAATAAGGGCTTGGCATCCCGGTGGCAGAAAGTATTAACCAGAACTTATCAAAGGTCCATGG  
 IleThrArgLeuAlaAspThrValArgThrLysGlyLeuArgSerArgTrpGlnLysValLeuAsnProGluLeuLysGlyProTrp

3'  
**TTGGGTCTTGA**

ACTAAAGAGGAGGATCAAAGGTAATAGAACTCGTCAGAAATACGGTCCAAAGCCGCTGGTCCGTCATTGCTAGCATTGGAAGGGAAGG  
 ThrLysGluGluAspGlnArgValIleGluLeuValGlnLysTyrGlyProLysArgTrpSerValIleAlaLysHisLeuLysGlyArg

ATTGAAAACAGTGCAGGGAGAGGCTGGCACAACCATCTGAATCCAGAAGTGAAGAAAACCTCCGACAGAGAGGAAGATAGAATTATT  
 IleGlyLysGlnCysArgGluArgTrpHisAsnHisLeuAsnProGluValLysLysThrSerTrpThrGluGluGluAspArgIleIle

TACCAGGCACACAAGAGACTGGGAAACAGATGGGCAGAAATTGCAAACTTGTGCTCCCTGGACCGACTGATAACGCTATCAAGAACCACCTGG  
 TyrGlnAlaHisLysArgLeuGlyAsnArgTrpAlaGluIleAlaLysLeuLeuProGlyArgThrAspAsnAlaIleLysAsnHisTrp

AATTCACCATGCGCCGGAAGGTCGAGCAGGAGGGTTACCTGCAGGAGTCTCCAAAGCCGGCTGCCCTCGGCAACCACGGCTTCCAG  
 AsnSerThrMetArgArgLysValGluGlnGluGlyTyrLeuGlnGluSerSerLysAlaGlyLeuProSerAlaThrThrGlyPheGln

**TTCCAGCTCGTC** 5'

AAGAGCAGCCACCTGATGGCCTTTGGCCACAACCCACCTGCAGGCCGCTCCCGGGGGCCGGCCAGGCCCCGCTGGGCAGTACTACCCC  
 LysSerSerHisLeuMetAlaPheAlaHisAsnProProAlaGlyProLeuProGlyAlaGlyGlnAlaProLeuGlySerAspTyrPro

TACTACCACATTGCTGAGCCACAAAATGTCCCTGGTCAGATCCCATATCCAGTAGCACTGCATGTAAATATTGTCAATGTTCTCAGCCA  
 TyrTyrHisIleAlaGluProGlnAsnValProGlyGlnIleProTyrProValAlaLeuHisValAsnIleValAsnValProGlnPro

GCTGCTGCAGCTATTCAGAGACACTATAATGATGAAGACCCTGAGAAAGAAAACGAATAAAGGAATTAGAGTTGCTACTTATGTCGACT  
 AlaAlaAlaAlaIleGlnArgHisTyrAsnAspGluAspProGluLysGluLysArgIleLysGluLeuGluLeuLeuLeuMetSerThr

GAGAATGAACTGAAAGGGCAGCAGGCATTACCAACACAGAACCACACAGCAAACCTACCCCGGCTGGCACAGCACCACGGTTGCTGACAAT  
 GluAsnGluLeuLysGlyGlnGlnAlaLeuProThrGlnAsnHisThrAlaAsnTyrProGlyTrpHisSerThrThrValAlaAspAsn

**myb** ↓ **ets**

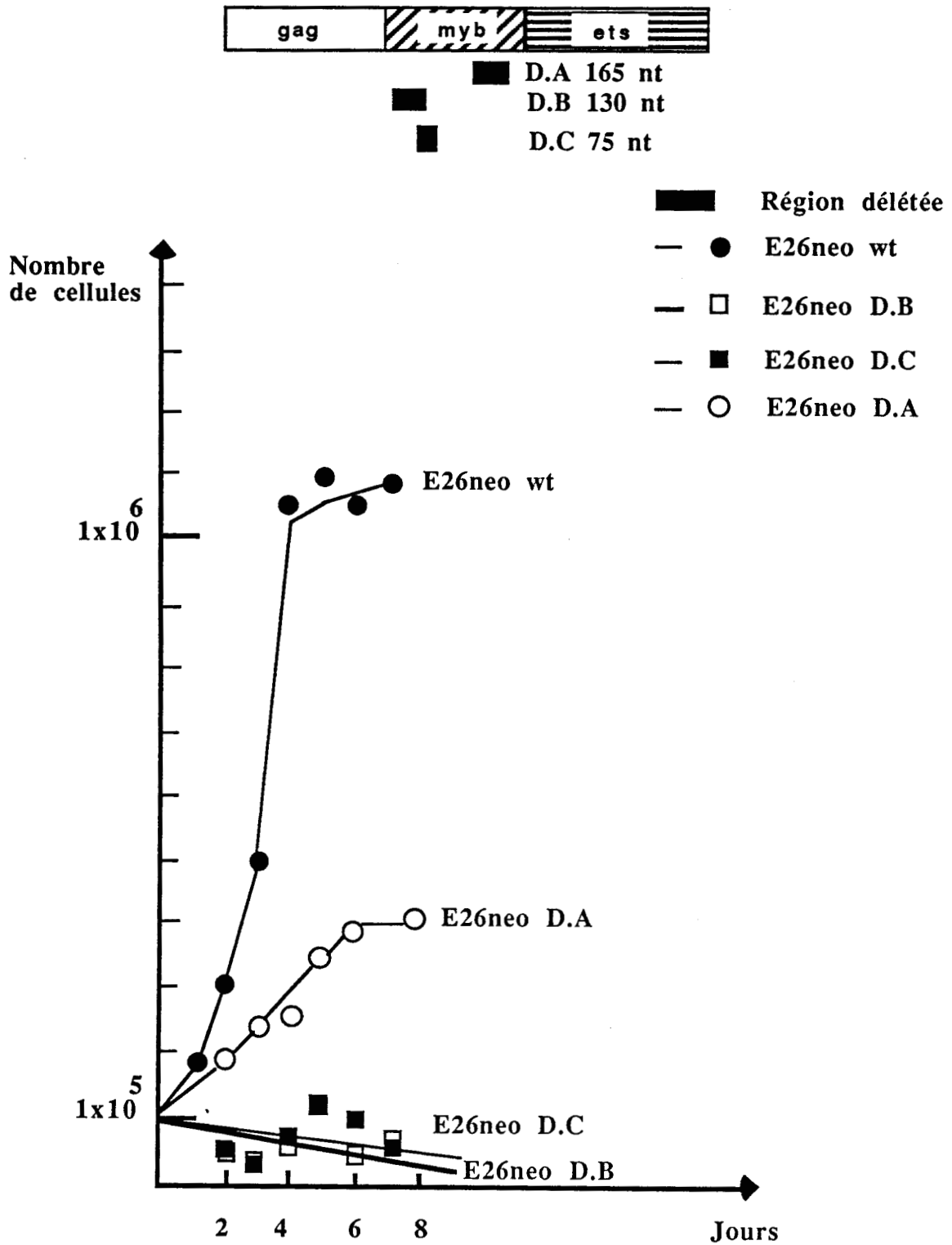
ACCATGACCAGTGGTGACAATGCACCTGTTTCTGTTTGGGGAAACATCACCCTGTACTCCATCTCCACCAGTGGATCATGGCACCTCA  
 ThrMetThrSerGlyAspAsnAlaProValSerCysLeuGlyGluHisHisHisCysThrProSerProProValAspHisGlyThrSer

GAGATGATGAGTTACTACATGGACACAACCATTTGGCAGCACGGTCTTTATCCTTTGGCTCGCCCTGGAGTGATGCAAGGTGCTAGCAGC  
 GluMetMetSerTyrTyrMetAspThrThrIleGlySerThrGlyProTyrProLeuAlaArgProGlyValMetGlnGlyAlaSerSer

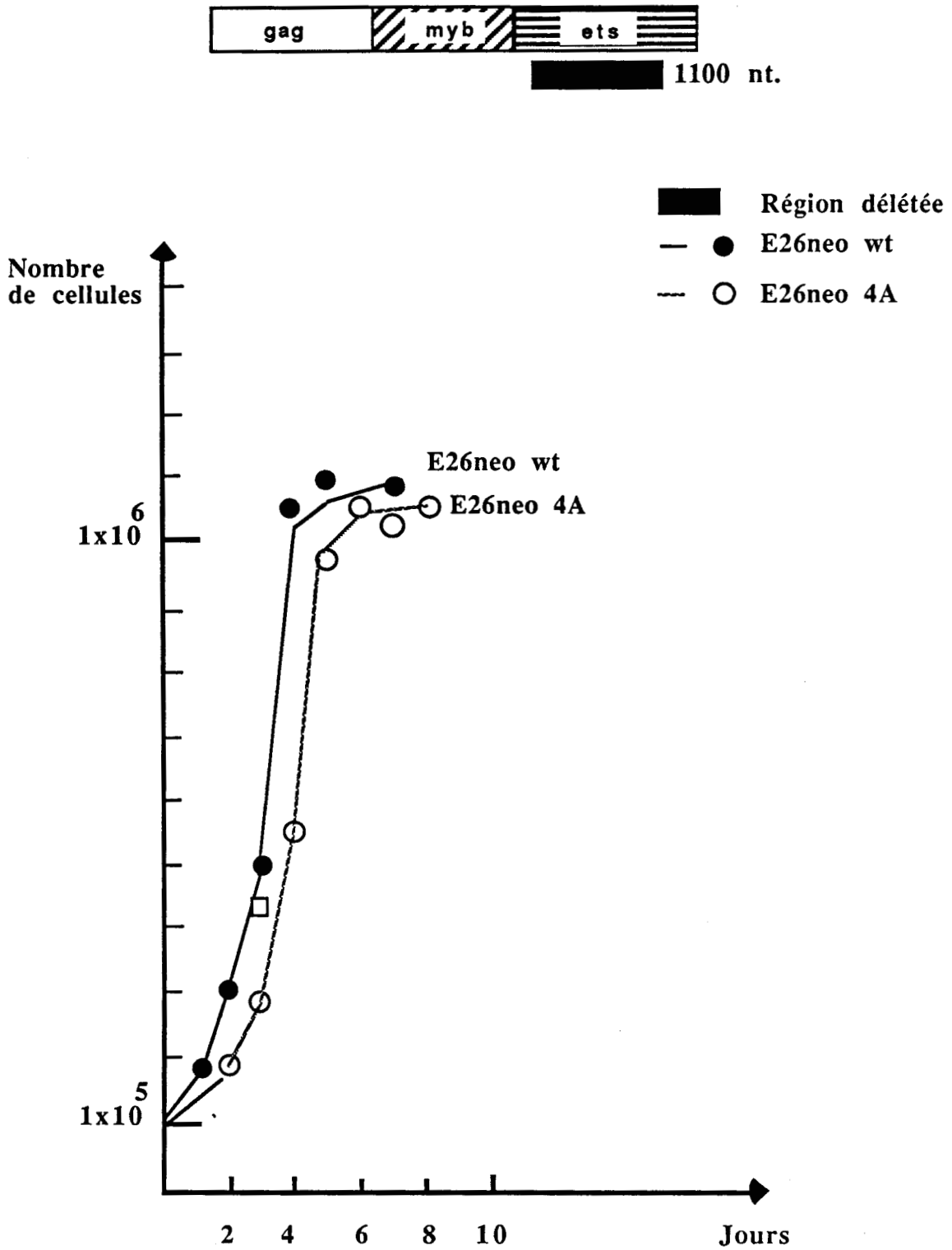
TGCTGTGAGGACCCCTGGATGCCATGCAGGCTGCAGTCTGCCTGCTGCCCGCCAGGTGCTGTTGCCCGCGTGGGATGAGGCGGCCATC  
 CysCysGluAspProTrpMetProCysArgLeuGlnSerAlaCysCysProProArgSerCysCysProProTrpAspGluAlaAlaIle

CAGGAAGTTCCTACTGGCCTGGAGCACTACAGCACAGACATGGAATGTGCAGATGTGCCTTTGTTA  
 GlnGluValProThrGlyLeuGluHisTyrSerThrAspMetGluCysAlaAspValProLeuLeu

**Figure 32E: Mutant de délétion dans la  
 partie 5' de v-myb: E26neo D.D.**



**Figure 33: Courbe de croissance de CNR infectées par des mutants de délétion de E26 dans la partie 5' ou 3' du gène myb**



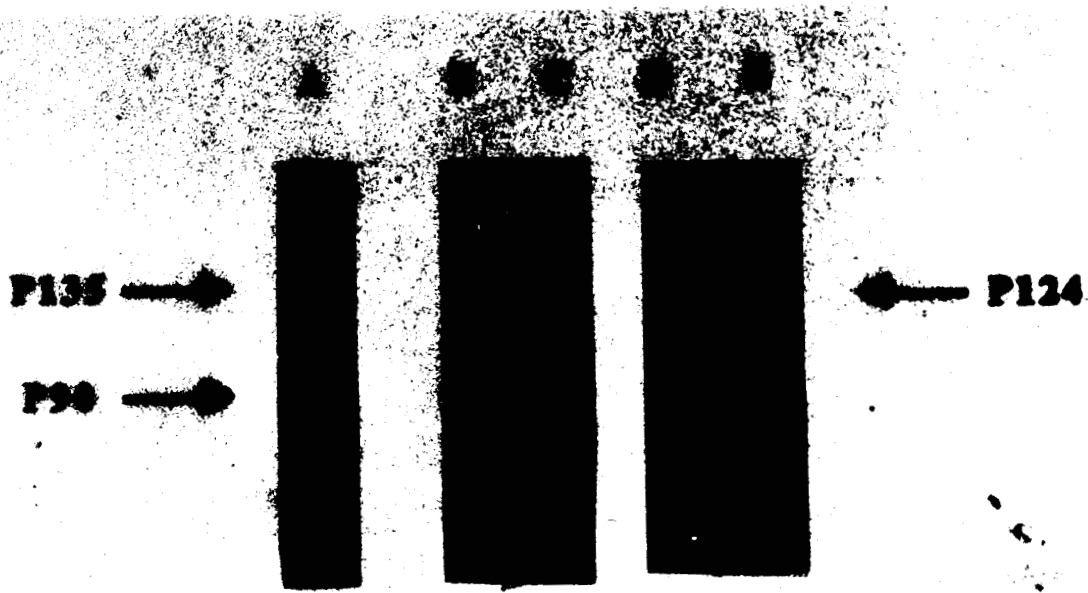
**Figure 34: Courbe de croissance de CNR infectés par un mutant E26 de délétion dans le gène ets**



prolifération ni transformer les CNR. La figure 33 nous montre des courbes de croissance des CNR infectées par ces virus. Alors que les CNR infectées par E26 proliféraient rapidement, les CNR infectés par ces mutants ne proliféraient absolument pas.

Par contre, les virus E26 neo D.A et 4A faisaient proliférer les CNR sans les transformer c'est à dire que les CNR infectées par ces virus pouvaient passer une vingtaine de divisions mais ne pouvaient pousser en milieu solide (agar). Mais, l'élimination du domaine conservé en 3' de v-myb a une incidence sur la vitesse et l'efficacité de prolifération des CNR infectées par E26 neo D.A, par rapport à celles infectées par le virus wt E26 neo et E26 neo 4A qui contiennent un gène myb complet (Figure 34).

La figure 35 nous montre les protéines correspondantes produites dans les CNR infectées. Le virus E26 neo D.A donne une protéine de 124 Kd détectée par les anticorps anti myb et anti-ets. Le virus E26 neo 4A donne une protéine de 90 Kd en utilisant les anticorps anti myb et anti ets ; la bande détectée par l'anticorps anti ets est plus faible par rapport à celle détectée par l'anticorps anti myb, puisque la majeure partie du gène ets reconnue par le sérum utilisé a été amputée.



(A) contrôle P135 <sup>gag-myb-ets</sup> dans des myéloblastes (sérum anti-ets)

(B,C) E26neo 4A

(D,E) E26neo D.A

(B,D) sérum anti-myb

(C,E) sérum anti-ets

**Figure 35: Immunoprécipitation de CNR infectées par des mutants de délétion E26: E26neo 4A et E26neo D.A.**

## **DISCUSSION ET CONCLUSION**

## DISCUSSION ET CONCLUSION

La substitution d'une Thréonine par une Arginine en position 68 dans le domaine phylogénétiquement conservé et impliqué dans la fixation à l'ADN des protéines myb engendre le phénotype de transformation thermosensible des cellules myéloïdes infectées par le mutant ts 143 E26.

Nous avons déterminé dans ce travail la séquence nucléotidique de l'oncogène v-myb d'un mutant du virus E26, ts143E26, thermosensible pour la transformation myéloïde uniquement. La comparaison de cette séquence avec celle de l'oncogène v-myb d'un virus E26 de type sauvage nous a permis de mettre en évidence deux changements dans la structure primaire des protéines correspondantes. Une mutation dans laquelle une Thréonine est remplacée par une Arginine se localise en position 68 dans le domaine aminoterminal de la protéine myb. Ce domaine a été très conservé au cours de l'évolution des protéines myb et a été impliqué dans la fixation à l'ADN. L'autre mutation en position 254 dans laquelle un acide aspartique est remplacé par un acide glutamique se localise dans un domaine peu conservé dans l'évolution des protéines myb.

La fonction d'une protéine est fortement associée à sa structure tridimensionnelle elle-même imposée par sa structure primaire. Non seulement la mutation en position 68 est située dans un domaine clairement défini comme important pour la fonction des protéines myb, mais de plus cette mutation change à la fois la taille et la nature biochimique de la chaîne latérale de l'acide-amino. En effet, la Thréonine présente dans le virus E26 de type sauvage a une petite chaîne latérale faiblement acide alors que l'Arginine présente dans le ts143 E26 a une grande chaîne latérale, chargée positivement. De plus, cette charge positive est stabilisée par résonance. Donc la taille et la charge de la chaîne latérale pourrait affecter le repliement de la protéine P135gag-myb-ets et/ou sa fixation à l'ADN à la température non-permissive. Cependant, des analyses conformationnelles prédisent que cette région pourrait faire partie d'une structure de type " $\beta$  turn" suivie d'une hélice  $\alpha$  aussi bien dans la protéine de type sauvage que dans la protéine du ts143 E26. Le résidu Arginine chargé positivement se trouve à proximité de trois résidus glutamiques chargés négativement, ce qui pourrait modifier des interactions ioniques, importantes pour la structure secondaire de la protéine entre ces trois résidus glutamiques et une séquence d'acides aminés chargée positivement.

De plus, la position 68 est précédée par l'un des résidus tryptophanes organisés en triplet répétés. La charge positive de l'Arginine en position 68 pourrait donc empêcher à la température non-permissive, la structure correcte de la protéine permettant l'interaction entre ce motif de Tryptophanes répétés et l'ADN.

Une autre hypothèse permettant d'expliquer l'importance de la mutation 68 dans l'induction du phénotype thermosensible fait appel à des mécanismes de phosphorylation. En effet, la

Thréonine 68 qui est suivie d'acides aminés à chaîne latérale acide (3 Acides Glutamique et 1 Acide Aspartique) pourrait être phosphorylée par la caséine Kinase de type II (CK-II). Cependant, des expériences réalisées récemment au laboratoire ont montré que la P135gag-myb-ets d'un virus E26 de type sauvage n'était pas phosphorylée par la caséine Kinase II (Jacques GHYSDAEL, communication personnelle) et permettent donc d'écarter cette hypothèse.

Il faut cependant noter que de nombreuses protéines nucléaires impliquées dans la prolifération cellulaire (Myc, Myb, Fos, E1A et l'antigène T) possèdent des sites potentiels de phosphorylation par la CK-II. Ceci a été démontré récemment pour les protéines Myc (Lüscher et al. 1989) et Myb, probablement dans une région de la protéine non transduite dans les virus AMV et E26 (Lüscher et al. en préparation).

Dans l'avenir, nous envisageons de poursuivre notre travail par la construction d'autres mutants en position 68 du gène myb de E26 notamment:

- \* un mutant où une Lysine sera introduite en position 68. La Lysine est un acide aminé possédant également une longue chaîne latérale chargée.

- \* un mutant où une Méthionine sera introduite en position 68. La Méthionine est un acide aminé possédant une longue chaîne latérale mais non chargée.

La caractérisation des cellules myéloïdes transformées à 37°C et 42°C par ces virus devrait nous permettre de confirmer ou d'infirmer l'hypothèse selon laquelle un encombrement stérique et/ou l'introduction d'une charge positive en position 68 du gène myb confère un phénotype thermosensible au virus E26.

Nous avons particulièrement insisté sur la mutation en position 68 et négligé la mutation chimiquement conservative (Acide Aspartique versus Acide Glutamique) située en position 254 dans une région peu conservée.

Cette mutation en position 254 pourrait jouer un rôle mineur dans la croissance des cellules myéloïdes transformées par ts143 E26 ou dans l'habilité de ces cellules à se différencier de façon terminale après culture à 42°C. Cependant, cette mutation ne joue pas un rôle essentiel dans l'induction du phénotype thermosensible puisque:

- \* l'introduction de la mutation Arginine en position 68 dans un virus E26 de type sauvage est suffisante pour le convertir en virus thermosensible pour la transformation myéloïde (ce mémoire).

- \* la même mutation en position 68 et elle seule a été mise en évidence dans un autre isolat indépendant de virus E26 thermosensible pour la transformation myéloïde, ts21 E26 (Frykberg et al., 1988).

### **La mutation Thr--->Arg serait létale pour la transformation des cellules myéloïdes par le virus AMV.**

Nous avons introduit la mutation située dans le domaine aminoterminal du gène myb, du virus ts143 E26 dans l'allèle apparenté, mais distinct, du gène myb présent dans le virus AMV.

Le but de cette expérience était l'obtention d'un mutant conditionnel et fonctionnel du virus AMV. En effet un tel mutant n'existe pas. Le mutant GA907/7 d'AMV obtenu par Moscovici et al. (1985) serait plutôt un mutant d'épissage ou de déstabilisation d'ARN qu'un mutant fonctionnel de la protéine, puisqu'à la température non-permissive, on observe une diminution drastique du taux d'ARN messenger sous génomique v-myb.

Ce type de stratégie s'était révélé efficace dans le cas d'oncogènes de la famille des tyrosine kinases: une mutation trouvée dans le gène v-src d'un mutant thermosensible et réintroduite par mutation dirigée dans le gène apparenté v-abl conférait au virus Abelson-MuLV un phénotype thermosensible (Engelman et Rosenberg, 1987).

Le virus Pneo AMV Arg présentant une mutation analogue à celles du ts143 E26 apparaît comme incapable de transformer les cellules myéloïdes.

Bien qu'un résultat négatif soit toujours délicat à interpréter, nous pensons que les conditions utilisées dans nos expériences tant au niveau du titre viral (coculture des cellules hématopoïétiques avec des fibroblastes transfectés et sélectionnés) qu'au niveau du milieu de culture (milieu riche contenant 1% de cMGF, facteur de croissance permettant la prolifération des cellules myéloïdes) auraient dû permettre la mise en évidence de cellules transformées *in vitro* par le virus Pneo AMV Arg.

L'analyse du phénotype des cellules myéloïdes transformées par le recombinant, exprimant à la fois la protéine P110gag-myc de MC29 et la p45<sup>v-myb</sup> portant la mutation Arginine, devrait permettre de confirmer ou d'infirmer ce résultat négatif.

Bien que ce résultat soit décevant (nous n'avons pas généré un mutant thermosensible d'AMV), il est cependant en accord avec les données précédemment publiées. En effet, les cellules myéloïdes transformées par E26 après infection de cellules de moelle osseuse sont bloquées de façon beaucoup plus stricte que les cellules myéloïdes transformées par AMV, comme le prouve le comportement différent de ces cellules après traitement aux esters de Phorbol (TPA).

En utilisant une formule simplificatrice quelque peu outrancière, on pourrait dire que la p45<sup>v-myb</sup> est "moins transformante" pour les cellules myéloïdes que la protéine P135gag-myb-ets. Il apparaît donc logique qu'un mutant perturbant l'architecture tridimensionnelle de la P135gag-myb-ets rende l'activité de fixation à l'ADN, et par voie de conséquence, la transformation myéloïde sensible à la température et que la même mutation introduite dans la protéine moins "transformante" d'AMV empêche cette transformation même à 37°C.

#### Les cellules de neurorétine de poulet (CNR): un système de choix pour étudier l'oncogène v-myb

Le groupe de Simon Saule au laboratoire a montré que le virus E26 stimulait la prolifération des CNR (Amouyel et al., in press). Nous avons pu montrer que cette activité était principalement

due au domaine myb de la protéine de fusion P135gag-myb-ets. En effet le mutant E26 neo 4A amputé de la majeure partie de v-ets est capable de faire proliférer les CNR de façon comparable à un virus E26 de type sauvage. De plus, le domaine aminoterminal impliqué dans la fixation à l'ADN des protéines myb est requis pour l'induction de la prolifération des neurorétines comme la démontre les expériences réalisées avec mutants de délétion E26 D.B et D.D.

Ces résultats ne constituent pas uniquement une confirmation de résultats similaires, obtenus par le groupe de Lipsick qui a étudié l'effet de mutation de délétion dans l'oncogène v-myb d'AMV sur la transformation des cellules myéloïdes (Ibanez et al. 1987).

En effet, les cellules de neurorétines pourraient être un système biologique permettant d'analyser plus finement l'effet de délétion dans l'oncogène myb que les cultures de cellules hématopoïétiques. Nous avons deux types d'arguments pour étayer ces hypothèses:

\* le mutant de délétion E26neo D.A, où une partie phylogénétiquement conservée en 3' du gène v-myb a été délétée, stimule en prolifération des CNR de façon certes réduite par rapport à E26 mais néanmoins significative. Par contre, ce mutant s'est avéré incapable dans nos mains de transformer *in vitro* des cellules myéloïdes.

\* le mutant de Pneo AMV Arg, négatif pour la transformation myéloïde fait proliférer les cellules de neurorétine de façon similaire à celle d'un AMV de type sauvage à 37°C comme à 42°C. Donc des mutants dans le gène myb négatifs pour la transformation myéloïde peuvent être en fait classés en mutant capable de faire proliférer les cellules de neurorétine (ex: Pneo AMV Arg, E26neo D.A) et en mutant incapable de le faire (ex E26neo D.B et D.C).

L'analyse des propriétés de mutants de E26 dans différents systèmes biologiques - transformation des cellules hématopoïétiques, prolifération des cellules de neurorétine, effet mitogène sur les fibroblastes...et d'autres encore à découvrir! - permettrons sans doute d'éclaircir le rôle exact des oncogènes myb et ets dans le vaste spectre d'effets biologiques de ce virus ô combien complexe.

## **BIBLIOGRAPHIE**



- ADKINS,B., A.LEUTZ and T.GRAF. (1984). Autocrine growth induced by src-related oncogenes in transformed chicken myeloid cells.  
Cell 39 : 439-445.
- ALBERTS,B., D.BRAY, J.LEWIS, M.RAFF, K.ROBERTS and J.D.WATSON. (1983).  
Molecular Biology of the Cell.  
Eds Garland Publishing Inc. New York. pp 918-928.
- ALITALO,K., M.SCHWAB, C.C.LIN, H.E.VARMUS and J.M.BISHOP. (1983a).  
Homogeneously staining chromosomal regions contain amplified copies of an abundantly expressed cellular oncogene (c-myc) in malignant neuroendocrine cells from a human colon carcinoma.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 : 1707-1711.
- ALITALO,K., G.RAMSAY, J.M.BISHOP, S.OHLSSON-PFEIFER,W.W.COLBY and A.D.LEVINSON (1983b) Identification of nuclear proteins encoded by viral and cellular myc oncogenes.  
Nature 306 : 274-277.
- ALITALO,K., R.WINQUIST, C.C.LIN, A. de la CHAPELLE, M.SCHWAB and J.M.BISHOP. (1984). Aberrant expression of an amplified c-myb oncogene in two cell lines from a colon carcinoma .  
Proc. Natl. Acad. Sci.USA 81 : 4534-4538.
- AMOUYEL,P., V.LAUDET, P.MARTIN, R.LI, B.QUATANNENS, D.STEHELIN and S.SAULE.(1989) Two nuclear oncogenic proteins, P135gag-myb-ets and p61/63<sup>myc</sup> cooperate to induce transformation of chicken neuroretina cells.  
J. Virol. (In press).
- ANTON,I.A. and J.FRAMPTON. (1988). Tryptophans in myb proteins.  
Nature 336 : 719.
- BADING,H., J.HANSEN and K.MOELLING. (1987). Selective DNA binding of the human cellular myc protein isolated by immunoaffinity chromatography using a monoclonal antibody.  
Oncogene 1 : 395-401.
- BALTIMORE,D. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumor viruses.  
Nature 226 : 1209-1211.
- BARGMANN,C.I., M.C.HUNG and R.A.WEINBERG. (1986). Multiple independent activations of the neu oncogene by a point mutation altering the transmembrane domain of P185.  
Cell 45 : 649-657.
- BARKAS,A.E., D.BRODEUR and E.STAVNEZER. (1986). Polyproteins containing a domain encoded by the v-ski oncogene are located in the nuclei of skv-transformed cells.  
Virology 151 : 131-138.
- BARLETTA,C., P.G.PELICCI, L.C.KENYON, S.D.SMITH and R.DALLA-FAVERA. (1987). Relationship between the c-myb locus and the 6q-chromosomal aberration in leukemias and lymphomas.  
Science 235 : 1064-1067.
- BEARD,J. (1963). Avian virus growths and their etiological agents.  
Adv. Cancer Res. 7 : 1-127.

- BECHADE,C., G.CALOTHY, B.PESSAC, P.MARTIN, J.COLL, F.DENZEZ, S.SAULE, J.GHYSDAEL and D.STEHELIN. (1985). Induction of proliferation or transformation of neuroretina cells by the mil and myc viral oncogenes.  
Nature 316 : 559-562.
- BECKNER,S.K., S.HATTORI and T.Y.SHIH. (1985). The ras oncogene product p21 is not a regulatory component of adenylate cyclase.  
Nature 317 : 71-72.
- BENDER,T. and W.M.KUEHL. (1986). Murine myb protooncogene mRNA : cDNA sequence and evidence for 5' heterogeneity.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 : 3204-3208.
- BEN-NERIAH,Y., A.BERNARDS, M.PASKING, G.Q.DALEY and D.BALTIMORE. (1986). Alternative 5' exons in c-abl mRNA.  
Cell 44 : 577-586.
- BERGER,R. and A.BERNHEIM. (1985). Cytogenetics of Burkitt's lymphoma-leukemia : a review in Burkitt's lymphoma (G.LENOIR, G.O'CONOR and C.L.MOLWENY, eds). IARC Scientific publications N° 60 pp 65-80.
- BERNHEIM,A., R.BERGER and G.LENOIR. (1981). Cytogenetic studies on African Burkitt's lymphoma cell lines t (8;14),t (2;8) and t (8;22) translocations.  
Cancer Genet. Cytogenet 3 : 307-315.
- BEUG,H., von KIRCHBACH, A, DODERLEIN, G., CONSCIENCE,J.F. and GRAF,T. (1979). Chicken hematopoietic cells transformed by seven strains of defective avian leukemia viruses display three distinct phenotypes of differentiation.  
Cell 18 : 375-390.
- BEUG,H., S.PALMIERI, C.FREUDENSTEIN, H.ZEUTGRAF and T.GRAF. (1982a). Hormone-dependent terminal differentiation in vitro of chicken erythroblastosis cells transformed by ts mutants of avian erythroblastosis virus.  
Cell 28 : 907-919.
- BEUG,H., M.J.HAYMAN and T.GRAF. (1982b). Myeloblasts transformed by the avian acute leukemia virus E26 are hormone-dependent for growth and for the expression of a putative myb-containing protein P135<sup>E26</sup>.  
EMBO J. 1 : 1069-1073.
- BEUG,H., A.LEUTZ, P.KAHN, and T.GRAF. (1984). Ts mutants of E26 leukemia virus allow transformed myeloblasts, but not erythroblasts or fibroblasts, to differentiate at the nonpermissive temperature.  
Cell 39 : 579-588.
- BEUG,H. and M.J.HAYMAN. (1984). Temperature-sensitive mutants of avian erythroblastosis virus : surface expression of the erbB product correlates with transformation.  
Cell 36 : 963-972.
- BHAT,N.K., R.J.FISHER, S.FUJIWARA, R.ASCIONE and T.S.PAPAS. (1987). Temporal and tissue-specific expression of mouse ets genes.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 : 3161-3165.
- BIEDENKAPP,H., U.BORGMEYER, A.E.SIPPEL and K.H.KLEMPNAUER. (1988). Viral myb oncogene encodes a sequence-specific DNA-binding activity.  
Nature 335 : 835-837.

- BIRCHMEIER,C., D.BIRNBAUM, G.WAITCHES, O.FASANO and M.WIGLER. (1986). Characterization of an activated human ros gene. *Mol. Cell. Biol.* **6** : 3109-3116.
- BOETTIGER,D. and E.DURBAN. (1984). Target cells for avian myeloblastosis virus in embryonic yolk sac and relationship of cell differentiation to cell transformation. *Journal of Virology* **49** : 841-847.
- BOHMANN,D., T.J.BOS, A.ADMON, T.NISHIMURA, P.K.VOGT and R.TJLAN. (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.
- BOS,T.J., D.BOHMANN, H.TSUCHIE, R.TJIAN and P.K.VOGT. (1988). v-jun encodes a nuclear protein with enhancer binding properties of AP-1. *Cell* **52** : 705-712.
- BOULUKOS,K., 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.
- BOYLE,W.J., J.S.LIPSICK, E.P.REDDY and M.A.BALUDA. (1983). Identification of the leukemogenic protein of avian myeloblastosis virus and of its normal cellular homologue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80** : 2834-2838.
- BROWNING,P.J., H.F.BUNN, A.CLIN, M.SHUMAN and A.W.NEINHUIS. (1986). "Replacement" of COOH-terminal truncation of v-fms with c-fms sequences markedly reduces transformation potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83** : 7800-7804.
- BURGESS,A.W. and N.A.NICOLA. (1983). *Growth Factors and Stem Cells*, pp 93-124.
- CAIRNS,J. (1975). Mutation selection and the natural history of cancer. *Nature* **255** : 197-200.
- CANAANI.E., DREAZEN, A.KLAR, G.RECHAVI, D.RAM, J.B.COHEN and D.GIVOL. (1983). Activation of the c-mos oncogene in a mouse plasmocytoma by insertion of an endogenous intracisternal A-particle genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80** : 7118-7122.
- CHEN,J.H. (1980). Expression of endogenous avian myeloblastosis virus information in different chicken cells. *J.Virol.* **36** : 162-170.
- CHEN,J.H. (1985). The proto-oncogene c-ets is preferentially expressed in lymphoid cells. *Mol. Cell. Biol.* **5** : 2993-3000
- 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. USA* **82** : 7284-7288.
- CLARK,S.C. and R.KAMEN. (1987). The human hematopoietic colony-stimulating factors. *Science* **236** : 1229-1236.

- CLARKE, M.F., J.F.KUKOWSKA-LATALLO, E.WESTIN, M.SMITH and E.V.PROCHOWNIK. (1988). Constitutive expression of a c-myb cDNA blocks friend murine erythroleukemia cell differentiation.  
Mol. Cell. Biol. **8** : 884-892.
- CLINE, M.J. and D.W.GOLDE. (1979). Cellular interaction in haematopoiesis.  
Nature **277** : 177-181.
- COLL, J., M.RIGHI, C.de TAISNE, C.DISSOUS, A.GEGONNE and D.STEHELIN. (1983a). Molecular cloning of the avian acute transforming retrovirus MH2 reveals a novel cell-derived sequence v-mil in addition to the myc oncogene.  
EMBO J. **2** : 2189-2194
- COLL, J., S.SAULE, P.MARTIN, M.B.RAES, C.LAGROU, T.GRAF, H.BEUG, I.E.SIMON and D.STEHELIN. (1983b). The cellular oncogenes c-myc, c-myb and c-erb are transcribed in defined types of avian hematopoietic cells.  
Exp. Cell. Res. **149** : 151-162.
- 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. USA **80** : 4813-4817.
- COOK, W.D., D.METCALF, N.A.NICOLA, A.W.BURGESS and F.WALKER. (1985). Malignant transformation of a growth factor-dependent myeloid cell line by Abelson virus without evidence of an autocrine mechanism.  
Cell **41** : 677-683.
- COOPER, C.S., M.PARK, D.G.BLAIR, M.A.TAINSKY, K.HUCHNER, C.M.CROCE and G.F.van de WOOD. (1984). Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed human cell line.  
Nature **311** : 29-33.
- CORCORAN, L.M., J.M.ADAMS, A.R.DUNN and S.CORY. (1984). Murine T lymphomas in which the cellular myc oncogene has been activated by retroviral insertion.  
Cell **37** : 113-122.
- COUSSENS, L., C. van BEVEREN, D.SMITH, E.CHEN, R.L.MITCHELL, C.M.ISACKE, I.M.VERMA and A.ULLRICH. (1986). Structural alteration of viral homologue of receptor proto-oncogene fms at carboxyl terminus.  
Nature **326** : 277-280.
- CRAIG, R.W. and A.BLOCH. (1984).  
Cancer Res. **44** : 442-446.
- CROCE, C.J., J.ERICKSON, A.AR-RUSHDI, D.ADEN and K.NISHIKURA. (1984). Translocated c-myc oncogene of Burkitt's lymphoma is transcribed in plasma cells and repressed in lymphoblastoid cell.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81** : 3170-3174.
- CURRAN, T., A.D.MILLER, L.ZOKAS and J.M.VERMA. (1984). Viral and cellular fos proteins : A comparative analysis.  
Cell **36** : 259-268.

- CUYPERS, H.T., G.SELTEN, W.QUINT, M.ZIFLSTRA, E.R.MAANDAG, W.BOELENS, P.van WEZENBEEK, C.MELIEF and A.BERNS. (1984). Murine leukemia virus-induced T-cell lymphomagenesis integration of proviruses in a distinct chromosomal region.  
*Cell* **37** : 141-150.
- DANI,C., J.M.BLANCHARD, M.PIECHACZYK, S.El SABOUTY, L.MARTY and P.JEANTEUR. (1984). Extreme instability of c-myc mRNA in normal and transformed cells.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81** : 7046-7050.
- De KLEIN,A., Van WESSEL,A.D., GROSSVEL,G., BARTRAM,C.R., HAGEGEMYER,A., BOOTSMA,B., SPURR,N.K., HEISTERKAMP,N., GROFFEN,J., STEPHENSON,J.R. (1982). A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukemia.  
*Nature* **300** : 765-767.
- DENHEZ,F., B.HEIMANN, L.d'AURIOL, M.COQUILLAUD, J.COLL, T.GRAF, F. GALIBERT, K.MOELLING, D.STEHELIN and J.GHYSDAEL. (1988). Replacement of Lys 622 in the ATP binding domain of p100gag-mil abolishes the in vitro autophosphorylation of the protein and the biological properties of the v-mil oncogene of MH2 virus.  
*EMBO* **7** : 541-546.
- De TAISNE,C. A.GEGONNE, D.STEHELIN, A.BERHNEIM and R.BERGER. (1984). Chromosomal localization of the human proto-oncogene c-ets 11q23-q24.  
*Nature* **310** : 581-583.
- DER,J.C., T.C. KRONTIRIS and G.M. COOPER. (1982). Transforming gene of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79** : 3637-3640.
- DIAZ,M.O., M. LE BEAU, P. PITHA and J.D. ROWLEY. (1986). Interferon and c-ets-1 genes in the translocation (9;11) (p22;q23) in human acute monocytic leukemia.  
*Science* **231** : 265-267.
- 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** : 262-266.
- DOZIER,C., S.WALBAUM, D.LEPRINCE. (1986). EcoRI RFLP linked to the human myb gene.  
*Nucleic Acids Research* **14** : 1928.
- DOWNWARD,J., Y.YARDEN, E.MAYES, G.SCRACE, N.TOTTY, P.STOCKWELL, A.ULLRICH, J.SCHLESSINGER and M.D.WATERFIELD. (1984). Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erbB oncogene protein sequences.  
*Nature* **307** : 521-525.
- DRABKIN,H.A., C.BRADLEY, I.HART, J.BLESKAN, F.P.LI and D.PATTERSON. (1985). Translocation of c-myc in the hereditary renal cell carcinoma associated with a t (3;8) (p14.2;q24.13) chromosomal translocation.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82** : 6980-6984.
- DUESBERG,P.H., and P.K.VOGT. (1970). Differences between the ribonucleic acids of transforming and nontransforming avian tumor viruses.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **67** : 1673.

- DUESBERG, P.H., K.BISTER and C.MOSCOVICI. (1980). Genetic structure of avian myeloblastosis virus, released from transformed myeloblasts as a defective virus particle. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **77** : 5120-5124.
- DUPREY, S.P. and D.BOETTIGER. (1985). Developmental regulation of c-myb in normal myeloid progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82** : 6937-6941.
- DUTERQUE-COQUILLAUD, M., D.LEPRINCE, A.FLOURENS, C.HENRY, J.GHYSDAEL, B.DEBUIRE and D.STEHELIN. (1988). Cloning and expression of chicken p54<sup>c-ets</sup> cDNAs : the first p54<sup>c-ets</sup> coding exon is located into the 40.0 kbp genomic domain unrelated to v-ets. *Oncogene Research* **2** : 335-344.
- ENGELMAN A. and N.ROSENBERG. (1987). Isolation of temperature-sensitive Abelson virus mutants by site-directed mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84** : 8021-8025.
- EVA, A. and S.A.AARONSON. (1985). Isolation of a new human oncogene from a diffuse B-cell lymphoma. *Nature* **316** : 273-275.
- EVAN, G.E. and D.C.HANCOCK. (1985). Studies on the interaction of the human c-myc protein with cell nuclei : p62<sup>c-myc</sup> as a member of a discrete subset of nuclear proteins. *Cell* **43** : 253-261.
- FASANO, O., D.BIRNBAUM, L.EDLUND, J.FOGH and M.WIGLER. (1984a). New human transforming genes detected by a tumorigenicity assay. *Mol. Cell. Biol.* **4** : 1695-1705.
- FASANO, O., T.ALDRICH, F.TAMANOI, E.TAPAROWSKYQ, M.FURTH and M.WIGLER. (1984b). Analysis of the transforming potential of human H-ras by random mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81** : 4008-4012.
- FRANZA, B.R., JR., F.J.RAUSCHER III, S.F.JOSEPHS, T.CURRAN. (1988). The fos complex and fos-related antigens recognize sequence elements that contain AP-1 binding sites. *Science* **239** : 1150-1153
- FRYKBERG, L., S.PLAMIERI, H.BEUG, T.GRAF, M.J.HAYMAN and B.VENNSTROM. (1983). Transforming capacities of avian erythroblastosis virus mutants deleted in the erbA or erbB oncogenes. *Cell* **32** : 227-238.
- FRYKBERG, L., T.METZ, M.INTRONA, H.BEUG, B.VENNSTROM and T.GRAF. (1988). A point mutation in the DNA binding domain of the v-myb oncogene of E26 virus confers temperature sensitivity for transformation of myelomonocytic cells. *Oncogene Research* **3** : 313-322.
- FUJIWARA, S., R.J.FISHER, A.SETH, N.K.BHAT, S.D.SHOWALTER, M.ZWEIG and T.S.PAPAS. (1988). Characterization and localization of the products of the human homologs of the v-ets oncogene. *Oncogene* **2** : 99-103.
- GANDRILLON, O., P.JURDIC, M.BENCHAIBI, J-H.XIAO, J.GHYSDAEL and J.SAMARUT. (1987). Expression of the v-erbA oncogene in chicken embryo fibroblasts stimulate their proliferation in vitro and enhances tumor growth in vivo. *Cell* **49** : 687-697.

- GARCIA,M., R.WELLINGER, A.VERZAK and H.DIGGELMANN. (1986). A new site of integration for mouse mammary tumor virus proviral DNA common to BalB/cf (c3h) mammary and kidney adenocarcinomas.  
EMBO J. 5 : 127-134.
- GARNIER,J., D.J.OSGUTHORPE and B.ROBSON. (1978). Analysis of the accuracy and implication of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins.  
J. Mol. Biol. 120 : 97-120.
- GAZZOLO,L., C.MOSCOVICI, M.G.MOSCOVICI and J.SAMARUT. (1979). Response of hemopoietic cells to avian acute leukemia viruses : Effects on the differentiation of the target cells.  
Cell 16 : 627-638.
- GAZZOLO,L., J.SAMARUT, M.BOUABDELLI and J.P.BLANCHET. (1980). Early precursors in the erythroid lineage are the specific target cells of avian erythroblastosis virus in vitro.  
Cell 22 : 683-691.
- GEGONNE,A., D.LEPRINCE, P.POGNONEC, D.DERNIS, M.B.RAES, D.STEHELIN and J.GHYSDAEL. (1987). The 5' extremity of the v-ets oncogene of avian leukemia virus E26 encodes amino acid sequences not derived from the major c-ets-encoded cellular proteins.  
Virology 156 : 177-180.
- GHYSDAEL,J., A.GEGONNE, P.POGNONEC, D.DERNIS, D.LEPRINCE and D.STEHELIN. (1986a). Identification of preferential expression in thymic and bursal lymphocytes of a c-ets oncogene encoded Mr-54000 cytoplasmic protein.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 : 1714-1718.
- GHYSDAEL,J., A.GEGONNE, P.POGNONEC, K.BOULUKOS, D.LEPRINCE, D.DERNIS, C.LAGROU and D.STEHELIN. (1986b). Identification in chicken macrophages of a set of proteins related to, but distinct from, the chicken cellular c-ets-encoded protein p54<sup>c-ets</sup>.  
EMBO J. 5 : 2251-2256.
- GIBBS,J.B., I.S.SIGAL, M.POE and E.M.SCOLNICK. (1984). Intrinsic GDPase activity distinguishes normal and oncogenic ras p21 molecules.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 : 5704-5708.
- GILMAN,A.G. (1984). G proteins and dual control of adenylate cyclase.  
Cell 36 : 577-579.
- GILMORE,T.D. and H.TEMIN. (1986). Different localization of the product of the v-rel oncogene in chicken fibroblasts and spleen cells correlates with transformation by REV-T.  
Cell 44 : 791-800.
- GILMORE,T.D. and H.M.TEMIN. (1988). v-rel oncoproteins in the nucleus and in the cytoplasm transform chicken spleen cells.  
J.Virol. 62 : 703-714.
- GINSBURG,H. and L.SACHS. (1963).  
J. Natl. Cancer Inst. 31 : 1.
- 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.

- GOLAY, J., M. INTRONA and T. GRAF. (1988). A single point mutation in the v-ets oncogene affects both erythroid and myelomonocytic cell differentiation.  
Cell 55 : 1147-1158.
- GONDA, T.J., D.K. SHEINESS, L. FANSHIER and J.M. BISHOP. (1981). The genome and the intracellular RNAs of avian myeloblastosis virus.  
Cell 23 : 279-290.
- GONDA, T.J., D.K. SHEINESS and J.M. BISHOP. (1982). Transcripts from the cellular homologs of retroviral oncogenes : Distribution among chicken tissues.  
Mol. Cell. Biol. 2 : 617-624.
- GONDA, T.J. and J.M. BISHOP. (1983). Structure and transcription of the cellular homolog (c-myb) of the avian myeloblastosis virus transforming gene (v-myb).  
J. Virol. 46 : 212-220.
- GONDA, T.J. and D. METCALF. (1984). Expression of myb, myc and fos proto-oncogenes during differentiation of a murine myeloid leukemia.  
Nature 310 : 249-251.
- GONDA, T.J., N.M. GOUGH, A.R. DUNN and J. DE BLAQUIERE. (1985). Nucleotide sequence of cDNA clones of the murine myb proto-oncogene.  
EMBO J. 4 : 2003-2008.
- GONDA, T.J., S. CORY, P. SOBIESZCZUK, D. HOLTZMAN and J.M. ADAMS. (1987). Generation of altered transcripts by retroviral insertion within the c-myb gene in two murine monocytic leukemias.  
J. Virol. 61 : 2754-2763.
- GOUBIN, G., D.S. GOLDMAN, J. LUCE, P.E. NEIMAN and G.M. COOPER. (1983). Molecular cloning and nucleotide sequence of a transforming gene detected by transfection of chicken B-cell lymphoma DNA.  
Nature 302 : 114-119.
- GOUSTIN, A.J., E.B. LEOF, G.D. SHIPLEY and H.L. MOSES. (1986). Growth factors and cancer.  
Cancer Research 46 : 1015-1029.
- GRAF, T. and H. BEUG. (1978). Avian leukemia viruses interaction with their target cells in vivo and in vitro.  
Biochim. Biophys. Acta. 516 : 269-299.
- GRAF, T., A. VON KIRCHBACK and H. BEUG. (1979). Mechanism of leukaemogenesis and target cell specificity by defective avian leukemia viruses.  
Haematol. Bluttransfus 23 : 429-438.
- GRAF, T. and H. BEUG. (1983). Role of the v-erbA and v-erbB oncogenes of avian erythroblastosis virus in erythroid cell transformation.  
Cell 34 : 7-9.
- GRAF, T., F. 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.



- GRAF,T., GRIESER,S. and NUNN,M. (1988). Analysis of the dual lineage specificity of E26 avian leukemia virus. 38.  
Mosbach Colloquim. In molecular basis of viral and bacterial pathogenesis. Cell cycle and oncogenes. (Goebel and Rott, eds) Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, in press
- GREENBERG,M.E. and E.B.ZIFF. (1984). Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene.  
Nature **311** : 433-438.
- GREENBERG,R., R.HAWLEY and K.B.MARCU. (1985). Acquisition of an intracisternal A-particle element by a translocated c-myc gene in a Murine plasma cell tumor.  
Mol. Cell. Biol. **5** : 3625-3628.
- GROFFEN,J., J.R.STEPHENSON, N.HEISTERKAMP, A.de KLEIN, C.R.BARTRAM and G.GROSVELD. (1984). Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr on chromosome 22.  
Cell **36** : 93-99.
- HANN,S.R., 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** : 787-798.
- HANN,S.R. and R.N.EISENMAN. (1984). Proteins encoded by the human c-myc oncogene : differential expression in neoplastic cells.  
Mol. Cell. Biol. **4** : 2486-2497.
- HAYMAN,M.J., G. KITCHENER, P.K.VOGT and H.BEUG. (1985). The putative transforming protein of S13 avian erythroblastosis virus is a transmembrane glycoprotein with an associated protein kinase activity.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82** : 8237-8241.
- HAYWARD,W.S., B.G.NEEL and S.M.ASTRIN. (1981). Activation of a cellular oncogene by promotor insertion in ALV induced lymphoid leukemia.  
Nature **290** : 475-480.
- HEARD,J.M., S.FICHELSON, B.SOLA, M.A.MARTIAL, B.VARET and J.P.LEVY. (1984). Multistep virus-induced leukemogenesis in vitro : description of a model specifying three steps within the myeloblastic malignant process.  
Mol. Cell. Biol. **4** : 216-220.
- HELDIN,C.H. and B.WESTERMARK. (1984). Growth factors : mechanism of action and relation to oncogenes.  
Cell **37** : 9-20.
- HENNINGS,H., R.SHORES, M.L.WENK,E.F.SPANGLER., R.TARONE AND s.H.yupsa. (1983). Malignant conversion of mouse skin tumours is increased by tumour initiators and unaffected by tumour promoters.  
Nature **304** : 67-69.
- HERMANS,A., N.HEISTERKAMP, M.von LINDERN, S.van BAAL, D.MEIJER, D.van der PLAS, L.M.WIEDEMANN, J.GROFFEN, D.BOOTSMAN and G.GROSVELD. (1987). Unique fusion of bcr and c-abl genes in philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia.  
Cell **51** : 33-40.

- HURLEY, J.B., M.I.SIMON, D.B.TELOW, J.D.ROBISHAW, and A.G.GILMAN. (1984). Homologies between signal transducing G proteins and ras gene products. *Science* **226** : 860-862.
- HUNTER, T. and J.A.COOPER. (1985). Protein-tyrosine kinases. *Ann. Rev. Biochem.* **54** : 897-930.
- IBA, H., T.TAKEYA, F.R.CROSS, T.HANAFUSA and H.HANAFUSA. (1984). Rous sarcoma virus variants that carry the cellular src gene instead of the viral src gene cannot transform chicken embryo fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81** : 4424-4429.
- IBANEZ, C.E. and J.S.LIPSICK. (1988). Structural and functional domains of the myb oncogene : requirements for nuclear transport, myeloid transformation, and colony formation. *J.Virol.* **62** : 1981-1988.
- IBANEZ, C.E., A. GARCIA, U. STOBER-GRASSER, and J.S. LIPSICK. (1988). DNA-binding activity associated with the v-myb oncogene product is not sufficient for transformation. *J. Virol.* **62** : 4398-4402.
- IKAWA, S., K.HAGINO-YAMAGISCHI, S.KAWAI, T.YAMAMOTO and K.TOYOSHIMA. (1986). Activation of the cellular src gene by transducing retrovirus. *Mol. Cell. Biol.* **6** : 2420-2428.
- JOLICOEUR, P., L.VILLENEUVE, E.RASSART and C.KOZAK. (1985). Mouse chromosomal mapping of a murine leukemia virus integration region (Mis-1). First identified in rat thymic leukemia. *J.Virol.* **56** : 1045-1048.
- JURDIC, P., M.BENCHAIBI, O.GANDRILLON and J.SAMARUT. (1987). Transforming and mitogenic effects of avian leukemia virus E26 on chicken hematopoietic cells and fibroblasts, respectively, correlate with level of expression of the provirus. *J.Virol.* **61** : 3058-3065.
- KACZMAREK, L., J.K.HYLAND, R.WAIT, M.ROSENBERG and R.BASERGA. (1985). Microinjected c-myc as a competence factor. *Science* **228** : 1313-1315.
- KAHN, P., ADKINS, B., BEUG, H. and GRAF, T. (1984). Src- and fps-containing avian sarcoma viruses transform chicken erythroid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81** : 7122-7126.
- KAHN, P., L.FRYKBERG, C.BRADY, I.STANLEY, H.BEUG, B.VENNSTROM and T.GRAF (1986). v-erbA cooperates with sarcoma oncogenes in leukemic cell transformation. *Cell* **45** : 349-356.
- KATZEN, A.L., T.B.KORNBERG and J.M.BISHOP. (1985). Isolation of the proto-oncogene c-myb from *D. Melanogaster*. *Cell* **41** : 449-456.
- KAWASAKI, E.S., M.B.LADNER, A.M.WANG, J. Van ARSDELL, M.K.WARREN, M.Y.COYNE, V.L.SCHWEICKAERT, M.T.LEE, K.J.WILSON, A.BOOSMAN, R.E.STANLEY, P.RALPH and D.F.MARK. (1985). Molecular cloning of a complementary DNA encoding human macrophage-specific colony-stimulating factor (CSF-1). *Science* **230** : 291-296.

- KELLY, K., B.H. COCHRAN, C.D. STILES and P. LEDER. (1983). Cell-specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor. *Cell* 35 : 603-610.
- KHOURY, G. and P. GRUSS. (1983). Enhancer Elements. *Cell* 33 : 313-314.
- 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. (1984). Regulation of heat shock protein 70 gene expression by c-myc. *Nature* 312 : 280-282.
- KIRSCH, I.R., C.C. MORTON, K. NAKAHARA and P. LEDER. (1982). Human immunoglobulin heavy chain genes map to a region of translocation in malignant B Lymphocytes. *Science* 216 : 301-303.
- KLEMPNAUER, K.H., T.J. GONDA and J.M. BISHOP. (1982). Nucleotide sequence of the retrovirus leukemia gene v-myb and its cellular progenitor c-myb : the architecture of a transduced oncogene. *Cell* 31 : 453-463.
- KLEMPNAUER, K.H., G. RAMSAY, J.M. BISHOP, M.G. MOSCOVICI, C. MOSCOVICI, J.P. McGRATH and A.D. LEVINSON. (1983). The product of the retroviral transforming gene v-myb is a truncated version of the protein encoded by the cellular oncogene. *Cell* 33 : 345-355.
- KLEMPNAUER, K.H., G. SYMONDS, G.I. EVAN and J.M. BISHOP. (1984). Subcellular localization of proteins encoded by oncogenes of avian myeloblastosis virus and avian leukemia virus E26 and by the chicken c-myb gene. *Cell* 37 : 537-547.
- KLEMPNAUER, K.H., C. BONIFER and A.E. SIPPEL. (1986). Identification and characterization of the protein encoded by the human c-myb proto-oncogene. *EMBO J.* 5 : 1903-1911.
- KLEMPNAUER, K.H., and A.E. SIPPEL. (1986). Subnuclear localization of proteins encoded by the oncogene v-myb and its cellular homolog c-myb. *Mol. Cell. Biol.* 6 : 62-69.
- KLEMPNAUER, K.H. and A.E. SIPPEL. (1987). The highly conserved amino-terminal region of the protein encoded by the v-myb oncogene functions as a DNA-binding domain. *EMBO J.* 6 : 2719-2725.
- 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., S.M. WATANABE, J.W. SINGER, S.J. COLLINS and O.N. WITTE. (1985). Cell lines and clinical isolates derived from Ph<sup>1</sup>-positive chronic myelogenous leukemia patients express c-abl proteins with a common structural alteration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 : 1810-1814.
- KOURY, G. and P. GRUSS. (1983). Enhancer-elements. *Cell* 33 : 313-314.

- KOUZARIDES, T. and E.ZIFF. (1988). The role of the leucine zipper in the fos-jun interaction. *Nature* **336** : 646-651.
- KRANTZ, S.B. and E.GOLDWASSER. (1984). Specific binding of erythroprotein to spleen cells infected with the anemia strain of Friend virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81** : 7574-7578.
- KRUIJER, W., J.A.COOPER, T.HUNTER, I.M.VERMA. (1984). Platelet-derived growth factor induces rapid but transient expression of the c-fos gene and protein. *Nature* **312** : 711.
- LAI, M.M.C., P.H.DUESBERG, J.HORST and P.K.VOGT. (1973). Avian tumor virus RNA : a comparison of three sarcoma viruses and their transformation defective derivatives by oligonucleotide fingerprint and DNA-RNA hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70** : 2266-2270.
- LANE, M.A., A.SAINTEN, K.M.DOHERTY and M.COOPER. (1984). Isolation and characterization of a stage-specific transforming gene, Tlym-1 from T cell lymphomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81** : 2227-2231.
- LANG, R.A., D.METCALF, N.M.GOUGH, A.R.DUNN and T.J.GONDA. (1985). Expression of a hemopoietic growth factor cDNA in a factor-dependent cell line results in autonomous growth and tumorigenicity. *Cell* **43** : 531-542.
- LEBEAU, M.M., C.A.WESTBROOK, M.O.DIAZ, J.D.ROWLEY and M.OREN. (1985). Translocation of the p53 gene in t(15:17) in acute promyelocytic leukaemia. *Nature* **316** : 826-828.
- LEDER, P., J.BATTEY, G.LENOIR, G.MOULding, W.MURPHY, H.POTTER, T.STEWARD and R.TAUB. (1983). Translocations among antibody genes in human cancer. *Science* **222** : 765-771.
- LEE, F., T.YOKOTA, T.OTSUKA, P.MEYERSON, D.VILLARET, R.COFFMAN, T.MOSMANN, D.RENNICK, N.ROEHM., C.SMITH, A.ZLOTNIK and K.IARAI. (1986). Isolation and characterization of a mouse interleukin cDNA clone that expresses B-cell stimulatory factor-1 activities and T-cell- and mast-cell stimulating activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83** : 2061-2065.
- LEPRINCE, D., S.SAULE, C.de TAISNE, A.GEGONNE, A.BEGUE, M.RIGHI and D.STEHELIN. (1983a). The human DNA locus related to the oncogene myb of avian myeloblastosis virus.(AMV) : molecular cloning and structural characterization. *EMBO J.* **2** : 1073-1078.
- LEPRINCE, D., A.GEGONNE, J.COLL, C.de TAISNE, A.SCHNEEBERGER, C.LAGROU and D.STEHELIN. (1983b). A putative second cell-derived oncogene of the avian leukaemia retrovirus E26. *Nature* **306** : 395-397.
- LEPRINCE, D., M.DUTERQUE-COQUILLAUD, R.LI, C.HENRY, A.FLOURENS, B.DEBUIRE and D.STEHELIN. (1988). Alternative splicing within the chicken c-ets-1 locus : implications for the transduction within the E26 retrovirus of the c-ets proto-oncogene. *J. Virol.* **62** : 3233-3241.

- LEUTZ,A., BEUG,H. and GRAF,T. (1984). Purification and characterization of cMGF, a novel chicken myelomonocytic growth factor.  
EMBO J. 3 : 3191-3197.
- LEUTZ,A., K.DAMM, E.STERNECK, E.KOWENZ, S.NESS, R.FRANK, H.GAUSEPOHL, Y-C.E.PAN, J.SMART, M. HAYMAN and T. GRAF. (1989). Molecular cloning of the chicken myelomonocytic growth factor (cMGF) reveals relationship to interleukin 6 and granulocyte colony stimulating factor.  
EMBO J. 8 : 175-181.
- LIBERMANN,T.A., H.R.NUSBAUM, N.RAZOU, R.KRIS, I.LAX, H.SOREQ, N.WHITTLE, M.D.WATERFIELD, A.ULLRICH and J.SCHLESSINGER. (1985). Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumours of glial origin.  
Nature 313 : 144-147.
- LINIAL,M. and M.GROUDINE. (1985). Transcription of three c-myc exon is enhanced in chicken bursal lymphoma cell lines.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 : 53-57.
- LINN,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.
- LIPSICK,J.S., C.E.IBRANEZ and M.A.BALUDA. (1986). Expression of molecular clones of v-myb in avian and mammalian cells independantly of transformation.  
J.Virol. 59 : 267-275.
- LIPSICK,J.S. (1987). v-myb does not prevent the expression of c-myc in avian erythroblasts.  
J.Virol. 61 : 3284-3287.
- LIPSICK,J.S. and C.E.IBANEZ. (1987). env-encoded residues are not required for transformation by p48<sup>v-myb</sup>.  
J.Virol. 61 : 933-936.
- 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.
- LOCHRIE,M.A., J.B.HURLEY and M.I.SIMON. (1985). Sequence of the alpha subunit of photoreceptor G protein : homologies between transducin, ras, and elongation factors.  
Science 228 : 96-99.
- LUSCHER,B., E.A.KUENZEL, E.G.KREBS, and R.N.EISENMAN. (1989). Myc oncoproteins are phosphorylated by casein kinase II.  
EMBO J. 8 : 1111-1119.
- MALCOM,S., P.BARTON, C.MURPHY, M.A.FERGUSSION-SMITH, D.L.BENTLEY and T.RABBITS. (1982). Localization of human immunoglobulin Kappa light chain variable region genes to the short arm of chromosome 2 by in situ hybridization.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 : 4957-4961.
- MANOLOVA,Y., G.MANOLOV, J.KIELER, A.LEVAN and G.KLEIN. (1979). Genesis of the 14q+ marker in Burkitt's lymphoma.  
Hereditas 90 : 5-10.

- MARTIN,G.S. (1970). Rous sarcoma virus : a function required for the maintenance of the transformed state.  
Nature 227 : 1021-1023.
- MARTIN-ZANCA,D., S.H.HUGHES and M.BARBACID. (1986). A human oncogene formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences.  
Nature 319 : 743-748.
- MATHEY-PREVOT,B., G.NABEL, R.PALACIOS and D.BALTIMORE. (1986). Abelson virus abrogation of Interleukin-3 dependence in a lymphoid cell line.  
Mol. Cell. Biol. 6 : 4133-4135.
- MATHEY-PREVOT,B. and D.BALTIMORE. (1988). Recombinants within the tyrosine kinase region of v-abl and v-src identify a v-abl segment that confers lymphoid specificity.  
Mol. Cell. Biol. 8 : 234-240.
- 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.
- METCALF,D. (1977). Hemopoietic colonies in vitro cloning of normal and leukemic cells.  
Berlin Springer Verlag p 227.
- METCALF,D. (1985). The Granulocyte-macrophage colony-stimulating factors.  
Science 229 : 16-22.
- MOELLING,K., E.PFAFF, H.BEUG, P.BEIMLING, T.BUNTE, M.E.SCHALLER and T.GRAF. (1985). DNA-binding activity is associated with purified myb proteins from AMV and E26 viruses and is temperature-sensitive for E26 ts mutants.  
Cell 40 : 983-990.
- MOSCOVICI,C. (1967). A quantitative assay for avian myeloblastosis virus.  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 125 : 1213-1215.
- MOSCOVICI,C. (1975). Leukemia transformation with avian myeloblastosis virus : present status.  
Curr. Top. Microbiol. Immunol., 71 : 79-101.
- MOSCOVICI,C., L.GAZZOLO and M.G.MOSCOVICI. (1975). Focus assay and defectiveness of avian myeloblastosis virus.  
Virology 68 : 173-181.
- MOSCOVICI,C., J.SAMARUT, L.GAZZOLO and M.G.MOSCOVICI. (1981). Myeloid and erythroid neoplastic responses to avian defective leukemia viruses in chickens and in quail.  
Virology 113 : 765-768.
- MOSCOVICI,C. and GAZZOLO. (1982). Transformation of hemopoietic cells with avian leukemia viruses.  
In "Advances in Viral Oncology" (G.Klein, ed), Vol 1 pp 83-106 Raven Press, New York.
- MOSCOVICI,M.G., P.JURDIC, J.SAMARUT, L.GAZZOLO, C.V.MURA and C.MOSCOVICI. (1983). Characterization of the hemopoietic target cells for the avian leukemia virus E26.  
Virology 129 : 65-78.

- MOSCOVICI, M.G. and C. MOSCOVICI. (1983). Isolation and characterization of a temperature-sensitive mutant of avian myeloblastosis virus.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80** : 1421-1425.
- MOSCOVICI, M.G., K.H. KLEMPNAUER, G. SYMONDS, J.M. BISHOP and C. MOSCOVICI. (1985). Transformation-defective mutant of avian myeloblastosis virus that is temperature sensitive for production of transforming protein p45<sup>v-myb</sup>.  
Mol. Cell. Biol. **5** : 3301-3303.
- 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.
- NAKABEPPU, Y., K. RYDER and D. NATHANS. (1988). DNA binding activities of three murine jun proteins : stimulation by fos.  
Cell **55** : 907-915.
- NAU, M.M., B.J. BROOKS, J. BATTEY, E. SANVILLE, A.F. GAZDAR, I.R. KIRSCH, O.W. Mc BRIDE, V. BERTNESS, G.F. HOLLIS and J.D. MINNA. (1985). L-myc a new myc-related gene amplified and expressed in human small cell lung cancer.  
Nature **318** : 69-73.
- NEEL, B.G., W.S. HAYWARD, H.L. ROBINSON, J. FANG and S.M. ASTRIN. (1981). Avian leukosis virus-induced tumors have common proviral integration sites and synthesize discrete new RNAs : Oncogenesis by promoter insertion.  
Cell **23** : 323-334.
- NEEL, B.G., S.C. JHANWAR, R.S.K. CHAGANTI and W.S. HAYWARD. (1982). Two human c-onc genes are located on the long arm of chromosome 8.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79** : 7842-7846.
- NEIL, J.C., D. HUGHES, R. McFARLANE, N.M. WILKIE, D.E. ONIONS, G. LEES and O. JAREET. (1984). Transduction and rearrangement of the myc gene by feline leukaemia virus in naturally occurring T-cell leukaemias.  
Nature **308** : 814-820.
- NESS, S.A., H. BEUG and T. GRAF. (1987). v-myb dominance over v-myc in Doubly transformed chick myelomonocytic cells.  
Cell **51** : 41-50.
- NICOLAS, N.A., C.G. BEGLEY and D. METCALF. (1985). Identification of the human analogue of a regulator that induces differentiation in murine leukaemic cells.  
Nature **314** : 625-628.
- NIENHUIS, A., W.H.F. BUNN, P.H. TURNER, T.V. GOPAL, W.G. NASH, S.J. O'BRIEN and C.J. SHERR. (1985). Expression of the human c-fms proto-oncogene in hematopoietic cells and its deletion in the 5q<sup>-</sup> syndrome.  
Cell **42** : 421-428.
- NOWELL, P., J. FINAN, R. DALLA FAVERA, R.C. GALLO, A. AR-RUSHDI, H. ROMANCZUK, J.R. SELDEN, B.S. EMANUEL, G. ROVERA and C.M. CROCE. (1983). Association of amplified oncogene c-myc with an abnormally banded chromosome 8 in a human leukaemia cell line.  
Nature **306** : 494-497.

- NUNN,M.F., P.H.SEEBERG, C.MOSCOVICI and P.H.DUESBERG. (1983). Tripartite structure of the avian erythroblastosis virus E26 transforming gene.  
Nature **306** : 391-395.
- NUNN,M.F., H.WEIHNER, P.BULLOCK and P.DUESBERG. (1984). Avian erythroblastosis virus E26 : nucleotide sequence of the tripartite onc gene and of the LTR, and analysis of the cellular prototype of the viral ets sequence.  
Virology **139** : 330-339.
- NUNN,M.F. and T. HUNTER. (1989). The ets Sequence is required for induction of erythroblastosis in chickens by avian retrovirus E26.  
J.Virol. **63** : 398-402.
- O'HARA,B.M., H.P.KLINGER, T.CURRAN, Y.D.ZHANG and D.G.BLAIR. (1987). Levels of fos, ets2, and myb proto-oncogene RNAs correlate with segregation of chromosome 11 of normal cells and with suppression of tumorigenicity in human cell hybrids.  
Mol. Cell. Biol. **7** : 2941-2946.
- PADUA,R.A., N.BARRAS and G.A.CURRIE. (1984). A novel transforming gene in a human malignant melanoma cell line.  
Nature **311** : 671-673.
- PALMIERI,S., P. KAHN, and T. GRAF.(1983). Quail embryo fibroblasts transformed by four v-myc-containing virus isolates show enhanced proliferation but are nontumorigenic.  
EMBO J. **2** : 2385-2389.
- PATSCHINSKY,T., B.SCHROEDER and K.BISTER. (1986). Protein product of proto-oncogene c-mil.  
Mol. Cell. Biol. **6** : 739-744.
- PAUZA,C.D. (1987). Regulation of human T-lymphocyte gene expression by interleukin 2 : immediate-response genes include the proto-oncogene c-myb.  
Mol. Cell. Biol. **7** : 342-348.
- PAYNE,G.S., J.M.BISHOP and H.E.VARMUS. (1982). Multiple arrangements of viral DNA and an activated host oncogene in bursal lymphomas.  
Nature **295** : 209-214.
- PAZ-ARES,J., D.GHOSAL, U.WIENAND, P.A.PETERSON, and SAEDLER.(1987). The regulatory c1 locus of Zea mays encodes a protein with homology to myb proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators.  
EMBO J. **6** : 3553-3558.
- PERSSON,H., H.E.GRAY, F.GODEAU, S.BRAUNHUT and A.R.BELLEVE. (1986). Multiple growth-associated nuclear proteins immunoprecipitated by antisera raised against human c-myc peptide antigens.  
Mol. Cell. Biol. **6** : 942-949.
- PETERS,C.W.B., A.E.SIPPEL, M.VINGRON and K.H.KLEMPNAUER. (1987). Drosophila and vertebrate myb proteins share two conserved regions, one of which functions as a DNA-binding domain.  
EMBO J. **6** : 3085-3090.
- PETERS,G.C., KOZAK and DICKSON. (1984). Mouse mammary tumor virus integration regions int-1 and int-2 map on different mouse chromosomes.  
Mol. Cell. Biol. **4** : 375-378.



- PIERCE, J.H., P.P. DI FIORE, S.A. AARONSON, M. POTTER, J. PUMPHREY, A. SCOTT and J.N. IHLE. (1985). Neoplastic transformation of mast cells by Abelson-MuML : abrogation of IL-3 dependence by a nonautocrine mechanism.  
Cell **41** : 685-693.
- PIZER, E. and E.H. HUMPHRIES. (1989). RAV-1 insertional mutagenesis : Disruption of the c-myb locus and development of avian B-cell lymphomas.  
J. Virol. **63** : 1630-1640.
- POGNONEC, P., K.E. BOULUKOS, J.C. GESQUIERE, D. STEHELIN and J. GHYSDAEL. (1988). Mitogenic stimulation of thymocytes results in the calcium-dependent phosphorylation of c-ets-1 proteins.  
EMBO J. **7** : 977-983.
- POGNONEC, P., K.E. BOULUKOS and J. GHYSDAEL. (1989). The c-ets-1 protein is chromatin associated and binds to DNA in vitro.  
Oncogene, in press.
- RABBITS, 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.
- RADKE, K., H. BEUG, S. KORNFELD and T. GRAF. (1982). Transformation of both erythroid and myeloid cells by E26, an avian leukemia virus that contains the myb gene.  
Cell **31** : 643-653.
- RAISNES, M.A., W.C. LEWIS, L.B. CRITTENDEN and H.J. KUNG. (1985). c-erbB activation in avian leukosis virus-induced erythroblastosis: clustered integration sites and the arrangement of provirus in c-erbB alleles.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82** : 2287-2291.
- RAO, V.N., T.S. PAPAS, E.S.P. REDDY. (1987). erg, a human ets-related gene on chromosome 21 : alternative splicing, polyadenylation, and translation.  
Science **237** : 635-639.
- RAO, V.N., K. HUEBNER, M. ISOBE, A. AR-RUSHDI, C.M. CROCE, E.S.P. REDDY. (1989). elk, tissue-specific ets-related genes on chromosomes X and 14 near translocation breakpoints.  
Science, **244** : 66-70.
- RAUSCHER III, F.J., D.R. COHEN, T. CURRAN, T.J. BOS, P.K. VOGT, D. BOHMANN, R. TJLAN, B. ROBERT FRANZA, Jr. (1988). Fos-associated protein p39 is the product of the jun proto-oncogene.  
Science **240** : 1010-1016.
- REDDY, E.P., M.J. SMITH and A. SRINIVASAN. (1983). Nucleotide sequence of Abelson murine leukemia virus genome : structural similarity of its transforming gene product to other oncogene products with tyrosine-specific kinase activity.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80** : 3623-3627.
- REED, J.C., P.C. NOWELL and R.G. HOOVER. (1985). Regulation of c-myc mRNA levels in normal human lymphocytes by modulators of cell proliferation.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82** : 4221-4224.
- REICH, N., M. OREN and A. LEVINE. (1983). Two distinct mechanisms regulate the levels of a cellular tumor antigen, p53.  
Mol. and Cell. Biol. **12** : 2143-2150.

- RETTENMIER, C.W., J.H.CHEN, M.F.ROUSSEL and C.J.SHERR. (1985). The product of the c-fms proto-oncogene : a glycoprotein with associated tyrosine kinase activity.  
Science 228 : 320-322.
- RIABOWOL, K.T., R.J.VOSATKA, E.B.ZIFF, N.J.LAMB and J.R.FERAMISCO. (1988). Microinjection of fos-specific antibodies blocks DNA synthesis in fibroblast cells.  
Mol. Cell. Biol. 8 : 1670-1676.
- RNA Tumour Viruses, R.WEISS, N,TEICH, M.VARMUS, J.COFFIN. (1982, 1985). Eds Cold Spring Harbor Laboratory.
- ROSSON, D. and P.REDDY. (1986). Nucleotide sequence of chicken for myb oncogene activation.  
Nature 319 : 604-606.
- ROSSON, D., D.DUGAN and E.P.REDDY. (1987). Aberrant splicing events that are induced by proviral integration : implications for myb oncogene activation.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 : 3171-3175.
- ROUS, P., and J.B.MURPHY. (1911). Tumor implantations in the developing embryo. Experiments with a transmissible sarcoma of the fowl.  
J. Am. Med. Assoc. 56 : 741-742.
- ROUSSEL, M., SAULE, S., LAGROU, C., ROMMENS, C., BEUG, H., GRAF, T. and STEHELIN, D. (1979). Three new types of viral oncogene of cellular origin specific for haematopoietic cell transformation.  
Nature 281 : 452-455.
- ROUSSEL, M., C.W.RETTENMIER, A.T.LOOK and C.J.SHERR. (1984). Cell surface expression of v-fms-coded glycoproteins in required for transformation.  
Mol. Cell. Biol. 4 : 1999-2009.
- ROUSSEL, M.F., T.J.DULL, C.W.RETTENMIER, P.RALPH, A.ULLRICH and C.J.SHERR. (1987). Transforming potential of the c-fms proto-oncogene (CSF-1 receptor).  
Nature 325 : 549-552.
- ROUSSEL, M.F., J.R.DOWNING, C.W.RETTENMIER and C.J.SHERR. (1988). A point mutation in the extracellular domain of the human CSF-1 receptor (c-fms proto-oncogene product) activates its transforming potential.  
Cell 55: 979-988.
- ROVIGATTI, V., D.K.WATSON and J.J.YUNIS (1986). Amplification and rearrangement of Hu-ets1 in leukemia and lymphoma with involvement of 11q23.  
Science 232 : 398-400.
- ROZENGURT, E. (1986). Early signals in the mitogenic response.  
Science 234 : 161-166.
- RUSHLOW, K.E., I.A.LAUTENBERGER, T.S.PAPAS, M.A.BALUDA, B.PERBAL, I.G.CHIRIKJIAN and E.P.REDDY. (1982). Nucleotide sequence of the transforming gene of avian myeloblastosis virus.  
Science 216 : 1421-1423.

- SACCHI,N., D.K.WATSON, H.M.G. van KERSEL, A.HAGEMEIGER, J.KERSEY, H.D.DRABKIN, D.PATTERSON and T.S.PAPAS. (1986). Hu-ets-1 and Hu-ets-2 genes are transposed in acute leukemias with (4;11) and (8;21) translocations. *Science* **231** : 379-382.
- SACHS,L. (1964).  
in *New perspectives in Biology*, M. Sela, Ed. (Elsevier, Amsterdam) pp 246-260.
- SACHS,L. (1987). The molecular control of blood cell development. *Science* **238** : 1374-1379.
- SAKAMOTO,H., M.MORI, M.TAIRA, T.YOSHIDA, S.MATSUKAWA, K.SHIMIZU, M.SEKIGUCHI, M.TERADA and T.SUGIMURA. (1986). Transforming gene from human stomach cancers and a non cancerous portion of stomach mucosa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83** : 3997-4001.
- SAMARUT,J. and BOUABDELLI,M. (1980). In vitro development of CFU-E and BFU-E in cultures of embryonic and post-embryonic chicken hematopoietic cells. *J.Cell.Physiol.* **105** : 553-565.
- SAMARUT,J. and L.GAZZOLO. (1982). Target cells infected by avian erythroblastosis virus differentiate and become transformed. *Cell* **28** : 921-929.
- SANTOS,E., S.R.TRONICK, S.A.AARONSON, S.PULCIANI and M.BARBACID. (1982). T24 human bladder carcinoma oncogene is an activated form of the normal human homologue of BALB and Harvey-MSV transforming genes. *Nature* **298** : 343-347.
- SAP,J., A.MUNOZ, K.DAMM, Y.GOLDBERG, J.GHYSDAEL, A.LEUTZ, H.BEUG, and B.VENNSTRÖM. (1986). The c-erbA protein is a high-affinity receptor for thyroid hormone. *Nature* **324** : 635-640.
- SCHWAB,M., K.ALITALO, K-H.KLEMPNAUER, H.E.VARMUS, J.M.BISHOP, F.GILBERT, G.BRODEUR., M.GOLSTEIN and J.TRENT. (1983a). Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by tumor. *Nature* **305** : 245-248.
- SCHWAB,M., K.ALITALO, H.E.VARMUS, J.M.BISHOP and D.GEORGE. (1983b). A cellular oncogene (c-Ki-ras) is amplified, overexpressed in mouse adrenocortical tumour cells. *Nature* **303** : 497-501.
- SCHWAB,M., K.ALITALO, H.E.VARMUS and J.M.BISHOP. (1984). Amplification of cellular oncogenes in tumor cells in *Cancer Cell 2 : Oncogenes and viral genes*. Cold Spring Harbor Laboratory pp : 215-220.
- SCHWARTZ,D.E., R.TIZARD and W.GILBERT. (1983). Nucleotide sequence of Rous sarcoma virus. *Cell* **32** : 853-869.
- SETOYAMA,C., R.FRUNZIO, G.LIAU, M.MUDRY,J. and B. de CROMBRUGGHE. (1986). Transcriptional activation encoded by the v-fos gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83** : 3213-3217.
- SHEINESS,D. and M.GARDINIER. (1984). Expression of a proto-oncogene (proto-myb) in hemapoietic tissues of mice. *Mol. Cell. Biol.* **4** : 1206-1212.

- SHEN-ONG, G.L.C.POTTEV, J.F.MUSHINSKI, S.LAVU, E.P.REDDY. (1984). Activation of the c-myb locus by viral insertional mutagenesis in plasmacytoid lymphosarcoma. *Science* **226** : 1077-1080.
- SHEN-ONG, G.L.C., H.C.MORSEIII, M.POTTER and F.MUSHINSKI. (1986). Two modes of c-myb activation in virus-induced mouse myeloid tumors. *Mol.Cell. Biol.* **6** : 380-392.
- SHEN-ONG, G.L.C. (1987). Alternative internal splicing in c-myb RNAs occurs commonly in normal and tumor cells. *EMBO J.* **6** : 4035-4039.
- SHERR, C.J., C.W.RETTENMIER, R.SACCA, M.F.ROUSSEL, A.T.LOOK and E.R.STANLEY. (1985). The c-fms proto-oncogene product is related to the receptor for the mononuclear phagocyte growth factor, CSF-1. *Cell* **41** : 665-676.
- SHERR, C.J. (1987). Leukemia and lymphoma 1987. *Cell* **48** : 727-729.
- SHIBUYA, M., J.YOKOTA and Y.VEYAMA. (1985). Amplification and expression of a cellular oncogene (c-myc) in human gastric adenocarcinoma cells. *Mol. Cell. Biol.* **5** : 414-418.
- SHIH, C., B.Z.SHILO, M.P.GOLDFARB, A.DANNENBERG and R.A.WEINBERG. (1979). Passage of phenotypes of chemically transformed cells via transfection of DNA and chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76** : 5174-5178.
- SHIMIZU, K., Y.NAKATSU, M.SEKIGUCHI, K.HOKAMURA, K.TANAKA, M.TERADA and T.SUGIMURA. (1985). Molecular cloning of an activated human oncogene, homologous to v-raf, from primary stomach cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82** : 5641-5645.
- SHTIVELMAN, E., B.LIFSHITZ, R.P.GALE and E.CANAANI. (1985). Fused transcript of abl and bcr gene in chronic myelogenous leukaemia. *Nature* **315** : 550-554.
- SLAMOND, D.J., T.C.BOONE, D.C.MURDOCK, D.E.KEITH, M.F.PRESS, R.A.LARSON, L.M.SOUZA. (1986). Studies of the human c-myb gene and its product in human acute leukemias. *Science* **233** : 347-351.
- SOLA, B., S.FICHELSON, D.BORDEREAUX, P.E.TAMBOURIN and S.GISSELBRECHT. (1986). fim-1 and fim-2 : two new integration regions of friend murine leukemia virus in myeloblastic leukemias. *J.Virol.* **60** : 718-725.
- SOUZA, L.M., J.N.STROMMER, R.L.HILYARD, M.C.KOMAROMY and M.A.BALUDA. (1980). Cellular sequences are present in the presumptive avian myeloblastosis virus genome. *Proc.Natl.Acad.Sci.* **77** : 5177-5181.

- SPINDER, K.R. and A.J.BERK. (1984). Rapid intracellular turnover of adenovirus 5 early region 1A proteins.  
J.Virol. 52 : 706-710.
- SPORN, M.B. and A.B.ROBERTS. (1985). Autocrine growth factors and cancer.  
Nature 313 : 745-747.
- SPRADLING, A.C. and A.P.MAHOWALD. (1980). Amplification of genes for chorion proteins during oogenesis in drosophila melanogaster.  
Proc. Natl. Acad. Sci USA 77 : 1096-2002.
- STANLEY, E.R., A.BARTOCCI, D.PATINKIN, M.ROSENDAAL and T.R.BRADLEY. (1986). Regulation of very primitive, multipotent, hemopoietic cells by hemopoietin-1 .  
Cell 45 : 667-674.
- STEHELIN, D., H.E.VARMUS, J.M.BISHOP and P.K.VOGT. (1976). DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma virus is present in normal avian DNA.  
Nature 260 : 170-173.
- STERN, J.B. and K.A.SMITH. (1986). Interleukin-2 induction of T-cell G1 progression and c-myb expression.  
Science 233 : 203-206.
- STOBER-GRASSER, U. and J.S.LIPSICK. (1988). Specific amino acid substitutions are not required for transformation by v-myb of avian myeloblastosis virus.  
J.Virol. 62 : 1093-1096.
- SWEET, R.W., S.YOKOYAMA, T.KAMATA, J.R.FERAMISCO, M.ROSENBERG and M.CROSS. (1984). The product of ras is a GTPase and the T24 oncogenic mutant is deficient in this activity.  
Nature 311 : 273-275.
- SYMONDS, G., K.H.KLEMPNAUER, G.I.EVAN and J.M.BISHOP. (1984). Induced differentiation of AMV-transformed myeloblasts : Phenotypic alteration without altered expression of the viral oncogene.  
Mol. Cell. Biol. 4 : 2587-2593.
- TAKAHASHI, M., J.RITZ and G.M.COOPER. (1985). Activation of a novel human transforming gene, ret, by DNA rearrangement.  
Cell 42 : 581-588.
- TAPAROWSKY, E., K.SHIMIZU, M.GOLDFARB and M.WIGLER. (1983). Structure and activation of the human N-ras gene.  
Cell 34 : 581-586.
- TAUB, R., I.KIRSCH, C.MORTON, G.LENOIR, D.SWAN, S.TRONICK, S.AARONSON and P.LEDER. (1982). Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 : 7837-7841.
- TEMIN, H.M. and S.MIZUTAMI. (1970). RNA directed RNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus.  
Nature 226 : 1211-1213
- THOMPSON, C.B., P.B.CHALLONER, P.E.NEIMAN and M.GROUDINE. (1986). Expression of the c-myb proto-oncogene during cellular proliferation.  
Nature 319 : 374-380.

- TODA, T., I. UNO, T. ISHIKAWA, S. POWERS, T. KATAOKA, D. BROEK, S. CAMERON, J. BORACH, K. MATSUMOTO and M. WIGLER. (1985). In yeast, RAS proteins are controlling elements of adenylate cyclase.  
*Cell* **40** : 27-36.
- TORELLI, G., L. SELLERI, A. DONELLI, S. FERRARI, G. EMILIA, D. VENTURELLI, M. MORETTI and V. TORELLI. (1985). Activation of c-myb expression by phytohemagglutinin stimulation in normal human T lymphocytes.  
*Mol. Cell. Biol.* **5** : 2874-2877.
- TSICHLIS, P. N., M. A. LOHSE, C. SZPIRER, J. SZPIRER and G. LEVAN. (1985). Cellular DNA regions involved in the induction of Rat thymic lymphomas (MIVi-1, MIVi-2, MIVi-3, and c-myc) represent independent loci as determined by their chromosomal map location in the rat.  
*J. Virol.* **56** : 938-942.
- TSUJIMOTO, Y., J. YUNIS, L. ONORATO-SHOWE, J. ERIKSON, P. C. NOWELL and C. M. CROCE. (1984). Molecular cloning of the chromosomal breakpoint of B-cell lymphomas and leukemias with the t(11:14) chromosome translocation.  
*Science* **224** : 1403-1406.
- TSUJIMOTO, Y., J. CORSMAN, E. JAPPE and C. M. CROCE. (1985). Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma.  
*Science* **228** : 1440-1443.
- ULLRICH, A., L. COUSSENS, J. S. HAYFLICK, T. J. 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.
- VENNSTROM, B. and J. M. BISHOP. (1982). Isolation and characterization of chicken DNA homologous to the two putative oncogenes of avian erythroblastosis virus.  
*Cell* **28** : 135-143.
- WALKER, F. and A. W. BURGERS. (1985). Specific binding of radioiodinated granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to hemopoietic cells.  
*EMBO J.* **4** : 933-939.
- WANECK, G. L., L. KEYES and N. ROSENBERG. (1986). Abelson virus drives the differentiation of Harvey Virus-infected erythroid cells.  
*Cell* **44** : 337-344.
- WATERFIELD, M. D., G. T. SCRACE, N. WHITTLE, P. STROOBANT, A. JOHNSON, A. WASTESON, B. WESTERMARK, C. H. HELDIN, J. S. HUANG, 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.
- WATSON, D. K., M. J. McWILLIAMS-SMITH, M. F. NUNN, P. H. DUESBERG, S. J. O'BRIEN and T. S. PAPAS. (1985). The ets sequence from the transforming gene of avian erythroblastosis virus, E26, has unique domains on human chromosomes 11 and 21 : both loci are transcriptionally active.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82** : 7294-7298.

- WATSON,D.K., M.S.Mc WILLIAMS-SMITH, C.KOZAK, R.REEVES, J.GEARHART, M.F.NUNN, WW;NASH, J.R.FOWLEIII, P.DUESBERG, T.S.PAPAS and S.J.O'BRIEN. (1986). Conserved chromosomal positions of dual domains of the ets proto-oncogene in cats, mice and humans.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83** : 1792-1794.
- WATSON,D.K., P.J.DYSON and J.Mc MAHON. (1987). Multiple c-myb transcript cap sites are variously utilized in cells of mouse haemopoietic origin.  
EMBO J. **6** : 1643-1651.
- WEINBERG,R.A. (1985). The action of oncogenes in the cytoplasm and nucleus.  
Science **230** : 770-776.
- WEINSTEIN,Y., J.N.IHLE, S.LAVU and E.P.REDDY. (1986). Truncation of the c-myb gene by a retroviral integration in an interleukin 3-dependent myeloid leukemia cell line.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83** : 5010-5014.
- WELTE,K., E.PLATZER, L.LU, J.L.GABRILOVE, E.LEVI, R.MERTELSMANN and M.A.S.MOORE. (1985). Purification and biochemical characterization of human pluripotent hematopoietic colony-stimulating factor.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82** : 1526-1530.
- WESTBROOK,C.A., C.M.RUBIN, M.LE BEAU, L.S.KAMINER, S.D.SMITH, J.D.ROWLEY and M.O.DIAZ. (1987). Molecular analysis of TCRB and ABL in a t(7;9)-containing cell line (SUP-T3) from a human T-cell leukemia.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84** : 251-255.
- WHETTON,A.D. and T.M.DEXTER. (1986). Haemopoietic growth factors.  
TIBS **11** : 207-211.
- YAMAMOTO,K.R. (1985). Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks.  
Ann. Rev. Genet. **19** : 209-252.
- YMER,S., w.Q.J.TUCKER, C.J.SANDERSON, A.J.HAPEL, H.D.CAMPBELL and I.G.YOUNG. (1985). Constitutive synthesis of interleukine 3 by leukaemia cell line WEHI-3B is due to retroviral insertion near the gene.  
Nature **317** : 255-258.
- YOKOTA,J., Y.T.YOKOTA, H.BATTIFORA, C.LE FERRE and M.J.CLIN. (1986). Alteration of myc, ras<sup>Ha</sup> and myb proto-oncogenes in Cancers are frequent and show clinical correlation.  
Science **231** : 261-264.
- YOUNG,D., G.WAITCHES, C.BIRCHMEIER, O.FASANO and M.WIGLER. (1986). Isolation and characterization of a new oncogene encoding a protein with multiple potetial cellular transmembrane domains.  
Cell **45** : 711-719.
- 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

(Oncogene Research in press)

## SHORT COMMUNICATION

**A Single Amino-Acid Substitution in the DNA-Binding Domain of the myb oncogene Confers a Thermolabile Phenotype to E26 Transformed Myeloid Cells.**

Ruoping LI<sup>1</sup>, Martine DUTERQUE-COQUILLAUD<sup>2</sup>, Christian LAGROU<sup>1</sup>, Brigitte DEBUIRE<sup>2</sup>, Thomas GRAF<sup>3</sup>, Dominique STEHELIN<sup>1</sup> and Dominique LEPRINCE<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup> Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Unité 186 INSERM, CNRS U 1160, Institut Pasteur - 59019 LILLE Cedex, France

<sup>2</sup> Unité 124 INSERM, IRCL, 59045 LILLE, France

<sup>3</sup> EMBL, Differentiation Programm, Heidelberg, Federal Republic of Germany

Running Title : Ts v-myb gene

Key words : Myb and ets oncogenes, temperature-sensitive mutant , transformation.

\* Corresponding author

**ABSTRACT**

A biologically active provirus of the ts143 E26 mutant that is temperature sensitive (ts) for myeloblast transformation was molecularly cloned. The predicted amino-acid sequence of the v-myb encoded domain of the mutant P135gag-myb-ets protein displayed two single amino-acid changes one of which was non-conservative when compared to the wild-type E26 v-myb sequence. This mutation, which substitutes a Threonine residue (wild-type) for an Arginine residue (mutant), is located within the amino-terminal part of v-myb in the DNA binding domain at a position which is conserved between the c-myb genes of chicken, humans, mice and Drosophila. Introduction of this mutation into the genome of a wild type E26 virus was sufficient to induce a ts phenotype similar to that obtained with the original ts143 E26 virus.

## RESULTS

The cellular myb proto-oncogene has been highly conserved during vertebrate evolution (reviewed in Lipsick et al., 1986). In particular, one domain is conserved between mammals, birds, the fruit fly *Drosophila melanogaster* (Katzen et al., 1985) as well as green plants (Paz-Ares et al., 1987). This highly conserved domain, which is close to the amino-terminus of the c-myb protein, consists of three imperfect direct repeats of 50 amino-acids each and functions as a nuclear DNA-binding domain (Boyle et al., 1984 ; Klempnauer et al., 1984 ; Moelling et al., 1985 ; Klempnauer and Sippel, 1987). The two oncogenic viral myb proteins known so far of the AMV and E26 viruses contain a truncation in the first repeat and are also DNA binding proteins (Klempnauer et al., 1982, 1983 ; Nunn et al., 1984).

The E26 leukemia virus, has transduced in its genome not only myb sequences but also sequences derived from another cellular locus c-ets-1, (Roussel et al., 1979 ; Leprince et al., 1983 ; Nunn et al., 1983 ; Leprince et al., 1988). When compared to the c-myb gene, the E26 v-myb allele is more truncated than the AMV v-myb allele on both its 5' and 3' ends but differs from its cellular counterpart, c-myb, only by a single point mutation leading to an amino-acid change (Nunn et al., 1983 ; 1984). Oncogenesis by E26 is mediated by a single nuclear DNA-binding, protein P135gag-myb-ets, translated from the genomic RNA (Beug et al., 1982 ; 1984 ; Bister et al., 1982 ; Boyle et al., 1984). In contrast to AMV which transforms exclusively myeloid cells, E26 transforms myeloid and erythroid cells as well as quail fibroblasts in vitro and is able to induce a mixed erythroid-myeloid leukemia in vivo (Graf and Stehelin, 1982 ; Graf et al., 1979 ; Radke et al., 1982 ; Moscovici et al., 1983 ; Jurdic et al., 1988 ; Golay et al., 1989). E26 mutants that are temperature sensitive (ts) for myeloblast transformation and that have retained their ability to transform both erythroblasts and fibroblasts at the non-permissive temperature have been isolated, suggesting that the myb oncogene of E26 causes myeloblast transformation and that ets is responsible for erythroblast and fibroblast transformation (Beug et al., 1984). This was recently confirmed by the isolation of E26 mutants ts for erythroid transformation only and carrying a single point mutation in v-ets (Golay et al., 1989) and by the in vitro construction of E26 mutants deleted in ets (Nunn et al., 1989).

To identify the site (s) of mutation, we molecularly cloned a E26 mutant ts for myeloid transformation, ts143 E26, and sequenced its myb oncogene. We prepared a genomic recombinant DNA library of ts143 E26-transformed myeloblasts DNA which had been partially digested with Sau3A, into the vector  $\lambda$  EMBL4. The resulting bacteriophage library was screened with nick-translated v-myb, v-ets as well as gag and env probes. We selected a recombinant clone, named  $\lambda$  ts143 E26-1, which hybridized with all these probes. Its deduced restriction map was similar to that of two wild type (wt) E26 viruses cloned in previous studies (Leprince et al., 1983 ; Nunn et al., 1983). This confirmed that the  $\lambda$  ts143 E26-1 recombinant contained a complete provirus and furthermore suggested that the lesions involved in the ts phenotype were rather small alterations. Using unique KpnI and XbaI sites located into the lambda vector arms, the complete proviral DNA as well as flanking cellular sequences were cloned into the plasmid puc19 to yield p ts143 E26 (schematically drawn in Figure 1). To demonstrate its biological activity, 10 parts of p ts143 E26 and 1 part of pSV2 neo were co-transfected onto secondary chicken embryo fibroblasts (CEF) by the CaP04 coprecipitation method. Because E26 does not fully transform chicken fibroblasts, we used the Tn5 neo gene as a selectable marker allowing the dominant selection of cotransfected cells in growth medium containing 400  $\mu$ g/ml of the drug G418 (Lipsick et al., 1986 ; Gandrillon et al., 1987). The G418-resistant colonies, which appeared within two to four weeks, were pooled and superinfected with RAV-1 helper virus. However, the titer of E26 virus produced by these G418-selected fibroblasts was generally low. Thus, bone marrow cells were infected by co-cultivation for two days with G418-selected fibroblasts, cultured in medium (DMEM containing 8 % foetal calf serum, 2 % chicken serum and 10 units of crude cMGF) at 37°C by selecting the nonadherent cells at 2 days intervals. After 8 days essentially all of the cells proliferated rapidly, were transformed and exhibited the phenotype of immature myelomonocytic cells (also designated as "myeloblasts") (Graf et al., 1979 ; Radke et al., 1982 ; Beug et al., 1984). Aliquots of these cells were seeded at a density of  $3 \times 10^4$  cells/35 mm dish in Methocel containing the above medium and some dishes were incubated at 37°C, while others were incubated at 42°C. The number and morphology of the colonies were evaluated 3 days later.

Essentially, all the transformed colonies obtained in these conditions at 37°C with ts 143 E26 were compact (undifferentiated cells) while at 42°C disperse colonies consisting of

differentiated macrophage-like cells were formed (data not shown) as previously described (Beug et al., 1984). This assay demonstrated that we had cloned a biologically active proviral form of ts143 E26 mutant, ts for myeloid transformation.

Since we suspected that the main lesion(s) conferring the conditional transforming activity of ts143 E26 is located in its v-myb oncogene, this gene in the cloned provirus was sequenced. We found it to contain three nucleotide changes when compared to the wt E26 v-myb sequence (Nunn et al., 1983 ; 1984) (Figure 2). However, at the level of the predicted amino-acid sequence the mutation at position 249 is neutral, the mutation at position 254 is chemically conservative (an Aspartic acid residue substituted by a Glutamic acid residue) and the mutation at position 68 leads to a nonconservative amino-acid change from a Threonine residue in the wt E26 v-myb sequence to an Arginine residue in ts 143 E26 (Figure 2). In addition, this latter mutation is localized in the DNA binding domain, 12 residues downstream of the AMV v-myb nuclear targeting signal recently identified (positions 29 to 57 ), (Ibanez et al., 1988).

To test whether this Thr to Arg mutation was sufficient to induce the ts phenotype observed in ts143 E26, we introduced it by reciprocal exchange into the genome of an otherwise wt E26 virus. We first constructed a wt E26 virus coexpressing in its genome the dominantly selectable marker neo. For that purpose, we replaced the 2.0 kbp Xho-Sal I gag-erbA fragment of the XJ12 clone (Gandrillon et al., 1987) by the 3.5 kbp Xho-SalI (partial) gag-myb-ets fragment of a wt E26 virus to obtain wt E26-neo (Figure 1). Transfection, infection and biological assay of transformed hematopoietic colonies were performed as described above and showed that this virus displayed the typical transformation properties of wt E26, although the gag-myb-ets coding sequence was under the control of avian erythroblastosis virus (AEV) LTRs (data not shown).

We next constructed a virus where the 0.9 kbp gag-myb BamHI-EcoRI fragment of the wt E26 neo proviral clone was replaced by the corresponding fragment of ts143 E26 encoding an Arginine residue instead of the Threonine in position 68 (Figures 1 and 2). The myeloid cells transformed by this virus designated tsBE E26 neo, when shifted from 37°C to 42°C displayed the typical phenotype of ts143 E26 transformed cells upon temperature shift to 42° (Figure 3 and Table I). We thus concluded that the mutation of Threonine in Arginine at position 68 in the myb encoded DNA binding domain of P135gag-myb-ets is by itself sufficient to convert a wt E26 virus into an

E26 virus ts for myeloblast transformation.

Our results correspond to similar data obtained with another independently isolated E26 mutant which is ts for myeloid transformation, ts 21 E26 (Beug et al., 1984 ; Frykberg et al., 1989). ts 21 E26 contains exactly the same mutation (Arginine instead of Threonine at position 68) but lacks the two conservative mutations found in ts143 E26 (positions 249 and 254 ; see Figure 2). These data lend support to the notion that the mutation at position 68 correspond to a critical region of the myb protein. A cluster of acidic residues C-terminal to a Thr would be a good consensus for a putative casein kinase II phosphorylation site (Edelman et al., 1987 ; Lüscher et al., 1989) which would be absent in the mutant. The Threonine at position 68 is located in the N-terminal half of the third repeat and is also highly conserved between the proteins encoded by avian, mammalian and insect c-myb genes. This suggests that it might be important for the DNA binding activity of the protein. Computer-assisted conformational analyses predict this region to be part of a  $\beta$  turn structure followed by an  $\alpha$  helix both in the wt and in the ts P135gag-myb-ets protein. However, the positively charged Arginine residue located in the mutant protein close to three Glutamic Acid residues could preclude ionic interactions, critical for the secondary structure of the protein, between this negatively charged stretch of amino acids and a positively charged one. This hypothesis is currently being investigated by in vitro construction and biological characterization of E26 mutants carrying either neutral, hydroxylated or a positively charged amino acid such as Lysine at this position.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Drs J.Samarut and P.Jurdic for gift of the pXJ12 vector and training one of us (D.L.) in their group ; Dr J.C.Gesquière for computer-analyses of the protein ; A.Bègue 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 National de la Recherche Scientifique, The Association pour la Recherche Contre le Cancer and the Pasteur Institute in Lille. Ruoping Li was supported by a fellowship from the Chinese government.



## LITERATURE CITED

- 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., A.Leutz, P.Kahn and T.Graf. 1984.*ts* mutants of E26 virus allow transformed myeloblasts, but not erythroblasts or fibroblasts, to differentiate at the nonpermissive temperature.  
Cell 39 : 579-588.
- Bister,K., M.Nunn, C.Moscovici, B.Perbal, M.A.Baluda and P.H.Duesberg.  
1982. Acute leukemia viruses E26 and avian myeloblastosis virus have related transformation-specific RNA sequences but different genetic structures, gene products, and oncogenic properties.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 : 3677-3681.
- Boyle,W.J., M.A.Lampert, J.S.Lipsick and M.A.Baluda. 1984. Avian myeloblastosis virus and E26 virus oncogene products are nuclear proteins.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 : 4265-4269.
- Edelman,A.M., D.A.Blumenthal and E.G.Krebs. 1987. Protein Serine/Threonine kinases.  
Ann. Rev. Biochem. 56 : 567-613.
- Frykberg,L., T.Metz, G.Brady, M.Introna, H.Beug, B.Vennstöm and T.Graf. 1989. A point mutation in the DNA binding domain of the v-myb oncogene of E26 virus confers temperature sensitivity for transformation of myelomonocytic cells.  
Oncogene Res. 3 : 313-322.
- Gandrillon,O., P.Jurdic, M.Benchaibi, J-H.Xiao, J.Ghysdael and J.Samarut. 1987. Expression of the v-erbA oncogene in chicken embryo fibroblasts stimulate their proliferation in vitro and enhances tumor growth in vivo.  
Cell 49 : 687-697.

- Golay,J., M.Introna and T.Graf.** 1988. A single point mutation in the v-ets oncogene affects both erythroid and myelomonocytic cell differentiation.  
Cell 55 : 1147-1158.
- Graf,T. and D.Stehelin.** 1982. Avian leukemia viruses : oncogenes and genome structures.  
Biochim. Biophys. Acta 651 : 245-271
- Graf,T., N.Oker-Blom, T.G.Todorov and H.Beug.** 1979. Transforming capacities and defectiveness of avian leukemia viruses OK10 and E26.  
Virology 99 : 431-436.
- Ibanez,C.E. and J.S.Lipsick.** 1988. Structural and Functional domains of the myb oncogene : requirements for nuclear transport, myeloid transformation and colony formation.  
J.Virol 62 : 1981-1988.
- Jurdic,P., M.Bencharbi, O.Gandrillon and J.Samarut.** 1987. Transforming and mitogenic effects of avian leukemia virus E26 on chicken hematopoietic cells and fibroblasts, respectively, correlate with level of expression of the provirus.  
J.Virol 61 : 3058-3065.
- Katzen,A.L., T.B.Kornberg and J.M.Bishop.** 1985. Isolation of the proto-oncogene c-myb from *drosophila melanogaster*.  
Cell 41 : 449-456.
- Klempnauer,K.-H., T.J.Gonda and J.M.Bishop.** 1982. Nucleotide sequence of the retroviral leukemia gene v-myb and its cellular progenitor c-myb : the architecture of a transduced oncogene.  
Cell 31 : 453-463.
- Klempnauer,K.-H., G.Ramsay, J.M.Bishop, M.G.Moscovici, C.Moscovici, J.P.McGrath and A.D.Levinson.** 1983. The product of the retroviral transforming gene v-myb is a truncated version of the protein encoded by the cellular oncogene c-myb.  
Cell 33 : 345-355.

- Klempnauer, K.-H., G. Symonds, G.I. Evan and J.M. Bishop.** 1984. Subcellular localization of proteins encoded by oncogenes of avian myeloblastosis virus and avian leukemia virus E26 and by the cellular c-myb gene.  
Cell 37 : 537-547.
- Klempnauer, K.-H. and A. Sippel.** 1987. Subnuclear localization of proteins encoded by the oncogene v-myb and its cellular homolog c-myb.  
Mol. Cell. Biol. 6 : 62-69.
- Leprince, D., A. Gégonne, J. Coll, C. de Taisne, A. Schneeberger, C. Lagrou and D. Stéhelin.** 1983. A putative second cell-derived oncogene of the avian leukemia retrovirus E26.  
Nature (London) 306 : 395-397.
- Leprince, D., M. Duterque-Coquillaud, R.P. Li, C. Henry, A. Flourens, B. Debuire and D. Stéhelin.** 1988. Alternative splicing within the chicken c-ets-1 locus : Implications for transduction within the E26 retrovirus of the c-ets proto-oncogene.  
J. Virol 62 : 3233-3241.
- Lipsick, J.S. and M.A. Baluda.** 1986 The myb oncogene, p.73-98. In T. S. Papas and G.F. Vande Woude (ed.), Oncogenes : gene amplification and analysis, vol. 4. Elsevier Science Publishing Company, New York.
- Lipsick, J.S., C.E. Ibanez and M.A. Baluda.** 1986. Expression of molecular clones of v-myb in avian mammalian cells independently of transformation.  
J. Virol. 59 : 267-275.
- Lüscher, B., E.A. Kuenzel, E.G. Krebs and R.N. Eisenman.** 1989. Myc oncoproteins are phosphorylated by casein kinase II.  
EMBO J. 8 : 1111-1119.
- Moelling, K., E. Pfaff, H. Beug, P. Beimling, T. Bunte, H.E. Schaller and T. Graf.** 1985. DNA-binding activity is associated with purified myb proteins from AMV and E26 viruses and is temperature-sensitive for E26 *ts* mutants.  
Cell 40 : 983-990.

- Moscovici, M.G., P.Jurdic, J.Samarut, L.Gazzolo, C.V.Mura and C.Moscovici.** 1983. Characterization of the hemopoietic target cells for the avian leukemia virus E26.  
*Virology* **129** : 65-78.
- Nunn, M.F., P.H.Seeberg, C.Moscovici and P.H.Duesberg.** 1983. Tripartite structure of the avian erythroblastosis virus E26 transforming gene.  
*Nature (London)* **306** : 391-395.
- Nunn, M.F., M.Weiher, P.Bullock and P.Duesberg.** 1984. Avian erythroblastosis virus E26 : nucleotide sequence of the tripartite "onc" gene and of the LTR, and analysis of the cellular prototype of the viral "ets" sequence.  
*Virology* **139** : 330-339.
- Nunn, M.F. and Hunter, T.** 1989. The ets sequence is required for induction of Erythroblastosis in chickens by avian retrovirus E26.  
*J.Virol.* **63** : 398-402.
- Paz-Ares, J., D.Ghosal, U.Wienand, P.A.Peterson and H.Saedler.** 1987. The regulatory *cl* locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to myb proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators.  
*EMBO J.* **6** : 3553-3558.
- Radke, K., H.Beug, S.Kornfeld and T.Graf.** 1982. Transformation of both erythroid and myeloid cells by E26, an avian leukemia virus that contains the "myb" gene.  
*Cell* **31** : 643-653.
- Roussel, M., S.Saule, C.Lagrou, C.Rommens, H.Beug, T.Graf and D.Stehelin.**  
1979. Three new types of viral oncogene of cellular origin specific for haematopoietic cell transformation.  
*Nature (London)* **281** : 452-455.

**FIGURES LEGEND :**

**Figure 1 :** Strategy of construction of the chimera between wt E26 neo provirus and the ts 143 E26 virus. The complete ts 143 E26 provirus was subcloned into pUC19 to yield p ts 143 E26 (see the text for explanation), the coding capacity required for the synthesis of the ts P135gag-myb-ets protein is drawn in black. The wt E26 neo virus was constructed by inserting the 3.5 kbp gag-myb-ets XhoI-SalI fragment of a wt E26 virus (drawn in white) (Leprince et al., 1983) into the pXJ12 vector (Gandrillon et al., 1987). The E26 fragment is flanked by the LTR and 5' portion from AEV and followed by out of frame erbA sequences, as well as the neo gene and the 3' LTR of AEV. The neo gene product can be translated from a subgenomic RNA and thus confers G418-resistance to infected chicken cells.

The ts BE E26 neo provirus results from the substitution of the BamHI-EcoRI fragment of wt E26 neo by the corresponding fragment of ts 143 E26.

**Figure 2 :** Mutations in the v-myb gene of ts 143 E26.

The sequences of both strands of ts 143 v-myb gene were determined and compared to the published E26 v-myb sequence (Nunn et al., 1983 ; 1984). The point mutations between ts 143 and wt E26 as well as the resulting amino acids are underlined. Numbering of the amino acid was obtained by choosing the first amino acid encoded by E26 v-myb as number 1.

**Figure 3 :** Colonies in Methocel of myeloid cells transformed by ts BE E26 neo (A,B) and wt E26 (C,D).

Bone marrow cells were transformed at 37°C and seeded for 3 days in Methocel at 37°C (A and C) or 42°C (B and D) respectively. The disperse morphology of the colony shown in B is typical of ts 143 E26 myeloid cells at 42°C (Beug et al., 1984)

Figure 1:

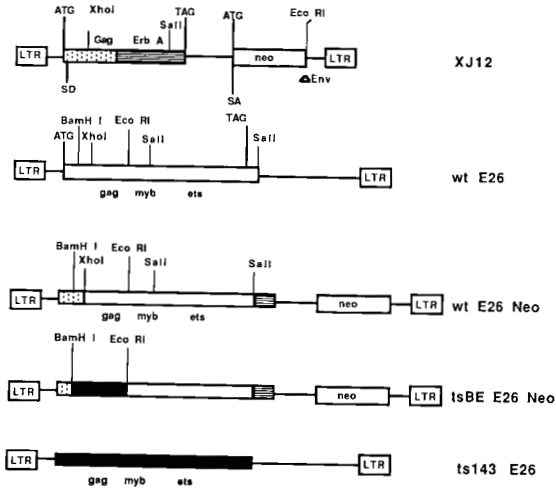


Figure 2:

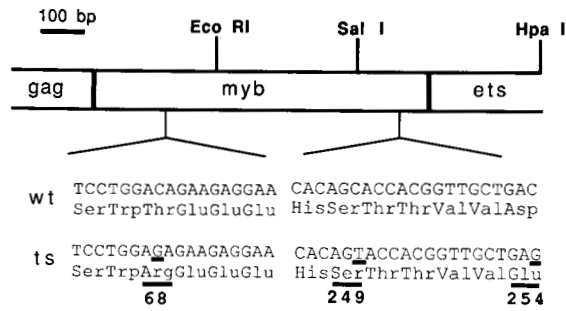


Figure 3:

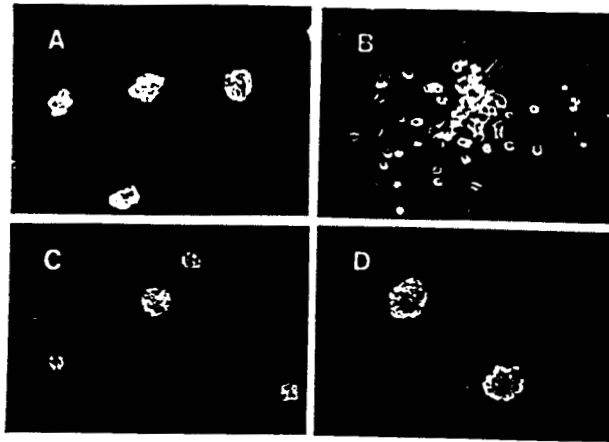


Table I: Temperature sensitivity of myeloblasts transformed by various viral constructs as determined by colony formation in Methocel.

|             | Number of colonies obtained at |          |         |          |
|-------------|--------------------------------|----------|---------|----------|
|             | 37°C                           |          | 42°C    |          |
|             | compact                        | disperse | compact | disperse |
| tsBE E26neo | 316                            | 0        | 1       | 128      |
| wtE26       | 250                            | 0        | 188     | 13       |
| ts143E26    | 290                            | 1        | 1       | 115      |





## RESUME

Le rétrovirus aviaire E26 induit chez le poulet une leucémie mixte érythroïde et myéloïde à prédominance érythroïde ; il transforme des cellules érythroïdes et myéloïdes *in vitro*. Par contre, le rétrovirus aviaire AMV induit chez le poulet une leucémie myéloïde et ne peut transformer que des cellules myéloïdes *in vitro*.

Des mutants du virus E26 thermosensibles pour la transformation myéloïde sans que la transformation érythroïde soit affectée ont été isolés.

Dans la première partie de notre travail, nous avons tout d'abord cloné moléculairement, puis séquencé le gène v-myb de l'un de ces virus, ts143 E26 et découvert une mutation située dans la partie 5' du gène, dans le domaine phylogénétiquement conservé et impliqué dans la fixation de la protéine myb à l'ADN. En utilisant la technique de clonage et la technique de mutation dirigée à l'aide d'oligonucléotides, nous avons construit deux mutants, l'un du virus E26 et l'autre du virus AMV, ne différant de leurs virus sauvages respectifs que par cette mutation en 5' du gène v-myb. Nous avons démontré que cette seule mutation dans le virus E26 est responsable du phénotype thermosensible des cellules transformées ("myéloblastes") par ce virus. Par contre, cette même mutation introduite dans l'oncogène v-myb du virus AMV semble rendre celui-ci incapable de transformer des cellules myéloïdes *in vitro*.

Dans la dernière partie de notre travail, nous avons montré que le gène v-myb pouvait stimuler la prolifération de cellules de neurorétine de poulet (CNR). Nous avons montré que le domaine lié à la fixation de l'ADN situé dans la partie 5' du gène v-myb était nécessaire pour maintenir cette prolifération. Par contre, une région phylogénétiquement conservée et située dans la partie 3' du gène v-myb est requise, mais non indispensable pour la prolifération des CNR.

Les CNR constituent donc un nouveau système de choix pour l'étude des effets biologiques de l'oncogène v-myb.