

50376  
1990  
199

50376  
1990  
199

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

---

N° d'ordre 623

## THESE

présentée pour l'obtention du grade de

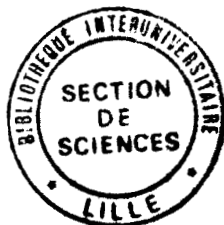
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES  
ET TECHNIQUES DE LILLE

option : BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE

par

**Philippe AMOUYEL**

# COOPERATION D'ONCOGENES DANS LES NEURORETINES



soutenue le 4 décembre 1990 devant la commission d'examen

Président : Professeur André VERBERT

Rapporteurs : Professeur Jean KREMBEL  
Docteur Françoise DIETERLEN-LIEVRE

Examineur : Professeur Dominique STEHELIN

Directeur : Professeur Dominique STEHELIN

*La certitude est une région profonde où la pensée ne se maintient que par l'action. Mais quelle action ? Il n'y en a qu'une, celle qui combat la nature et la crée ainsi, qui pétrit le moi en le froissant. Le mal c'est l'égoïsme qui est au fond lâcheté. La lâcheté, elle, a deux faces, recherche du plaisir et fuite de l'effort. Agir, c'est la combattre. Toute autre action est illusoire et se détruit.*

Jules LAGNEAU

A mon maître, Jean SAMAILLE

Je tiens à remercier Dominique STEHELIN d'avoir bien voulu prendre le risque, il y a six ans de m'accepter dans son laboratoire, en dépit de mes origines médicales, et de me laisser ainsi entrevoir la "dure condition de chercheur".

Je voudrais remercier Simon SAULE d'avoir dirigé ce travail et de m'avoir mis au contact d'une recherche riche et imaginative.

Je remercie Monsieur le Professeur André VERBERT d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse, et Monsieur le Professeur Jean KREMBEL d'en être le rapporteur.

Je remercie Madame le Docteur Françoise DIETERLEN d'avoir si aimablement accepté de juger ce travail.

Je remercie tous les membres de l'U186 qui savent depuis toujours faire régner cette ambiance de travail, chaleureuse et stimulante, presque unique dans une unité de recherche.

Un grand merci à Nicole DEVASSINE pour son dévouement et sa disponibilité dans la réalisation pratique de ce mémoire, ainsi qu'à Marie-Christine BOUCHEZ et Monique TOMCZAK pour leur aide dans la bibliographie et les figures.

Je voudrais enfin remercier ma femme Laurence et mes fils, Thomas et Damien, pour leur soutien affectueux et constant.

## LISTE DES PUBLICATIONS

\* Martin, P., Henry, C., Denhez, F., Amouyel, P., Bechade, C., Calothy, G., Debuire, B., Stéhelin, D., and Saule, S. (1986). Characterization of a MH2 mutant lacking the *v-myc* oncogene.

Virology, **153** : 272-279.

\* Dozier, C., Denhez, F., Coll, J., Amouyel, P., Quatannens, B., Begue, A., Stéhelin, D., and Saule, S. (1987). Induction of proliferation of neuroretina cells by long terminal repeat activation of the carboxy-terminal part of *c-mil*.

Molecular and Cellular Biology, **7** : 1995-1998.

Saule, S., Mérigaud, J.P., Al-Moustafa, A.E., Ferré, F., Rong, P.M., Amouyel, P., Quatannens, B., Stéhelin, D., and Dieterlen-Lièvre, F. (1987). Heart tumors specifically induced in young avian embryos by the *v-myc* oncogene.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **84** : 7982-7986.

Amouyel, P., Gégonne, A., Delacourte, A., Défossez, A., and Stéhelin, D. (1988). Expression of ETS protooncogenes in astrocytes in human cortex.

Brain Research, **447** : 149-153.

\* Amouyel, P., Laudet, V., Martin, P., Li, R., Quatannens, B., Stéhelin, D., and Saule, S. (1989). Two nuclear oncogenic proteins, P135*gag-myb-ets* and p61/63*myc*, cooperate to induce transformation of chicken neuroretina cells.

Journal of Virology, **63** : 3382-3388.

\* Publications présentées dans le mémoire

## GLOSSAIRE

**Activateur** : séquence activatrice de la transcription (en anglais enhancer).

**Activation** : modification entraînant le dérèglement d'un oncogène et aboutissant à une modification quantitative ou qualitative de son produit.

**ALV** : (pour Avian Leukaemia Viruses) rétrovirus aviaires compétents pour la réplication et dépourvus de gène oncogène.

**bp** : paires de bases d'ADN.

**CNR** : (pour Chicken Neuroretina Cells) cellules de neurorétine d'embryons de Poulet de 7 jours.

**DLV** : (pour Defective Leukemia Viruses) rétrovirus aviaires induisant des leucémies aiguës et défectifs pour la réplication.

**Epissure** : mécanisme permettant l'élimination des introns d'un ARN.

**kb** : kilobases, milliers de bases d'ARN.

**kbp** : kilobases paires, millier de paires de bases d'ADN.

**LTR** : (pour Long Terminal Repeat), séquence activatrice constituée de 350 bp environ et présente à chaque extrémité de l'ADN proviral.

**PK** : Protéine Kinase.

**ppx** : phospho-protéine x.

**Pr** : protéine précurseur.

**Px** : protéine de fusion x.

**px** : protéine x mature.

**QNR** : (pour Quail Neuroretina Cells) cellules de neurorétine d'embryons de Cailles de 6 jours.

**Virus auxiliaire** : ALV permettant la propagation de rétrovirus aviaires défectifs pour la réplication (en anglais helper).

## TABLE DES MATIERES

<b>PRESENTATION DU MEMOIRE</b> .....	11
<b>INTRODUCTION</b> .....	12
<b>I. GENERALITES</b> .....	15
<b>A. Les rétrovirus</b> .....	15
1) Les ALV .....	17
2) Les DLV .....	19
<b>B. Les critères de la transformation cellulaire</b> .....	21
1) La transformation des cellules non hématopoïétiques.....	21
2) La transformation des cellules hématopoïétiques .....	22
<b>C. Les oncogènes</b> .....	24
1) Les protéines homologues à un facteur de croissance .....	24
2) Les protéines de la famille <i>ras</i> .....	24
3) Les protéines kinases .....	26
a) Les protéines tyrosine-kinases .....	26
α) Les protéines associées à la face interne de la membrane cytoplasmique .....	26
β) Les protéines transmembranaires .....	28
b) Les protéines sérine/thréonine-kinases .....	28
4) La protéine homologue à la phospholipase C .....	30
5) Les protéines nucléaires .....	30
<b>II. TUMORIGENESE MULTIETAPE : LES COOPERATIONS</b> .....	32
<b>A. Les produits de la coopération</b> .....	32
1) Les carcinogènes chimiques .....	32
2) Les virus cancérogènes : polyome, SV40, adénovirus .....	34
a) Polyome .....	35
b) SV40 .....	35
c) Adénovirus .....	37
3) Oncogènes viraux et cellulaires .....	37
a) L'expérience princeps : <i>v-myc</i> et <i>c-Ha-ras</i> coopèrent pour transformer des fibroblastes embryonnaires en culture primaire .....	38

b) Des groupes de complémentation .....	40
α) Les gènes du groupe "ras" pouvant coopérer avec des gènes du groupe de "myc" .....	40
β) Les gènes du groupe "myc" pouvant coopérer avec des gènes du groupe "ras" .....	43
c) Des exceptions éventuelles aux groupes de complémentation .....	44
d) Des voies possibles de la coopération .....	45
α) La modulation des taux d'expression .....	45
β) Une troisième étape possible .....	45
γ) Les relations avec les facteurs de croissance .....	47
<b>B. Des évidences biologiques de coopération .....</b>	<b>48</b>
1) Les souris transgéniques .....	48
2) Les organes reconstitués .....	49
3) Les tumeurs in vivo .....	50
4) Les rétrovirus à deux oncogènes .....	52
a) AEV .....	52
b) MH2 .....	52
c) E26 .....	54
<b>III. LES ONCOGENES NUCLEAIRES .....</b>	<b>56</b>
<b>A. Les facteurs de transcription .....</b>	<b>56</b>
1) Les régions en cis liant les facteurs de transcription .....	56
2) Les protéines liant des séquences spécifiques d'ADN .....	57
3) Les domaines de fixation à l'ADN des facteurs de transcription .....	59
a) Motifs en "doigts de Zinc" (Zinc finger) .....	59
α) Le facteur de transcription SpI .....	59
β) Les récepteurs d'hormones stéroïdiennes .....	61
γ) Des protéines ne liant pas l'ADN .....	61
b) Les homéodomains (Homeodomain) .....	61
c) Les "leucine zipper" .....	62
d) Autres motifs .....	64
4) Les domaines d'activation transcriptionnelle .....	64
a) Types de domaine .....	66
α) Riches en résidus acides .....	66
β) Riches en résidus glutamine .....	66
γ) Riches en résidus proline .....	67

b) Mécanismes d'activation .....	67
5) Familles de facteurs de transcription avec des homologies dans leur spécificité de fixation à l'ADN .....	68
a) Famille AP-1 .....	68
b) Famille des protéines à homéodomaine .....	70
c) Famille des protéines reconnaissant les motifs CCAAT .....	70
6) Régulation des activités des facteurs de transcription .....	70
a) Modifications post-traductionnelles .....	70
b) Régulation par des interactions protéine-protéine .....	71
<b>B. Les oncogènes nucléaires <i>myb</i>, <i>ets</i> et <i>myc</i> .....</b>	<b>72</b>
1) <i>myb</i> .....	72
a) Le domaine de fixation à l'ADN .....	72
b) <i>myb</i> , un nouveau type de domaine de fixation à l'ADN .....	73
c) Motif de fixation de <i>myb</i> à l'ADN .....	75
d) Domaines nécessaires à la transformation .....	75
e) <i>myb</i> , un transactivateur .....	77
f) <i>mim-1</i> , un gène cible pour <i>v-myb</i> .....	78
g) Régulation de l'activité transcriptionnelle de <i>myb</i> .....	78
2) <i>ets</i> .....	79
a) La famille des gènes <i>ets</i> .....	79
b) Les protéines <i>ets</i> , des facteurs de transcription .....	80
c) Les protéines <i>ets</i> , des facteurs de transcription : des confirmations ...	80
3) <i>myc</i> .....	82
a) Domaines fonctionnels de <i>c-myc</i> .....	82
b) La région IV : une région de fixation .....	83
c) <i>myc</i> est-il un facteur de transcription ? .....	83
<b>RESULTATS .....</b>	<b>87</b>
<b>I. LE SYSTEME DES NEURORETINES AVIAIRES .....</b>	<b>88</b>
<b>A. Types cellulaires présents dans la neurorétine en culture .....</b>	<b>88</b>
<b>B. Influence des oncogènes sur la croissance des neurorétines en culture</b>	<b>90</b>
1) Le rétrovirus RSV .....	90
2) <i>v-fos</i> et <i>c-fos</i> .....	90
3) Les mutants du virus MH2 (articles I et II) .....	90



<b>II. INTERFERENCE DES ONCOGENES V-MIL ET V-MYC SUR LA DIFFERENCIATION DES CELLULES DE NEURORETINE D'EMBRYON DE CAILLE DE 6 JOURS .....</b>	<b>95</b>
<b>A. Matériel et méthodes .....</b>	<b>95</b>
1) Les virus.....	95
2) Les cellules .....	95
3) Techniques d'immunofluorescence .....	97
4) Marquages cellulaires, immunoprécipitation, western blot .....	97
5) Anticorps utilisés .....	97
6) Dosage de la mélanine .....	99
<b>B. Résultats .....</b>	<b>99</b>
<b>C. Discussion .....</b>	<b>104</b>
 <b>III. DEUX PROTEINES ONCOGENES NUCLEAIRES, LA P135<sup>gag-myb-ets</sup> ET LA P61/63<sup>myc</sup>, COOPERENT POUR INDUIRE LA TRANSFORMATION DES CELLULES DE NEURORETINE DE POULET (article III) .....</b>	<b>107</b>
<b>A. Introduction .....</b>	<b>107</b>
<b>B. Objectif .....</b>	<b>107</b>
<b>C. Construction des virus et des clones moléculaires .....</b>	<b>107</b>
<b>D. Les critères de la transformation .....</b>	<b>109</b>
<b>E. Résultats .....</b>	<b>109</b>
<b>F. Discussion .....</b>	<b>112</b>
 <b>CONCLUSION .....</b>	<b>113</b>
 <b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>115</b>
 <b>ARTICLES .....</b>	<b>141</b>
 <b>LISTE DES ILLUSTRATIONS</b>	
<b>Fig. 1: La tumorigénèse, un processus multiétape .....</b>	<b>13</b>
<b>Fig. 2: Morphologie d'une particule virale; génome des rétrovirus.....</b>	<b>16</b>
<b>Fig. 3: Mécanisme de la LTR activation .....</b>	<b>18</b>
<b>Fig. 4: Un mécanisme possible pour la formation d'un rétrovirus oncogène .....</b>	<b>20</b>

Fig. 5	: Schéma de l'hématopoïèse .....	23
Fig. 6	: Activité mitogène autocrine de <i>v-sis</i> .....	25
Fig. 7	: Protéines G et transduction du signal .....	27
Fig. 8	: Phosphorylation de la tyrosine 527 de pp60 <sup>c-src</sup> .....	29
Fig. 9	: Seconds messagers .....	31
Fig.10	: Carcinogénèse chimique multiétape .....	33
Fig.11	: Les gènes précoces de polyome .....	36
Fig.12	: Coopération de <i>v-myc</i> et <i>v-ras</i> pour la transformation des fibroblastes embryonnaires de rat .....	39
Fig.13	: Groupes de complémentation .....	41
Fig.14	: Des mécanismes possibles pour la coopération .....	46
Fig.15	: Isolement de c-onc activés par transfection sur NIH3T3 .....	51
Fig.16	: Rétrovirus ayant transduit deux oncogènes .....	53
Fig.17	: Régions promotrices, facteurs de transcription .....	58
Fig.18	: Domaines de fixation à l'ADN (1) .....	60
Fig.19	: Domaines de fixation à l'ADN (2) .....	63
Fig.20	: Domaines d'activation transcriptionnelle .....	65
Fig.21	: Conservation du domaine de fixation de <i>myb</i> à l'ADN .....	74
Fig.22	: Les domaines fonctionnels de <i>myb</i> .....	76
Fig.23	: Consensus de fixation sur l'ADN des gènes de la famille <i>ets</i> .....	81
Fig.24	: Domaines fonctionnels de <i>c-myc</i> .....	84
Fig.25	: Régions de fixation de <i>myc</i> .....	85
Fig.26	: Voies de différenciation des neurorétines .....	89
Fig.27	: Propriétés biologiques des mutants du virus MH2 et expérience de reconstitution .....	91
Fig.28	: Structure des ARN du virus MH2 et caractérisation des mutants MH2-CL25 et MH2-PA200 .....	93
Fig.29	: Courbes de croissance et morphologies des QNR .....	96
Fig.30	: Aspect des cellules en immunofluorescence .....	98
Fig.31	: Immunoprécipitation des protéines virales oncogènes .....	100
Fig.32	: Immunotransferts de marqueurs protéiques de différenciation .....	101
Fig.33	: Répartition des marqueurs de différenciation .....	103
Fig.34	: Influences de <i>mil</i> et <i>myc</i> sur la différenciation des QNR .....	105
Fig.35	: Clones moléculaires .....	108
Fig.36	: Courbes de croissance .....	110
Fig.37	: Critères de transformation .....	111

## PRESENTATION DU MEMOIRE

Ces quinze dernières années, les oncogènes ont envahi la biologie. Primitivement associés aux cancers, ils ont annexé de nombreux autres domaines : différenciation, développement, endocrinologie, régulation génique. Aussi la notion d'oncogène, consacrée par l'usage, déborde-t-elle largement son sens étymologique. Loin de résoudre définitivement le problème des cancers, les oncogènes permettent seulement d'appréhender la complexité de ces pathologies. Depuis le modèle univoque impliquant un seul oncogène dans la transformation, les hypothèses fondées sur l'association synergique de plusieurs oncogènes se sont multipliées. Une chaîne de transmission du signal relayée à tous les niveaux par les oncogènes s'est mise en place de la surface de la membrane cytoplasmique jusqu'au cœur de la double hélice d'ADN.

Dans ce mémoire, nous rapportons des résultats obtenus en étudiant l'influence de l'association de certains oncogènes rétroviraux sur les neurorétines aviaires en culture. Avant d'exposer nos résultats, il nous a donc semblé utile de recenser les principales expériences étudiant la coopération de plusieurs produits dans la transformation. La majorité des oncogènes utilisés dans ce travail sont nucléaires. Aussi avons-nous ensuite orienté notre introduction dans le domaine complexe et mouvant des protéines interagissant dans le noyau de la cellule. Une bibliographie pléthorique existe sur ce sujet. Bien que n'ayant pas évoqué dans ce mémoire de résultats analysant directement les oncogènes sous l'angle transcriptionnel, il nous a semblé intéressant, pour présenter les travaux les plus récents concernant les oncogènes nucléaires, de rédiger un chapitre sur les facteurs de transcription. Cette introduction a été conçue comme un outil de travail permettant de comprendre et d'élaborer de nouvelles hypothèses à partir des observations sur la coopération d'oncogènes nucléaires dans la transformation des neurorétines.

Les résultats sont divisés en trois parties. Nous présentons tout d'abord des travaux concernant des mutants du virus MH2 dans le système des neurorétines aviaires. Dans un deuxième temps nous avons essayé de comprendre les modifications intervenant dans la différenciation des cellules de neurorétine. Enfin nous avons analysé l'effet de la combinaison de plusieurs oncogènes sur la prolifération et la différenciation des neurorétines. Parmi ces combinaisons, l'une d'entre elles s'est révélée particulièrement efficace pour la transformation. Mais à l'encontre du dogme établi par R.Weinberg à partir de 1985 selon lequel les coopérations dans la transformation nécessitent un oncogène à localisation nucléaire et un oncogène à localisation extranucléaire, notre travail a permis de démontrer que la coopération entre oncogènes nucléaires était possible et efficace.

## INTRODUCTION

Le développement de la plupart des cancers humains se déroule en différentes étapes s'étendant sur plusieurs années. Le cancer du col utérin débute histologiquement par l'apparition d'un groupe de cellules présentant des capacités de multiplication anormalement grandes : c'est la dysplasie du col ; ces cellules tendent à disparaître, mais parfois, parmi elles, émergent certains clones présentant des atypies cellulaires : c'est le carcinome *in situ* ; enfin parmi ces cellules atypiques un cancer épithélial invasif peut débiter puis s'étendre (Cairns et Logan, 1983). Trois propriétés semblent donc présider à l'établissement d'un cancer : la levée des contraintes d'organisation spatiales, la levée des règles de différenciation, la levée des limitations temporelles.

Cette notion d'oncogénèse multiétape issue de la clinique s'est également imposée en cancérogénèse chimique (Hennings et al., 1983). Trois étapes ont été caractérisées en fonction de l'action des substances chimiques : l'initiation qui autorise la cellule normale à entrer dans un cycle de prolifération, la promotion qui assure la transition de la cellule initiée à la cellule tumorale et la progression qui aboutit à la cellule maligne.

Cet abord théorique, jusqu'à un passé récent, ne trouvait pas de substratum moléculaire. La découverte d'une famille de gènes hautement conservés dans le règne animal et homologues à certains gènes de virus à ARN susceptibles d'induire des cancers chez leurs hôtes, a orienté significativement les recherches en cancérologie vers des cibles moléculaires (Stéhelin et al., 1976 a et b). Dans un lymphome humain, le lymphome de Burkitt (Klein, 1983) et dans certaines leucémies, les leucémies myéloïdes chroniques (Bartram et al., 1983) connus pour présenter des réarrangements chromosomiques (translocation 8-14 et chromosome philadelphie), les équivalents cellulaires (appelés proto-oncogènes) des gènes transformants de certains rétrovirus (virus de la myélocytomatose aviaire et virus de la leucémie murine d'Abelson) se sont trouvés impliqués dans ces remaniements. A la même époque des chercheurs découvraient que l'ADN de plusieurs tumeurs épithéliales humaines (cancer de la vessie) (Santos et al., 1982) était susceptible de transformer des cellules de souris en culture initiées (lignée NIH 3T3) ; la séquence transformante impliquée a pu être identifiée comme étant l'un de ces proto-oncogènes.

Ainsi divers modes de cancérogénèse utiliseraient un nombre restreint de mécanismes cellulaires centrés sur les proto-oncogènes. La découverte de plusieurs autres proto-oncogènes dont les fonctions pourraient théoriquement s'enchaîner sur une voie métabolique allant de la membrane cellulaire jusqu'à l'intérieur du noyau au contact de l'ADN permettait enfin de concevoir un modèle moléculaire des cancers (Weinberg, 1985). L'activation successive de plusieurs oncogènes situés

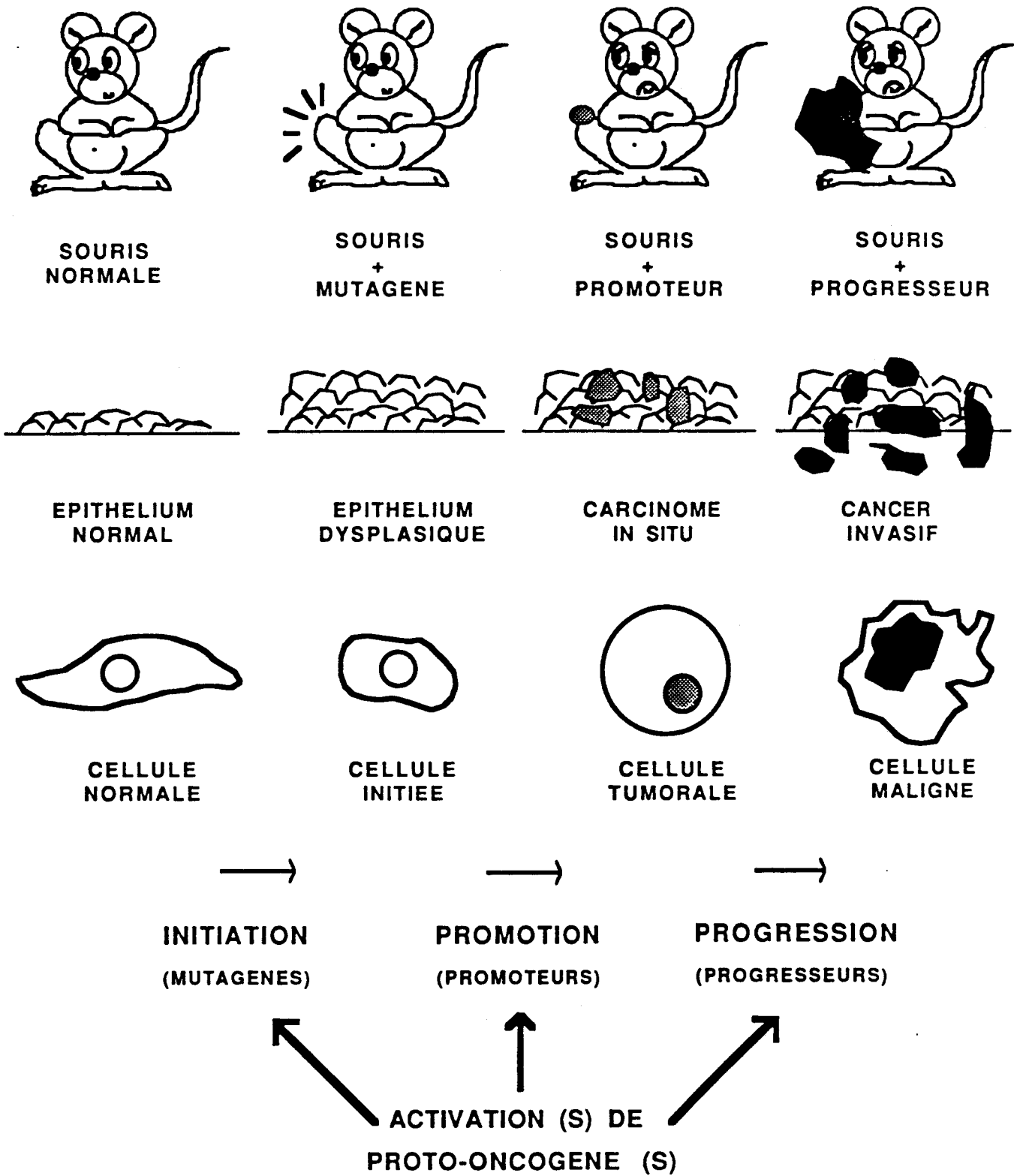


figure 1 : La tumorigénèse, un processus multiétape

sur cette voie métabolique venait étayer les observations de cancérogénèse multiétape, chaque étape étant associée à l'activation d'un proto-oncogène.

Après quelques généralités sur les rétrovirus oncogènes et les critères de la transformation cellulaire, nous évoquerons rapidement les oncogènes. Nous analyserons ensuite les différents modèles de coopération impliquant les oncogènes dans des systèmes *in vitro* et *in vivo*. Nous approfondirons enfin la description des facteurs de transcription au travers de certains oncogènes à localisation cellulaire, les oncogènes *myb*, *ets* et *myc* .

## I. GENERALITES

### A. LES RETROVIRUS

Les cancers proviennent de la croissance et de la division non contrôlées d'un nombre restreint de cellules. Cette multiplication cellulaire est sous la dépendance de gènes qui normalement contrôlent la prolifération et la différenciation. Ces gènes, sous certaines conditions, sont susceptibles d'induire un processus de transformation. La découverte de ces gènes a été possible grâce, entre autres, à l'étude des rétrovirus oncogènes. Parmi l'ensemble des rétrovirus, les rétrovirus d'origine aviaire constituent un système d'étude intéressant car ces virus sont répertoriés et étudiés depuis longtemps. Les descriptions qui vont suivre se réfèrent essentiellement au système aviaire.

Les rétrovirus sont des virus à ARN (revue : Weiss et al., 1982 ; 1985). Ils infectent les cellules eucaryotes. La réplication de leur génome passe par la formation d'un ADN intermédiaire, double brin, synthétisé par une enzyme spécifique, la rétrotranscriptase (ou rétopolymérase, ou ADN-polymérase-ARN dépendante), à partir d'une matrice constituée par l'ARN viral (Baltimore, 1970 ; Temin et Mizutami, 1970). Parmi ces rétrovirus, les oncovirus ou rétrovirus oncogènes induisent toute une variété de cancers chez l'animal, dans des délais souvent très courts. C'est grâce à ces rétrovirus oncogènes qu'un modèle expérimental d'étude de la cancérogénèse en particulier au niveau moléculaire, a pu être défini. Le premier rétrovirus sarcomatogène fut isolé par Rous, chez le Poulet, en 1911. Depuis, chez de nombreux vertébrés, d'autres oncovirus ont pu être étudiés. La structure de ces virus, l'organisation de leur génome et leur mode de réplication sont semblables à ceux des rétrovirus aviaires (figure 2).

Le génome des rétrovirus est diploïde. Il est constitué par deux ARN monocaténares de 8 à 9 kb contenant les capacités codantes pour 3 gènes majeurs nécessaires au cycle infectieux :

- le gène *gag* code pour les protéines de la nucléocapside du virion (ou "core"),
- le gène *pol* code pour la rétrotranscriptase dont le rôle est de transcrire l'ARN simple brin en ADN double brin pour s'intégrer sous forme de provirus dans le génome de la cellule infectée,
- le gène *env* code pour les protéines d'enveloppe.

Deux sortes d'oncovirus peuvent être distingués selon leur pouvoir oncogène :

- Les ALV : "Avian Leukaemia Viruses" peu ou non oncogènes *in vivo* et non transformants *in vitro*,
- les DLV : "Defective Leukaemia Viruses" induisant rapidement des cancers *in vivo* et capables de transformer des cellules en culture.

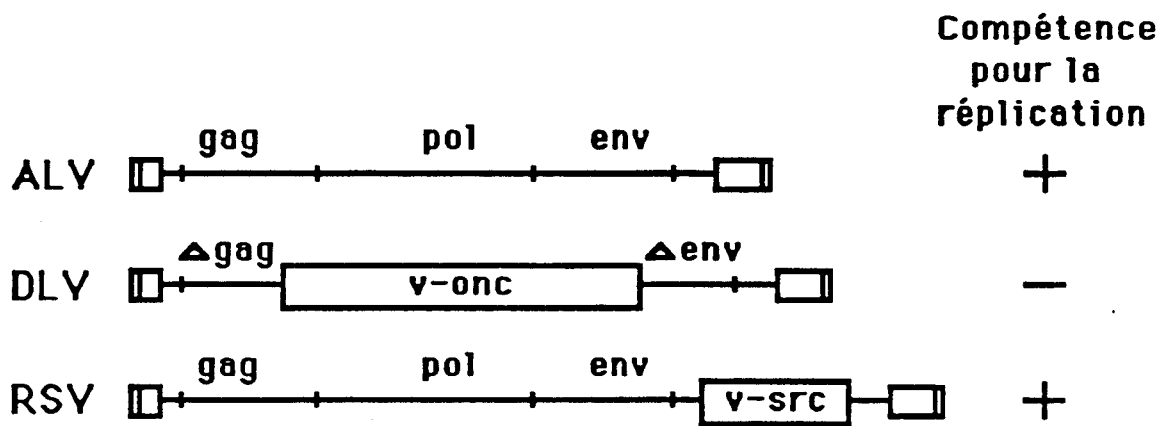
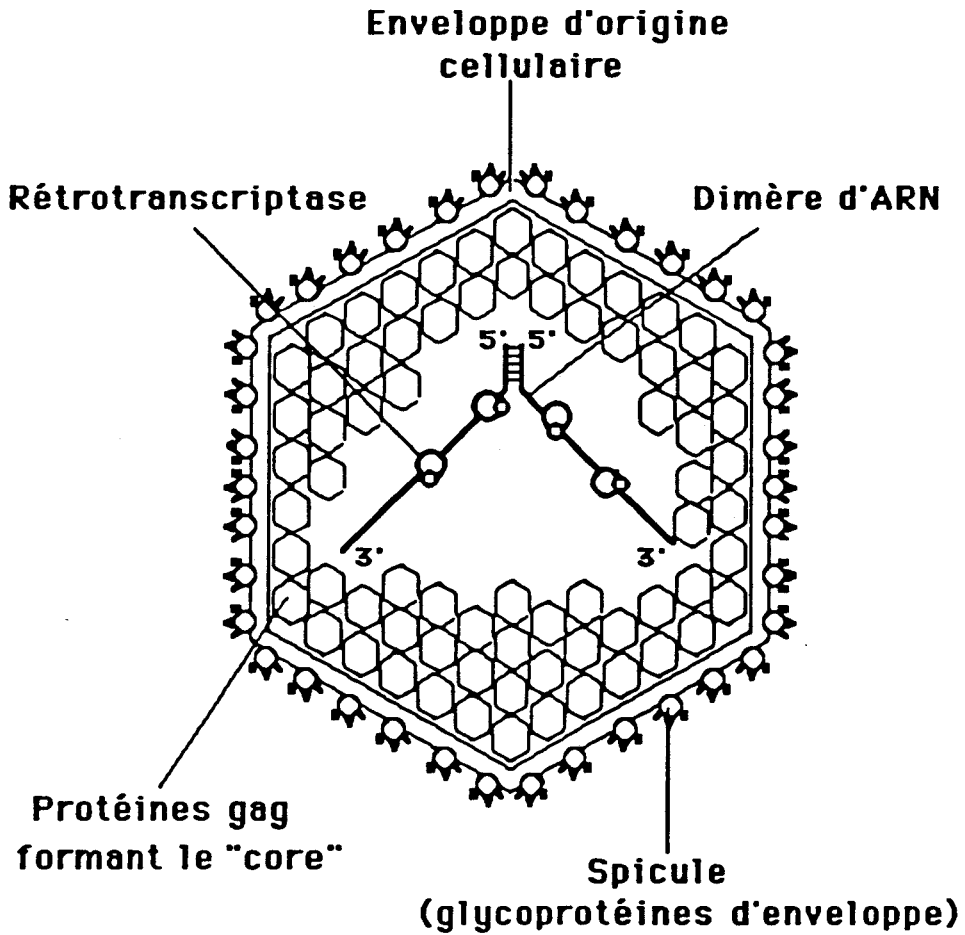


figure 2 : Morphologie d'une particule virale  
Génome des rétrovirus



Ces différences d'effet biologique se retrouvent au niveau du contenu génétique : le génome des ALV ne contient que les séquences nécessaires au cycle infectieux ; le génome des DLV en revanche a perdu tout ou partie des séquences virales nécessaires au cycle infectieux et les a remplacées par des séquences d'origine cellulaire (*v-onc*).

Les DLV ont donc besoin pour se propager d'un virus auxiliaire, un ALV ( en anglais helper). Seule exception, le virus du sarcome de Rous (RSV) porteur de l'oncogène *v-src*, compétent pour la réplication (Rous et Murphy, 1911 ; Martin, 1970 ; Duesberg et Vogt, 1970 ; Stéhelin et al., 1976a).

### 1) Les ALV

Ces virus sont compétents pour la réplication et ne possèdent pas de *v-onc*. Ils peuvent induire chez l'animal des cancers dont le temps d'apparition est habituellement long (de 6 à 12 mois) et dont l'efficacité d'apparition est généralement faible (20 à 60 % des animaux infectés développent une leucémie) (Neel et al., 1981). En revanche, ces virus ne transforment pas à proprement parler les cellules en culture.

Un mécanisme de transformation possible pour ces virus leucémogènes non ou peu transformants est l'insertion d'un provirus à proximité d'un proto-oncogène. Ce gène passe alors sous le contrôle des séquences promotrices et activatrices contenues dans les LTR (en anglais Long Terminal Repeat) de l'ALV : c'est une LTR activation (figure 3). Ce type d'activation a déjà été démontré dans certaines tumeurs. Des proto-oncogènes, déjà connus en tant que *v-onc* ont ainsi été retrouvés (*c-mos*, *c-myb*, *c-myc*, *c-Ha-ras*, *c-fms*, *c-spi-1*; Payne et al., 1982 ; Shen Ong et al., 1986 ; Westaway et al., 1986 ; Gisselbrecht et al., 1987 ; Moreau-Gachelin et al., 1988). La LTR activation du gène *c-myc* a beaucoup été étudiée dans des lymphomes B et des lymphomes T, chez le Poulet et la Souris (Hayward et al., 1981 ; Corcoran et al., 1984 ; Linial et Groudine, 1985). Un ALV ou un MuLV (en anglais Murine Leukaemia Virus) est intégré à proximité ou dans le locus *c-myc*. La plupart des virus intégrés sont incomplets, certains mêmes étant réduits à 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 de ses promoteurs propres sont activés par les séquences activatrices du LTR proviral. Ces séquences LTR peuvent être intégrées en 5' ou en 3' du *c-onc* et dans une quelconque orientation (Khoury et Gruss, 1983).

Un grand nombre de pathologies induites par ce processus de LTR activation est maintenant connu. Ainsi une pathologie bien typée peut parfois être associée avec l'activation d'un proto-oncogène défini. C'est le cas des érythroblastoses et de certains lymphomes développés chez le Poulet. Selon les expériences, 45 à 90 % des poulets développant des érythroblastoses possèdent dans leur

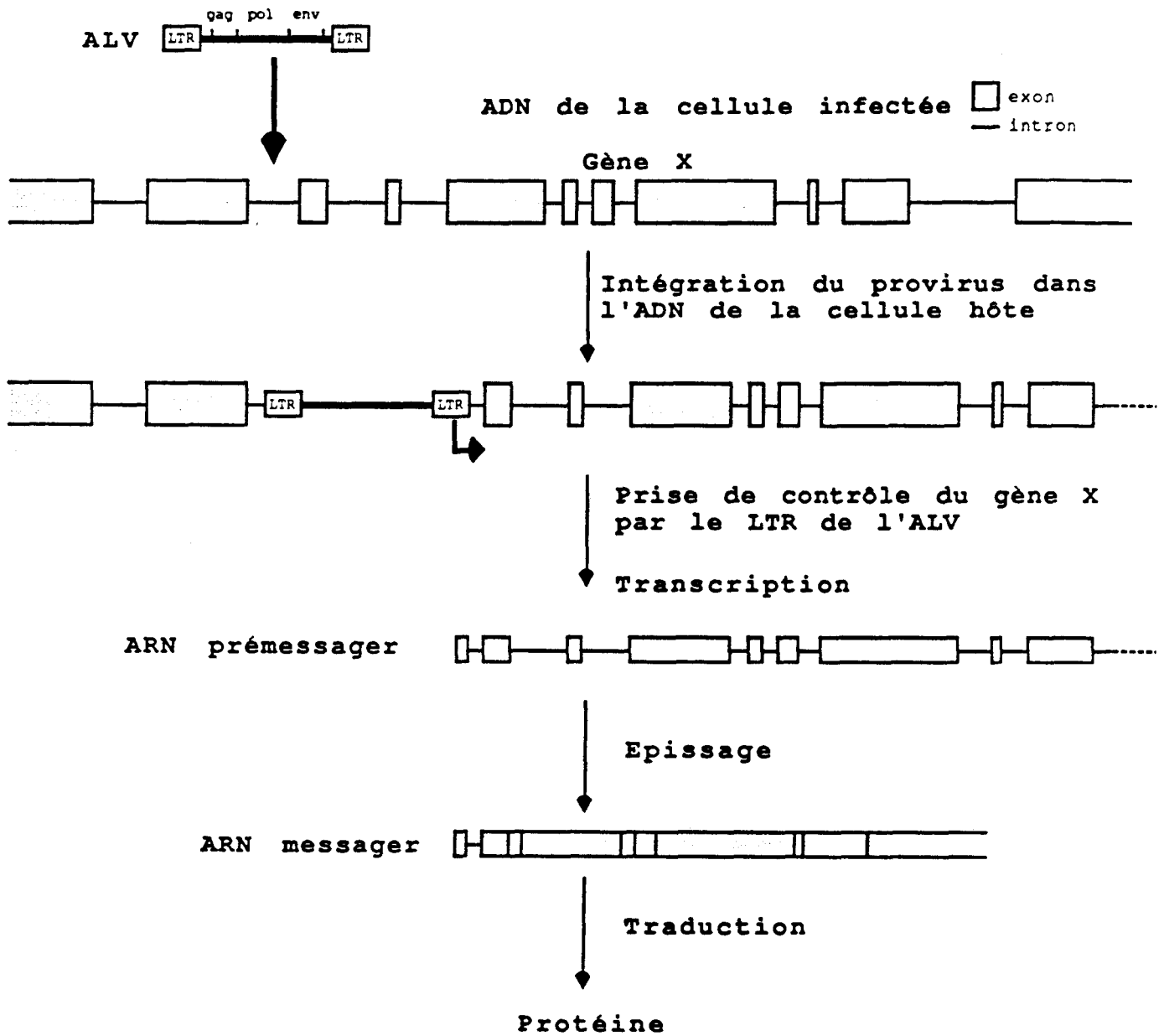


figure 3 : Mécanisme de la LTR activation

génomique une version activée du proto-oncogène *c-erbB* (Raines et al., 1985) tandis qu'il s'agit d'une version activée de *c-myc* dans 85 % des cas de lymphomes viro-induits (Hayward et al., 1981).

Le gène activé ou amplifié n'est pas nécessairement un proto-oncogène. Il peut s'agir également d'un gène codant pour un facteur de croissance des cellules hématopoïétiques (IL3, IL2...) (Ymer et al., 1985 ; Chen et al., 1985). L'activation transcriptionnelle de ces gènes est une des étapes amenant la transformation de la cellule. En effet, la cellule hématopoïétique produisant son propre facteur de croissance devient ainsi indépendante de l'addition exogène de ce facteur. C'est un événement fréquemment observé dans la progression de ces cellules vers la tumorigénicité (Heard et al., 1984 ; Sporn et Roberts, 1985).

## 2) Les DLV

Il s'agit de virus défectifs pour la réplication. Ils peuvent contenir un ou deux oncogènes (*v-onc*) ayant des équivalents cellulaires (*c-onc*) (figure 4). Plusieurs rétrovirus ont déjà été isolés à partir de tumeurs solides ou de leucémies, principalement chez le poulet (Beard, 1963 ; Graf et Beug, 1978 ; Moscovici et Gazzolo, 1982). *In vivo*, ces virus induisent des cancers "aigus" 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 ; Weiss et al., 1985). *In vitro*, ils stimulent la prolifération de cellules et/ou bloquent les programmes de différenciation. Certains de ces virus sont susceptibles d'induire des sarcomes ou des carcinomes *in vivo* et de transformer des fibroblastes *in vitro*.

Chaque oncogène, et par extension le gène cellulaire correspondant ou proto-oncogène, est désigné par un code de trois lettres dérivant :

- soit du nom du virus à partir duquel la séquence a été isolée (ex : l'oncogène *v-mil* du rétrovirus Mill Hill 2 (MH2),
- soit du nom de celui qui l'a identifié pour la première fois (ex : *Abl* de Abelson),
- soit de l'abréviation du nom de la maladie induite (ex : *src* pour sarcome).

Plusieurs oncogènes semblables ayant été trouvés dans différents isolats, ce code de trois lettres est souvent précédé par le nom ou le préfixe du virus correspondant (ex : *Ha-ras*, *Ki-ras* isolés des virus Harvey et Kirsten). Les préfixes *v-* et *c-* indiquent qu'il s'agit du gène viral ou de son équivalent cellulaire.

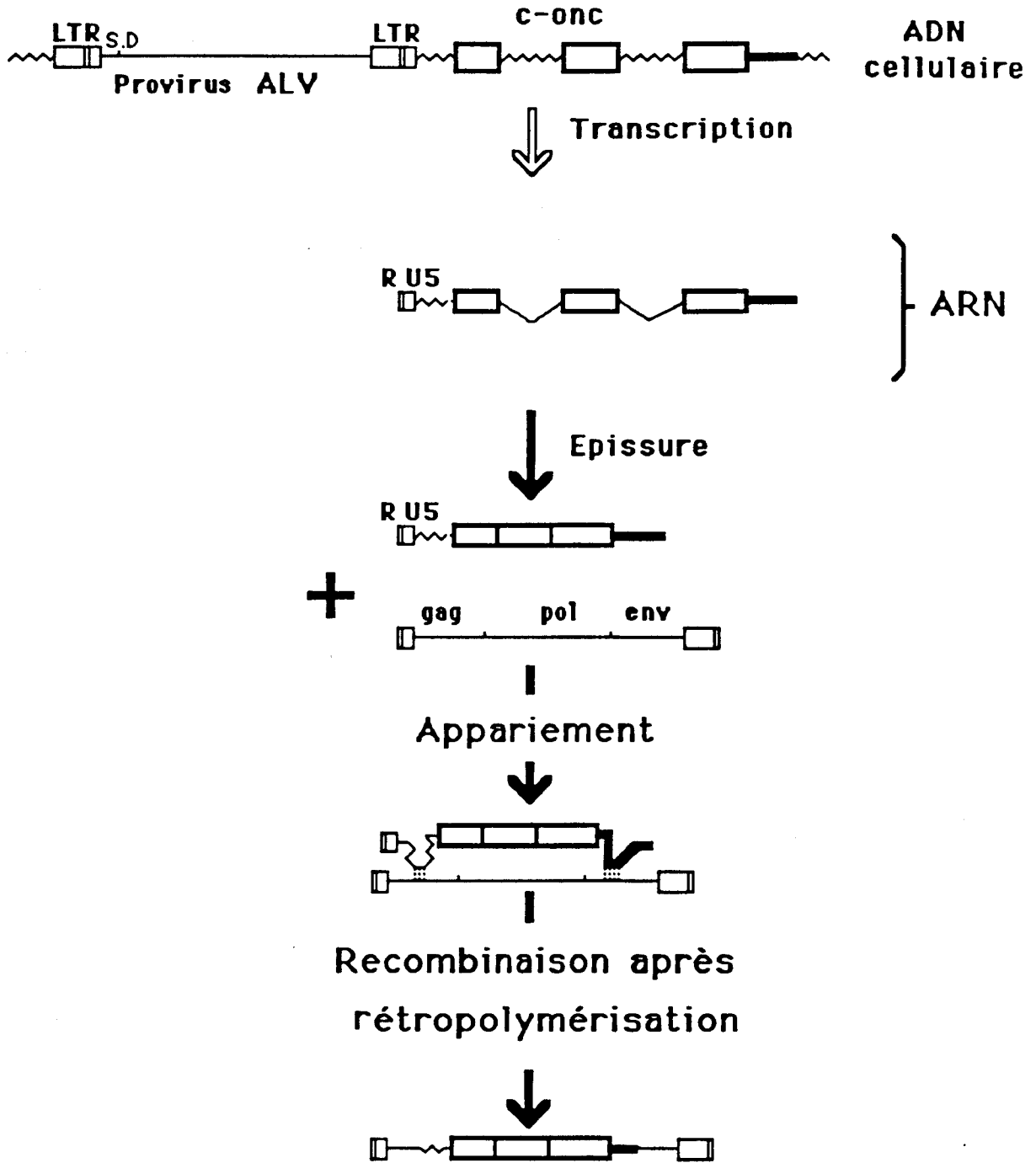


figure 4 : Un mécanisme possible pour la formation d'un rétrovirus oncogène

## B. LES CRITERES DE LA TRANSFORMATION CELLULAIRE

### 1) La transformation des cellules non hématopoïétiques

*In vivo*, la détection du pouvoir transformant d'un virus est simple : l'inoculation de quelques particules de virus sarcomatogène, comme le RSV-PR-C, à un animal susceptible provoque en une semaine une tumeur au point d'inoculation (Rous, 1911). *In vitro*, les fibroblastes aviaires infectés par ce même virus vont présenter, après quelques jours de culture, une série de modifications évidentes. Les cellules deviennent rondes et réfringentes, traduisant ainsi les changements que subit le cytosquelette (Edelman et Yahara, 1976). De nouvelles caractéristiques de croissance apparaissent. Sur substrat solide, les fibroblastes transformés ont besoin de concentrations de sérum moins élevées que les cellules saines pour se multiplier, perdent l'inhibition de contact caractérisant les cellules normales (Dulbecco, 1970) et peuvent également donner naissance à des colonies en milieu semi-solide (agarose ou méthylcellulose) (Stoker et al., 1968). Des modifications de la membrane plasmique interviennent : des néo-antigènes de surface surgissent (Kurth et Bauer, 1975) associés à des modifications des glycoconjugués, alors que d'autres protéines disparaissent, comme la fibronectine (Olden et Yamada, 1977). Des modifications du métabolisme apparaissent : le transport des sucres est considérablement augmenté dans les cellules transformées (Hatanaka, 1974), des protéases sont excrétées, tel l'activateur du plasminogène (Reich, 1976). Enfin, au niveau génique, on estime qu'un millier de transcrits nouveaux sont induits dans les cellules transformées par le RSV (Groudine et Weintraub, 1980).

La plupart de ces observations sont valables quelque soit l'agent transformant (Kahn et Shin, 1979) mais apparemment, seule la capacité à former des colonies en milieux semi-solides semble être liée (mais pas à 100 %) avec la tumorigénicité de ces cellules chez un animal syngénique ou à défaut chez les souris nude, qui ne présentent que très peu de phénomènes de rejet (Kahn et Shin 1979). Posséder un marqueur fiable de la tumorigénicité est utile, car le degré de transformation conféré *in vitro* aux cellules par un même agent peut varier considérablement d'un système biologique à l'autre, et il existe certains virus oncogènes ainsi que de nombreuses substances chimiques qui peuvent ne conférer aux cellules qu'un phénotype transformé partiel (Kahn et al., 1982). La part revenant à chacune des modifications décrites plus haut dans l'acquisition de la capacité tumorigène est variable d'un système cellulaire à l'autre. Le produit de l'oncogène induit le phénotype transformé, comme l'ont bien montré les mutants de virus oncogènes ainsi que les réversions phénotypiques obtenues après disparition ou suppression transitoire du produit de l'oncogène impliqué (Quade et al., 1981 ; Drebin et al., 1985). Le mode d'action du produit est différent selon le type d'oncogène, mais il se dégage actuellement quelques grands groupes fonctionnels incluant la plupart des oncogènes connus. Toutefois, si des mécanismes initiateurs de la transformation sont

établis, l'enchaînement des événements aboutissant au phénotype transformé n'est pas encore compris.

## 2) La transformation des cellules hématopoïétiques

Dans les lignées hématopoïétiques, les problèmes de différenciation vont dominer ceux de la transformation (figure 5). Ces cellules se multiplient en suspension et poussent naturellement dans un milieu semi-solide. Cette propriété prive l'expérimentateur d'un moyen simple de caractériser *in vitro* la transformation. Les cellules hématopoïétiques transformées proviennent souvent de la prolifération d'une cellule immature morphologiquement indistinguishable de son équivalent normal. Les cellules hématopoïétiques dérivent d'une cellule souche indifférenciée, douée d'un grand pouvoir de multiplication afin de pouvoir répondre aux exigences de l'organisme. Cette cellule souche va se différencier, perdre graduellement son pouvoir prolifératif et sa capacité à donner plusieurs types cellulaires distincts (Clarkson et al., 1978). Cette différenciation ne s'effectue pas au hasard, mais en réponse à des inducteurs précis émis par différents types de cellules (Cline et Gold, 1979 ; Whetton et Dexter, 1986). Toutes les substances intervenant dans le contrôle de l'hématopoïèse ne sont pas connues, mais un certain nombre d'entre elles ont pu être caractérisées (Krantz et Goldwasser, 1984 ; Metcalf, 1985).

L'intervention des oncogènes dans la transformation des cellules hématopoïétiques est importante, puisque la plupart des rétrovirus peuvent être leucémogènes (Clarkson et al., 1978). Il existe une spécificité entre le type de cellule transformée et le type d'oncogène actif (Graf et al., 1980), bien que plusieurs oncogènes différents puissent interférer avec des cellules de la même lignée sanguine ; c'est le cas de la lignée érythroïde qui peut être perturbée par les oncogènes *myb-ets*, *erb*, *ras*, *abl* et *fps* (Graf et al., 1986). Quand leur différenciation peut s'effectuer, les cellules hématopoïétiques transformées perdent leurs caractéristiques tumorales et participent au fonctionnement de l'organisme (Gootwine et al., 1982) imitant ainsi d'autres types cellulaires (cellules de tératocarcinomes) où une perturbation de la différenciation est responsable du phénotype transformé (Mintz et Illmensee, 1975). De nombreuses études montrent que les cellules hématopoïétiques infectées par des rétrovirus sans oncogène se transforment de façon progressive : elles deviennent, par paliers, insensibles aux différents facteurs de croissance spécifiques, puis franchement tumorigènes (Tambourin et al., 1981 ; Heard et al., 1984 ; O'Donnell et al., 1985) suggérant ainsi l'implication de plusieurs gènes cellulaires dans ce processus.

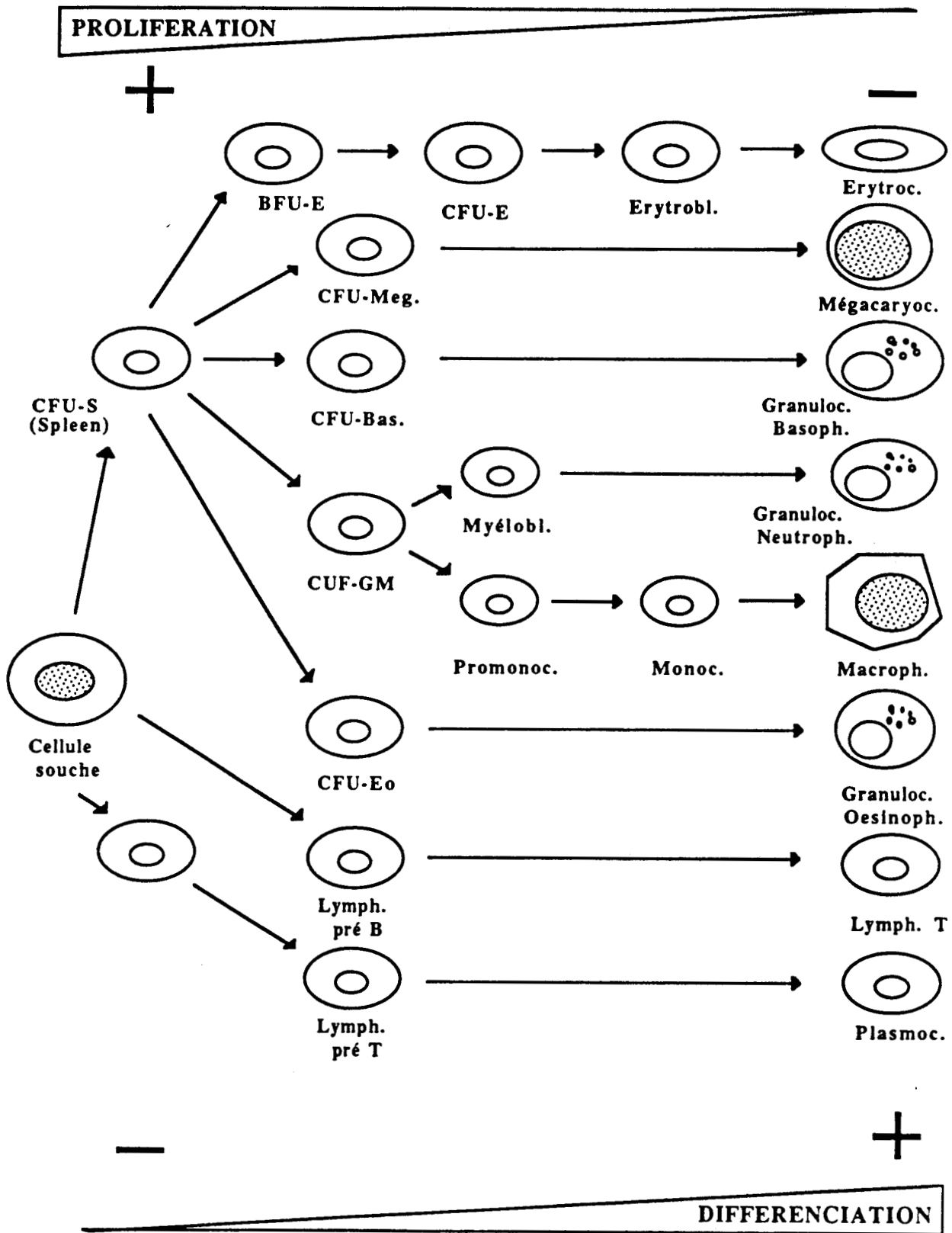


figure 5 : Schéma de l'hématopoïèse

## C. LES ONCOGENES

En 1976, Stéhelin et al. démontrent que l'oncogène *v-src* provient d'une séquence d'origine cellulaire transduite dans le génome d'un rétrovirus aviaire. Cette séquence cellulaire de poulet existe également dans le génome humain. Depuis, tous les oncogènes isolés se sont montrés être phylogénétiquement conservés. Cette propriété suggère un rôle important, sinon essentiel pour la vie d'une cellule (Bishop, 1981).

Sur la base de la fonction, connue ou présumée et de la localisation de leur produit les oncogènes peuvent être classés parmi cinq groupes :

- les protéines homologues à un facteur de croissance,
- les protéines de la famille *ras*,
- les protéines kinases,
- une protéine homologue à la phospholipase C,
- les protéines nucléaires.

Pour chaque groupe, nous prendrons comme exemple un oncogène, pouvant être considéré comme une étape dans le processus de transmission des informations extérieures jusqu'à l'ADN.

### 1) Les protéines homologues à un facteur de croissance

C'est le cas de l'oncogène *v-sis*, homologue à la sous unité  $\beta$  du PDGF (Platelet Derived Growth Factor) (Doolittle et al., 1983 ; Waterfield et al., 1983) (figure 6). Le gène *v-sis* est traduit sous la forme d'une protéine de 28 kD qui s'assemble en un homodimère de 56 kD. Cet homodimère est clivé pour donner un homodimère plus court de 24 kD dont la structure est similaire à un homodimère  $\beta$  du PDGF, puis cette protéine est excrétée (Deuel et al., 1983 ; Owen et al., 1984). Le produit de *v-sis* a alors une activité mitogène autocrine, bloquée par l'addition d'anticorps anti-PDGF (Deuel et al., 1983). Seules les cellules exprimant le récepteur du PDGF sont transformées par *v-sis* (Leal et al., 1985). *v-sis* peut également s'associer avec son récepteur à l'intérieur même de la cellule (Keating et al., 1988). Cette situation peut expliquer la perte de contrôle de la mitose observée dans les cellules transformées et permet de concevoir un modèle d'intervention des oncogènes cellulaires dans les processus de prolifération des cellules normales.

### 2) Les protéines de la famille *ras*

Cette famille possède trois représentants très proches : *Ha-ras* et *Ki-ras*, transduits dans des rétrovirus murins (Chien et al., 1979 ; Ellis et al., 1981) et *N-ras* identifié comme gène transformant dans une lignée de neuroblastome (Shimizu et al., 1983a) ; d'autres oncogènes ont récemment été rattachés à ce groupe. Les gènes de la famille *ras* ont été trouvés activés dans 15 à 20 % des tumeurs humaines (Shimizu et al., 1983 b et c). Les produits de traduction des gènes *ras* viraux et cellulaires



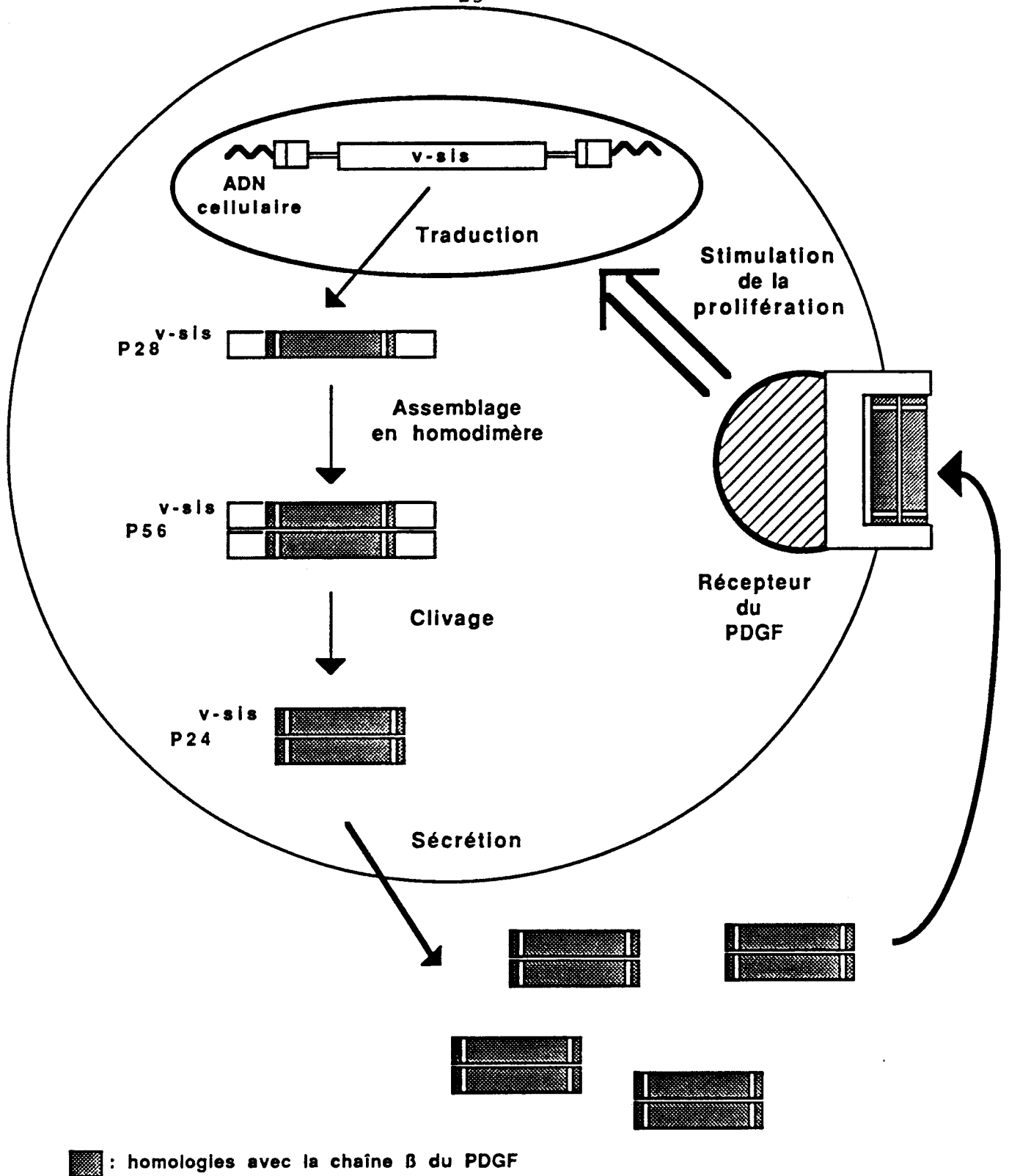


figure 6 : Activité mitogène autocrine de v-sis

sont localisés sur la face interne de la membrane cytoplasmique cellulaire. Ces protéines mutées dans leur capacité de fixation à la membrane perdent leurs propriétés transformantes (Willingham et al., 1980 ; Willmusen et al., 1984 a et b).

Les protéines *ras* cellulaires présentent des propriétés similaires à celles des protéines G intervenant dans la modulation de la transduction des signaux extracellulaires à travers la membrane cytoplasmique (Gilman, 1984) (figure 7). La séquence peptidique de *c-ras* présente des homologies avec la sous unité  $\alpha$  des protéines Gs (activation de l'adénylate cyclase en réponse à des stimulus de type  $\beta$  adrénergiques), Gi (inhibition de l'adénylate cyclase et activation de la phospholipase C) (Barbacid, 1987), Go et de la transducine (régulation de l'activité cGMP phosphodiesterase) (Itoh et al., 1986).

Ces exemples illustrent l'implication d'oncogènes cellulaires dans les étapes de transduction des signaux, dont l'autonomisation peut directement contrôler l'activation ou l'inhibition des processus de transfert des signaux de prolifération.

### 3) Les protéines kinases

Ces protéines sont essentiellement de deux types :

- les protéines kinases spécifiques des résidus tyrosine,
- les protéines kinases spécifiques des résidus sérine et thréonine.

#### a) Les protéines tyrosine-kinases

Le produit de traduction de *v-src*, la pp60<sup>v-src</sup> fut la première protéine pour laquelle une activité kinase spécifique de résidus tyrosine a été démontrée (Levinson et al., 1978). Alors que la phosphorylation des résidus tyrosine est un événement rare dans une cellule normale (moins de 1 % de la phosphorylation des acides aminés), près de la moitié des protéines oncogènes connues possèdent cette activité. Selon leur localisation, on distingue deux groupes :

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

#### $\alpha$ ) Les protéines associées à la face interne de la membrane cytoplasmique

Les capacités du virus RSV à transformer des fibroblastes *in vitro* et à être tumorigène *in vivo* résident dans l'expression de la protéine tyrosine kinase pp60<sup>v-src</sup>. C'est la myristylation du résidu

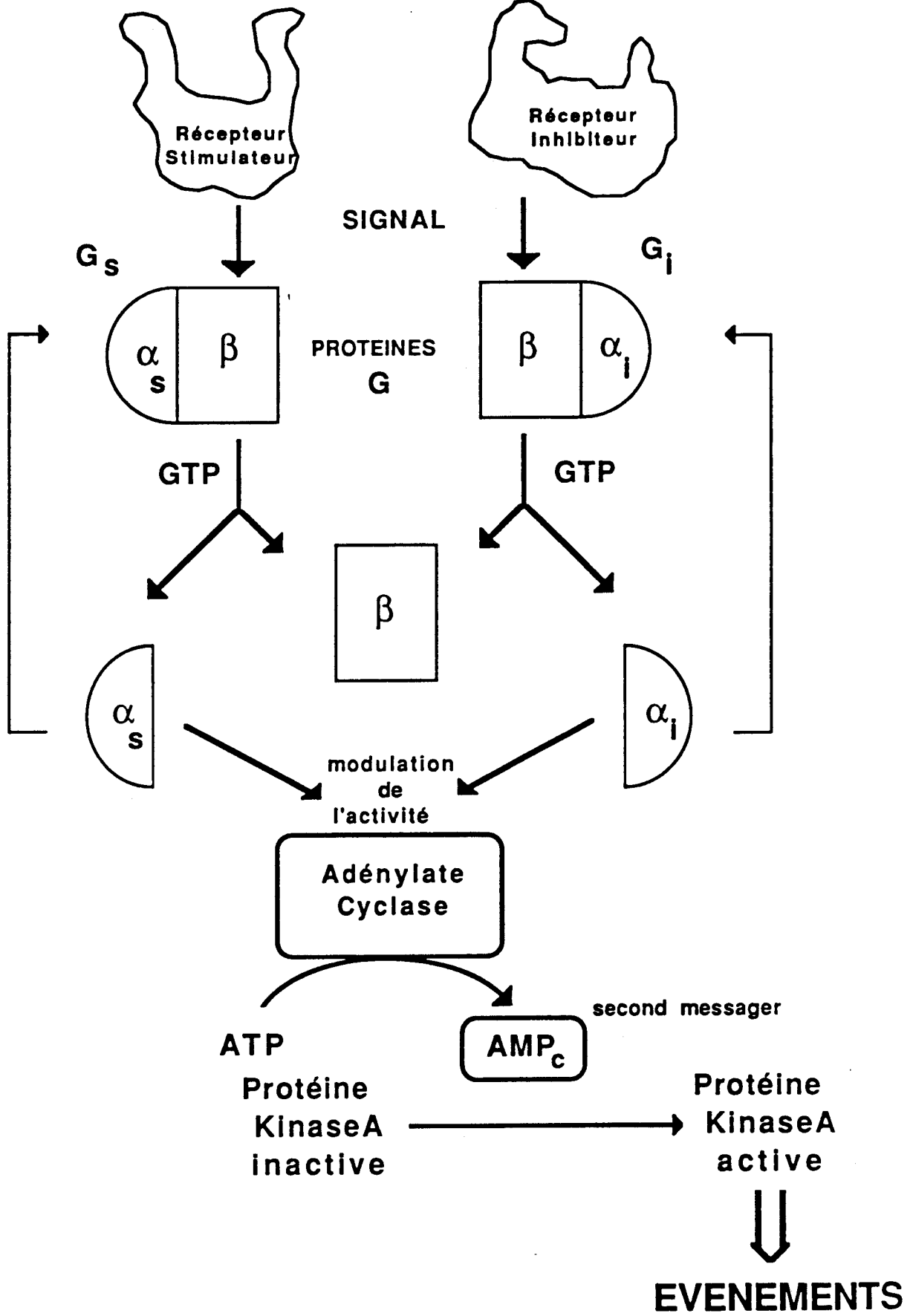


figure 7 : Protéines G et transduction du signal

glycine 2 (Sefton et al., 1982 ; Buss et Sefton, 1985) qui assure l'association de la fixation à la membrane. La disparition de cette propriété de fixation par mutation de la glycine supprime les propriétés transformantes de l'oncogène sans altérer l'activité kinase *in vitro* (Kamps et al., 1986a). La protéine cellulaire pp60<sup>c-src</sup> est structurellement proche de la pp60<sup>v-src</sup> (Opperman et al., 1979). C'est une protéine kinase spécifique des résidus tyrosine, mais son activité est environ 10 fois plus faible que celle de la pp60<sup>v-src</sup> (Iba et al., 1985a) (figure 8). De plus la pp60<sup>c-src</sup> exprimée à des taux équivalents à la pp60<sup>v-src</sup> n'est pas susceptible d'induire la transformation (Iba et al., 1985a). Alors que le site principal de phosphorylation de la pp60<sup>v-src</sup> est la tyrosine en position 416, la pp60<sup>c-src</sup> est phosphorylée sur une tyrosine en position 527, absente de la forme virale (Cooper et al., 1986a). Lorsqu'on remplace la tyrosine en position 527 par un résidu phénylalanine, la protéine devient capable de transformer des fibroblastes embryonnaires et de les rendre tumorigènes et son activité kinase, considérablement augmentée, est comparable à celle de la protéine virale (Piwnicka-Worms et al., 1987 ; Kmiecik et Shalloway, 1987).

### β) Les protéines transmembranaires

Le produit de traduction de l'oncogène *v-erbB* est une protéine transmembranaire (Privalsky et al., 1983) correspondant à une version du récepteur de l'EGF tronquée dans sa partie aminoterminal de fixation à l'EGF et dans une portion du domaine carboxyterminal (Downward et al., 1984). *v-erbB* pourrait donc correspondre à une version activée de manière constitutive du récepteur de l'EGF. Comme la protéine virale, le récepteur de l'EGF est une glycoprotéine transmembranaire dotée d'une activité tyrosine-kinase (Kris et al., 1985). Pour étudier l'importance de la fonction kinase en tant qu'intermédiaire entre la fixation de l'EGF (le stimulus) et la prolifération cellulaire (la réponse), un mutant dénué d'activité kinase a été construit (Honegger et al., 1987). La fixation de l'EGF sur le récepteur non muté augmente l'activité kinase qui phosphoryle des substrats pouvant intervenir dans la prolifération ; lorsque le récepteur est muté, le signal mitotique n'est plus transmis.

### b) Les protéines sérine/thréonine-kinases

C'est la famille de kinases la plus représentée dans la cellule. Cependant seuls trois oncogènes sont actuellement connus pour présenter cette activité : *v-mos* chez le Poulet (Kloetzer et al., 1983), *v-mil* chez le Poulet et *v-raf* homologue de *v-mil* chez la Souris (Moelling et al., 1984). L'activité kinase du produit de traduction de *mos* est indissociable de la transformation (Hannink et Donoghue, 1985). Assez peu d'informations existent tant sur les fonctions que sur la localisation des protéines cellulaires *mil* et *raf*. Les implications des protéines *mil* et *raf* dans la transformation passent par des LTR activations et par des délétions dans le domaine aminoterminal (Dozier et al., 1987) qui semblent présenter un rôle de régulation négative.

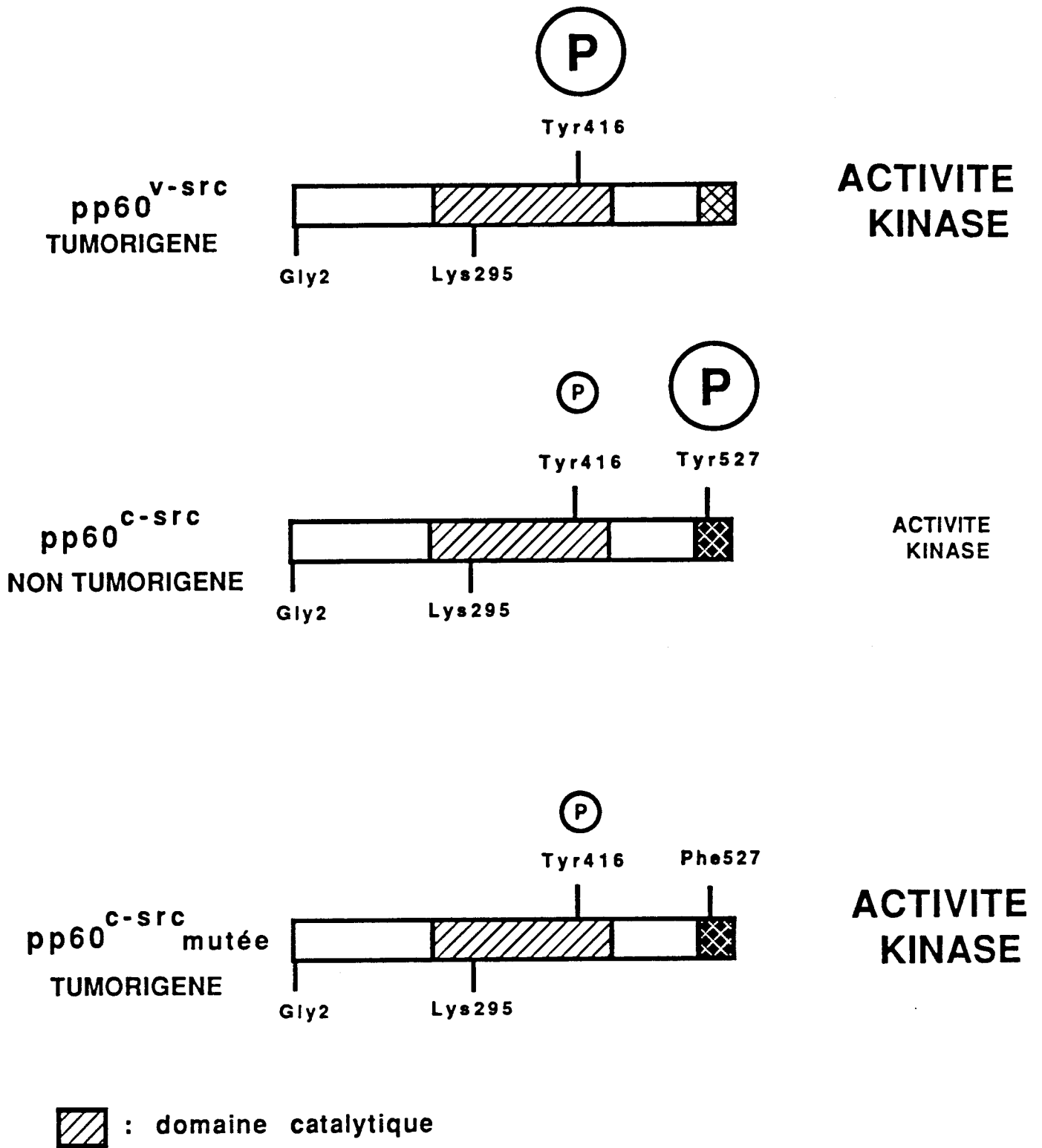


figure 8 : Phosphorylation de la Tyrosine 527 de pp60<sup>c-src</sup>

#### 4) La protéine homologue à la phospholipase C

L'oncogène *v-crk* a été isolé à partir du rétrovirus transformant de Poulet CT10 (Mayer et al., 1988). Son produit de traduction présente des homologies avec la phospholipase C (Mayer et al., 1988 ; Stahl et al., 1988). Les phospholipases sont des enzymes qui dégradent des phospholipides : la phospholipase C dégrade le phosphatidyl inositol biphosphate (PIP 2) en diacylglycerol (DAG) et en inositol triphosphosphate (IP3). Le DAG et l'IP3 font partie des molécules appelées seconds messagers, intermédiaires métaboliques dans la réponse à des stimulus externes (figure 9). Ce sont également des activateurs de protéines kinases. La protéine p47<sup>gag-crk</sup> peut moduler l'activité des protéines kinases cellulaires et induire la phosphorylation de diverses protéines sur des résidus tyrosines *in vivo* et *in vitro* (Mayer et al., 1988). Une hypothèse de fonctionnement de cette protéine a été inspirée par l'observation d'une homologie de séquence avec le domaine régulateur des protéines tyrosine-kinases : p47<sup>gag-crk</sup> pourrait détourner par compétition les inhibiteurs des protéines kinases.

#### 5) Les protéines nucléaires

Les oncogènes codant pour des protéines à localisation nucléaire ont été étudiés pour leur rôle éventuel en tant que transactivateurs et régulateurs de la synthèse d'ADN ou d'ARN (Kingston et al., 1985). Plusieurs oncogènes nucléaires ont été isolés et caractérisés. Certains d'entre eux seront étudiés en détail dans les chapitres suivants.

Il est intéressant de noter que les fonctions de deux oncogènes nucléaires ont pu être clairement définies : *jun* (Bohmann et al., 1987) et *erbA* (Sap et al., 1986). Le produit de traduction des proto-oncogènes humains *c-jun* et *c-fos* codent pour des protéines liant l'ADN et possédant des propriétés structurales et fonctionnelles comparables à celles de AP1, un facteur de transcription (Bohmann et al., 1987 ; Lee et al., 1987). Une hypothèse de mécanisme de transformation possible pour *v-jun*, serait que cette protéine se comporte comme une version tronquée de AP1, activée en permanence.

La localisation de la protéine *c-erbA* ainsi que sa capacité à fixer les hormones thyroïdiennes suggèrent qu'il s'agit d'un récepteur des hormones thyroïdiennes. Cette protéine nucléaire se lie à l'ADN et active la transcription de façon hormonodépendante (Sap et al., 1986).

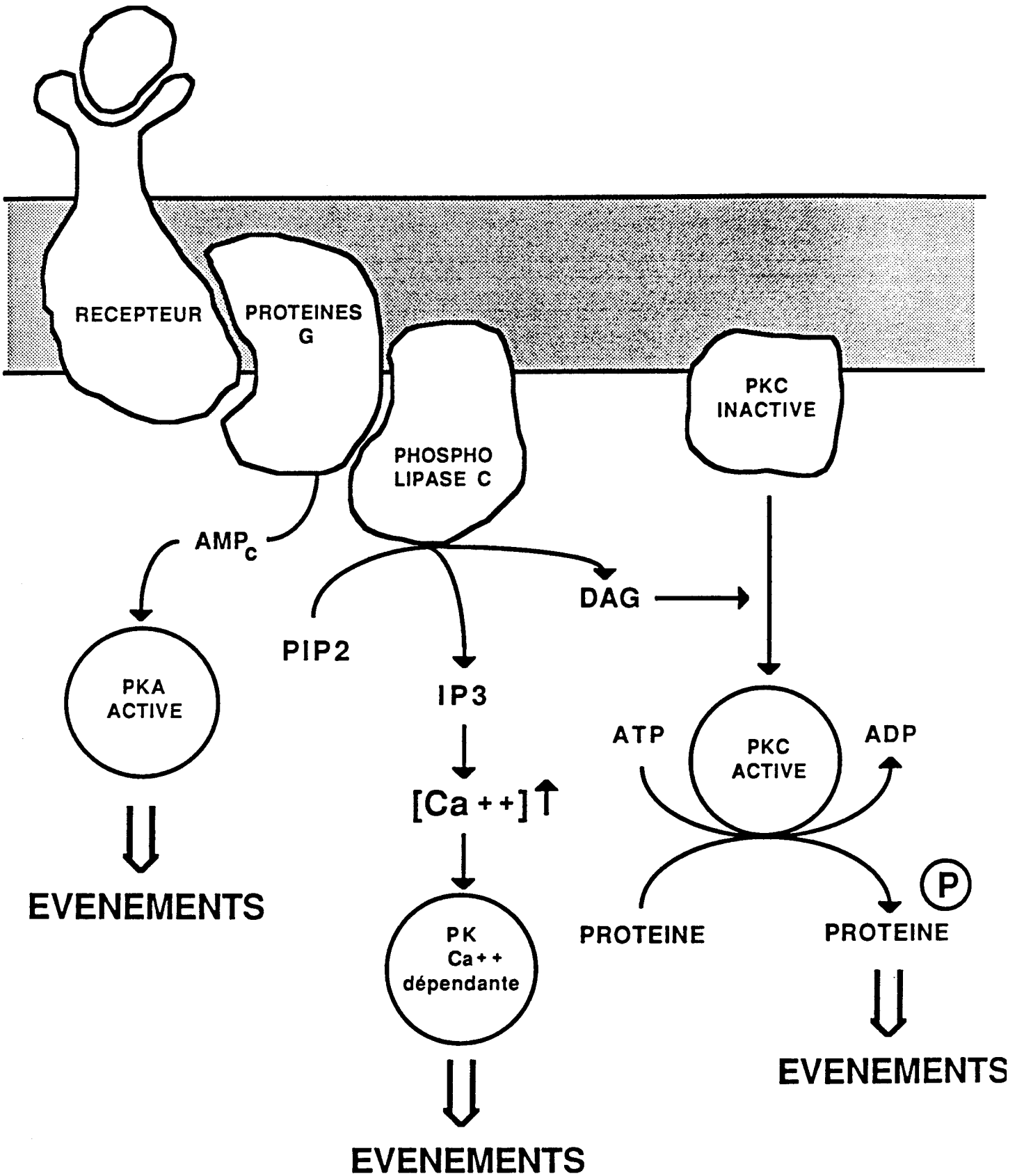


figure 9 : Seconds messagers

## II. TUMORIGENESE MULTIETAPE : LES COOPERATIONS

Les étapes pouvant conduire à la cellule transformée sont multiples et variées. Nous allons étudier successivement les produits susceptibles de faire progresser la cellule vers la transformation dans différents systèmes : certaines substances chimiques, des virus autres que les rétrovirus oncogènes, et les oncogènes viraux et cellulaires. Nous décrirons ensuite des modèles de coopération d'oncogènes *in vivo*, plus proches des réalités biologiques : coopérations dans les organes reconstitués, coopérations dans les souris transgéniques, activation d'oncogènes multiples dans des tumeurs et rétrovirus contenant plusieurs oncogènes.

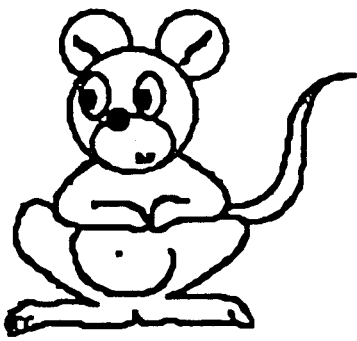
### A. LES PRODUITS DE LA COOPERATION

#### 1) Les carcinogènes chimiques

La cancérogénèse chimique multiétape a été démontrée la première fois en étudiant la transformation de l'épiderme de souris (figure 10). La première étape, ou initiation est obtenue par le badigeonnage cutané de faibles doses de carcinogènes n'entraînant pas l'apparition de tumeurs. La seconde étape, ou promotion est réalisée par le traitement répété des cellules ainsi initiées avec des agents non carcinogènes aboutissant à la production rapide de nombreux papillomes bénins parmi lesquels se développeront de rares carcinomes (Hennings et al., 1983).

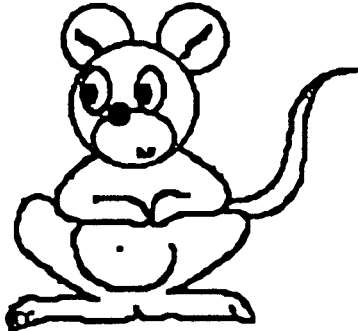
Un exemple de ces deux étapes est fourni par l'utilisation de 7,12-diméthylbenz(a)antracène (DMBA) comme initiateur à des doses définies et par l'application durant 10 semaines de 12-O-tétradécanoyl-phorbol-13-acétate (TPA) comme promoteur. Bien que ces modèles produisent essentiellement des tumeurs bénignes, des papillomes, la plupart des concepts concernant la transformation des cellules épithéliales sont issus des travaux sur l'épiderme de souris. Les modifications permanentes des capacités de croissance entraînées par les initiateurs tumoraux seraient expliquées par la survenue de mutations ; des mécanismes de sélection cellulaire et de croissance clonale des cellules initiées seraient impliqués dans la promotion. Dans ces expériences plus de 90 % des carcinomes se développent à partir des papillomes, mais le nombre de ces transformations reste faible. Les facteurs intervenant dans cette dernière étape n'ont pas été identifiés. Parmi les facteurs supposés se trouvent à nouveau les promoteurs, bien que des travaux aient infirmé cette hypothèse. En revanche l'utilisation d'initiateurs (N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, urethane, 4-nitro quinoline-N-oxycide ou 4NQO) se révèle efficace pour la transformation de cellules préalablement initiées et promues. Cela pourrait suggérer une modification de type mutationnel dans les cellules de papillome pour expliquer l'étape de transformation (Hennings et al., 1983 ; Reddy et Fialkow, 1983).





Application  
de  
DMBA

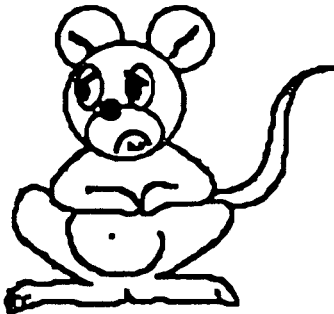
**INITIATION**



1ère semaine

Application  
de  
TPA

**PROGRESSION**

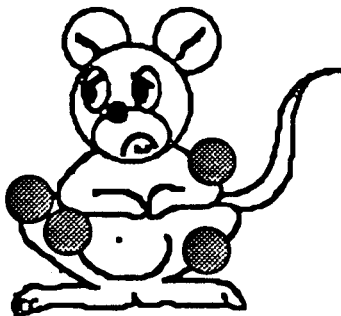


10ème semaine



Mutations  
de c-Ha-ras ?  
Initiateurs  
4NQO ?

**PROMOTION**



PAPILLOMES



TUMEUR MALIGNNE

figure 10 : Carcinogénèse chimique multiétape

Lorsqu'on s'intéresse aux modèles de cultures cellulaires soumis à l'action des carcinogènes, on constate qu'il est possible d'obtenir la transformation maligne de cellules diploïdes. L'analyse fine de ces transformations permet de mettre en évidence deux étapes : une phase de prolifération potentiellement illimitée, l'immortalisation, et au bout d'un certain temps une phase d'acquisition des critères de transformation. En effet des expériences ont montré que l'action de carcinogènes (benzo(a)pyrene, N-méthyl-N-nitrosourée, diméthyl sulfate) sur des cultures de cellules embryonnaires de hamster syrien conduit à l'induction de quelques rares cellules immortelles dont les cellules filles peuvent perdre les propriétés d'inhibition de contact et se transformer au bout d'un certain temps de croissance (Newbold et al., 1982). A la suite de ces travaux, l'immortalité, bien qu'insuffisante en elle-même, s'est montrée être un prérequis nécessaire à la transformation maligne.

C'est ainsi que des lignées cellulaires immortalisées ont pu être utilisées en coopération avec des gènes connus pour leur pouvoir transformant. Les cellules de hamster syrien normales, transfectées avec l'oncogène *c-Ha-ras-1* ne donnent aucun foyer de transformation. En revanche ces mêmes cellules préalablement exposées au diméthylsulfate, ou à des doses moyennes de radiations développent quelques foyers après transfection de *c-Ha-ras-1*. Des cellules soumises au N-méthyl-N-nitrosourée ou à des doses plus importantes de radiations et ayant perdu leur inhibition de contact conduisent à l'obtention de foyers plus importants lors de la transfection de *c-Ha-ras-1* activé (EJ *ras*) (Newbold et Overell, 1983). Ces observations conduisent à supposer à nouveau l'existence d'au moins deux étapes dans la transformation : une étape précoce, l'immortalisation, obtenue ici par des substances chimiques, une étape tardive, pouvant être assurée par un oncogène. *c-Ha-ras* peut être activé par mutation ponctuelle (sur l'acide aminé 61) par le DMBA dans les kératinocytes murins initiés (Balmain et al., 1984).

La transformation peut donc être décomposée en au moins deux étapes par l'action consécutive de substances chimiques ou la combinaison d'une substance chimique et d'un gène potentiellement transformant. Il semble donc exister différentes combinaisons d'étapes pour obtenir un phénotype transformé. Cette constatation est confirmée par l'analyse des propriétés transformantes de certains virus.

## 2) Les virus cancérigènes : polyome, SV40, adénovirus

La seule infection *in vitro* de cultures primaires de cellules de rongeur par des virus comme le polyome, SV40 ou l'adénovirus 2 suffit à la transformation. Cette exception à la règle de la cancérigénèse multiétape n'est qu'apparente. Des études ont permis de montrer que chaque virus contient au moins deux gènes codant pour des fonctions différentes, chacun devant s'exprimer consécutivement pour assurer l'apparition du phénotype transformé.

### a) Polyome (Rassoulzadegan et al., 1982)

Le virus du polyome est susceptible *in vitro* de transformer des cellules de rongeur. Les régions du génome essentielles pour cette transformation recouvrent trois gènes précoces connus du polyome : grand T, moyen T et petit T. De nombreuses études ont permis de montrer le rôle critique joué par moyen T sans exclure l'implication de tout ou partie des deux autres gènes. Un clonage séparé des trois gènes a permis de décomposer les différentes étapes de la transformation (figure 11). Lorsqu'on transfecte séparément chaque gène dans des fibroblastes de rat FR3T3 en lignée, seule la protéine codant pour moyen T est susceptible de transformer les cellules. Grand T et petit T ne présentent aucun effet détectable. Si l'on étudie les critères de la transformation des cellules FR3T3 exprimant moyen T, on constate qu'en milieu appauvri en sérum de veau foetal, les cellules recouvrent un phénotype se rapprochant des cellules non infectées et ralentissent leur croissance. Lorsque le gène grand T est transfecté dans ces cellules, on observe une perte de la dépendance vis à vis du sérum de veau foetal (SVF), et des transformants stables sont obtenus avec 0.5 % de SVF. Des études de délétion ont permis de montrer que seul 40 % de séquence N-terminal était nécessaire pour cette coopération. Si grand T est transfecté seul, il assure aux cellules FR3T3 une croissance en faibles concentrations de sérum. En revanche des fibroblastes primaires embryonnaires de rat ne sont transformés complètement que par le virus sauvage. Un allongement de la durée de vie des cellules est observé avec la transfection de grand T. Nous nous trouvons à nouveau dans une situation d'oncogénèse multiétape. Des cellules primaires peuvent être immortalisées par la protéine grand T, permettant l'établissement de cellules sans phénotype transformé. Cette propriété de grand T est en rapport avec sa capacité à réduire les besoins de la cellule en facteurs de croissance. Une deuxième étape de transformation des cellules est assurée par la protéine moyen T.

### b) SV40

Comme le virus à ADN du polyome, le virus SV40 est capable de transformer à la fois des cellules primaires et des lignées cellulaires établies *in vitro*. De nombreuses études ont permis de montrer que les gènes codant pour les régions précoces de ces virus étaient nécessaires et suffisants pour la transformation (Kimura et Itagaki, 1975 ; Donoghue et al., 1984). La région précoce de SV40 code pour deux antigènes, grand T et petit T. Les études de transformation par infection ou transfection de populations cellulaires conduisent à la sélection d'un petit nombre de cellules dont les phénotypes s'échelonnent de la cellule complètement transformée à la cellule faiblement transformée. Comme pour polyome, il semble exister une coopération de grand T et petit T dans la transformation. En effet, bien que SV40 et polyome ne soient pas complètement comparables, la région NH<sub>2</sub>-terminale de grand T de SV40 facilite la transformation en assurant l'immortalisation. Ces cellules ainsi immortalisées présentent des phénotypes allant de la cellule normale à la cellule transformée (Colby et Shenk, 1982). Les données concernant l'antigène petit T sont moins étendues. Petit T semble

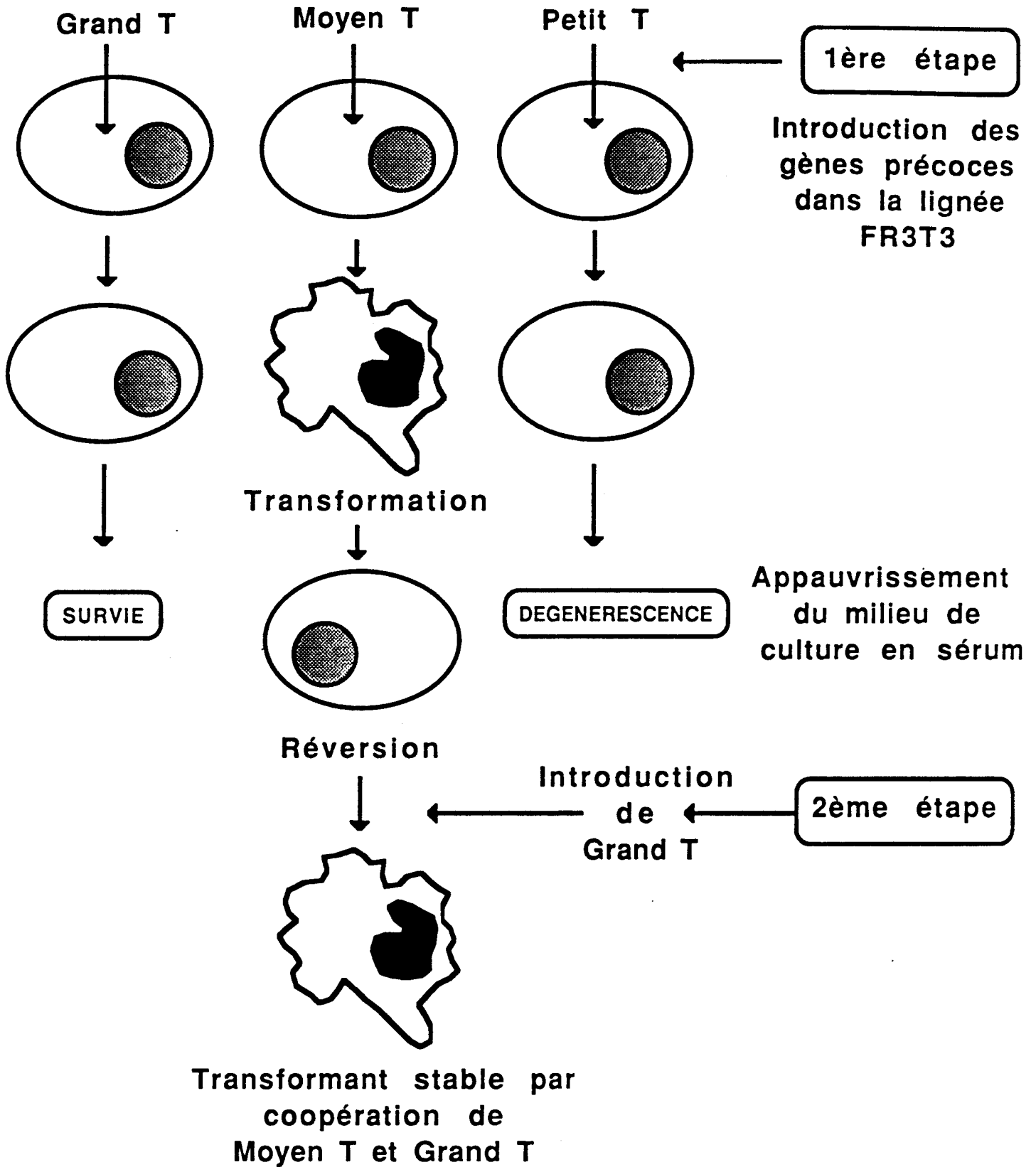


figure 11 : Les gènes précoces de Polyome

avoir un effet mitogène dans des cellules au repos qui synthétisent grand T. L'infection par SV40 de différentes cellules non transformées tend à montrer que petit T et grand T doivent être produits pour supprimer l'inhibition de contact. Cependant grand T seul peut également assurer une croissance efficace en agar. Ces résultats apparemment contradictoires peuvent être interprétés comme une relation effet-dose. Lorsqu'on infecte des cellules Balb/C 3T3 CIA31, on constate que petit T seul ne peut induire de transformation. En revanche quand grand T s'exprime à des taux extrêmement élevés, il permet le clonage en agar des cellules. Si grand T s'exprime faiblement, il ne peut plus alors assurer de transformation qu'en présence de petit T. On peut donc supposer que le rôle essentiel de petit T dans la transformation est de stimuler directement ou indirectement les capacités transformantes de grand T (Bikel et al., 1987).

Des études de comparaison entre les propriétés de grand T de SV40 et de moyen T et grand T de polyome ont été réalisées. L'expression de moyen T de polyome transforme des lignées de cellules de rat FIII, contrairement à grand T qui n'induit pas l'apparition de nombreux critères de transformation. Les cellules transfectées avec grand T de SV40 ne présentent pas d'autres caractères de transformation qu'une certaine capacité à cloner en agar. Grand T de SV40 assurerait l'immortalisation des cellules comme le gène E1a de l'adénovirus (Jat et al., 1986).

### c) Adénovirus

Les virus à ADN de la famille des adénovirus de types 2 et 5 ont des activités transformantes. Des études ont montré que la fonction transformante du virus était portée du côté 5' au niveau des gènes précoces de la région 1 (Houweling et al., 1980). Lorsqu'on étudie finement la région précoce 1 notée E1, on constate que cette région transforme avec la même efficacité qu'un mélange des régions E1a et E1b. E1a seul induit une transformation incomplète des cellules de hamster BRK qui deviennent aneuploïdes et sont immortalisées. E1b seul n'induit aucune transformation évidente. En revanche E1a et E1b coopèrent pour transformer les cellules. Il semble donc que E1a initie la transformation et que E1b est finalement responsable du phénotype transformé et de la tumorigénicité (Van den Elsen et al., 1982). Cette capacité d'E1a à initier la transformation a été largement exploitée pour démontrer par coopération l'activité transformante des oncogènes (Ruley, 1983).

### 3) Oncogènes viraux et cellulaires

L'ensemble des substances chimiques ou virales qui ont été décrites précédemment sont susceptibles de faire progresser une cellule vers la transformation. Des étapes d'initiation et d'immortalisation ainsi que des étapes de progression et de transformation sont observées. En raison d'une certaine latence à observer le phénotype transformé final, on peut supposer l'existence d'autres étapes

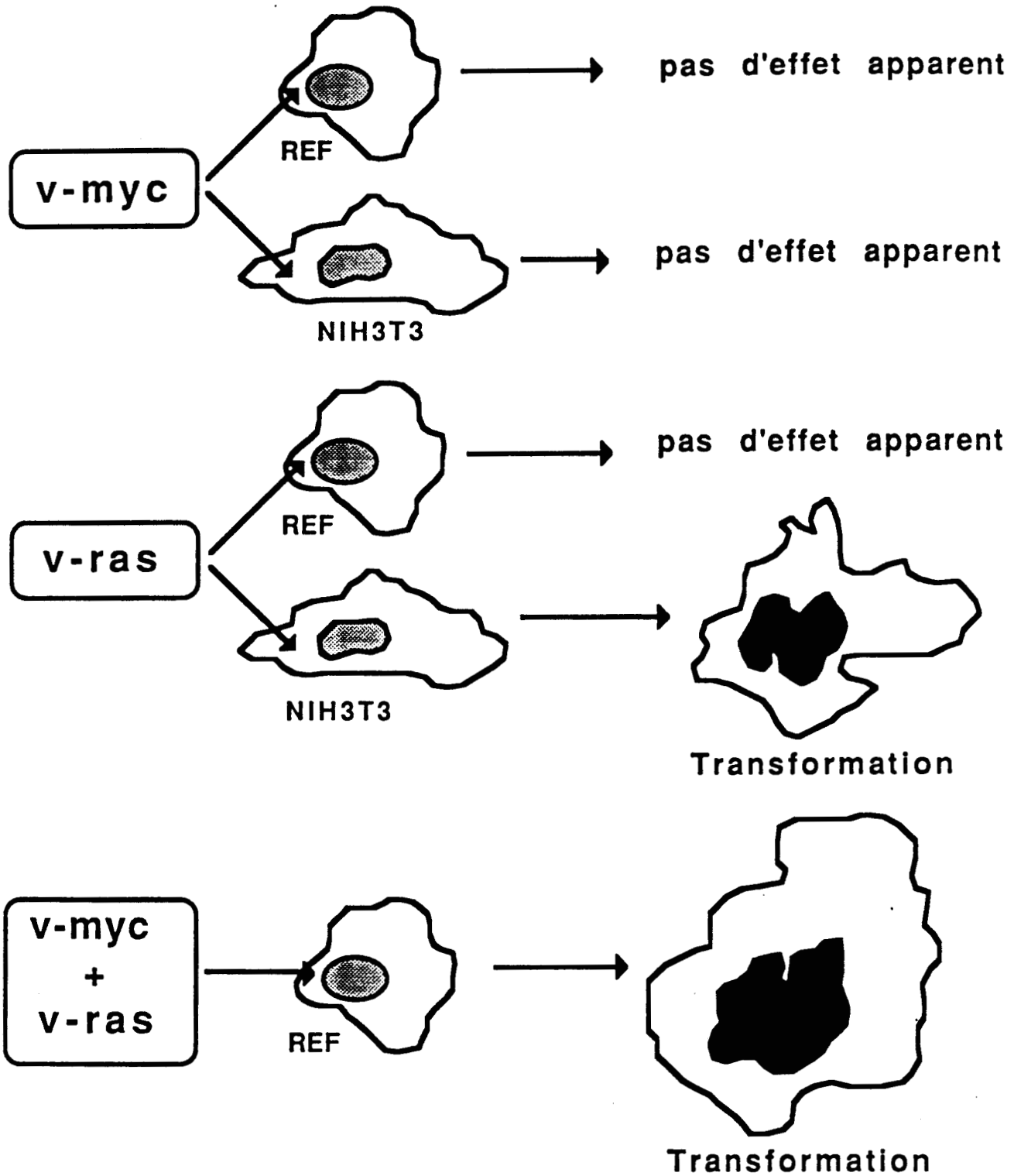
survenant au niveau des gènes de la cellule elle-même, les oncogènes constituant des candidats potentiels. Dans ce qui suit, les gènes cités font référence à des oncogènes activés par différents mécanismes (oncogène viral, proto-oncogène muté, proto-oncogène surexprimé). Ces observations conduisent à une interprétation de la cancérogénèse multiétape au niveau génique : chaque étape nécessite l'activation d'un gène distinct, et le phénotype final est obtenu par l'expression simultanée de plusieurs gènes activés. Ainsi de nombreuses combinaisons transformantes d'oncogènes ont pu être décrites, en association parfois avec les substances chimiques ou les gènes des virus à ADN précédemment décrits. Ces études ont permis de définir des groupes de complémentarité entre des oncogènes nucléaires et des oncogènes cytoplasmiques. C'est l'association d'un gène à localisation nucléaire et d'un gène à localisation cytoplasmique qui est classiquement susceptible d'induire une transformation maligne (Weinberg, 1985). Les expériences de coopération sont nombreuses.

**a) L'expérience princeps : *v-myc* et *c-Ha-ras* coopèrent pour transformer des fibroblastes embryonnaires en culture primaire**

Jusqu'à présent, l'idée d'une carcinogénèse multiétape était documentée au niveau clinique (dysplasie, métaplasie, néoplasie), au niveau chimique (initiation, promotion, transformation) mais très peu au niveau des gènes cellulaires eux-mêmes. En dépit de l'action de certains virus (polyome, SV40, adénovirus), l'équivalent au niveau cellulaire n'avait pas pu être observé *in vitro*.

C'est en 1983 que Land et al., réalisent la première reconstitution *in vitro* d'une transformation cellulaire impliquant deux oncogènes au moins (figure 12). Parmi les oncogènes découverts à cette époque, deux retinrent leur attention ; un lymphome de Burkitt et une leucémie promyélocytaire étudiés dans leur laboratoire présentaient chacune des copies anormales du gène *myc* ainsi que des versions activées d'un second oncogène *N-ras*. Leur choix se porta donc sur *v-myc* du rétrovirus oncogène MC29 et *c-Ha-ras-1* activé issu d'un carcinome de vessie en lignée (T24 appelé également EJ *ras*). Le système cellulaire choisi fut celui des fibroblastes embryonnaires de rat en culture primaire (REF pour Rat Embryo Fibroblast).

La transfection de *c-Ha-ras* seul ne permit pas d'observer l'apparition de foyer de transformation en culture ni de tumeur chez la souris nude. Un clone moléculaire de *v-myc* ayant conservé ses LTR fut transfecté, sans résultat particulier, sur des cellules en lignées (NIH3T3, Rat-1) et sur des REF. En revanche la transfection simultanée de *v-myc* et *c-Ha-ras* dans les REF entraîna des modifications importantes du phénotype cellulaire. Après 8 jours, les cellules étaient morphologiquement altérées et poussaient rapidement en foyer. Les cellules des foyers étaient susceptibles d'induire des tumeurs chez la souris nude et même chez le rat de 12 jours. De multiples copies de *v-myc* et de *c-Ha-ras* étaient intégrées à l'ADN des cellules des foyers. Par comparaison avec les lignées établies comme la NIH3T3 ou la Rat-1 sur lesquelles *c-Ha-ras* est transformant, il était tentant de conclure que *v-myc* présidait à l'établissement des REF. Cependant il existe une différence entre ces deux



**figure 12 : Coopération de v-myc et v-ras pour la transformation des fibroblastes embryonnaires de Rat**

transformations au niveau de l'induction des tumeurs chez la souris nude : les cellules transformées de REF induisent des tumeurs qui se stabilisent à un diamètre de 1 à 2 cm après 3 semaines ; les cellules transformées de Rat-1 se développent jusqu'à tuer leur hôte. Le gène *myc* semble donc favoriser l'apparition d'un phénotype transformé par l'oncogène *ras* mais n'est cependant pas capable de simuler complètement l'immortalisation des cellules.

### b) Des groupes de complémentation

La capacité de *c-Ha-ras* et de *myc* à coopérer dans la transformation a conduit à étudier si d'autres gènes pouvaient être placés dans des groupes de complémentation caractérisés par une activité de coopération avec *ras* ou avec *myc* dans différents systèmes cellulaires (figure 13).

#### α) Les gènes du groupe "*ras*" pouvant coopérer avec des gènes du groupe de "*myc*"

##### La famille *ras*

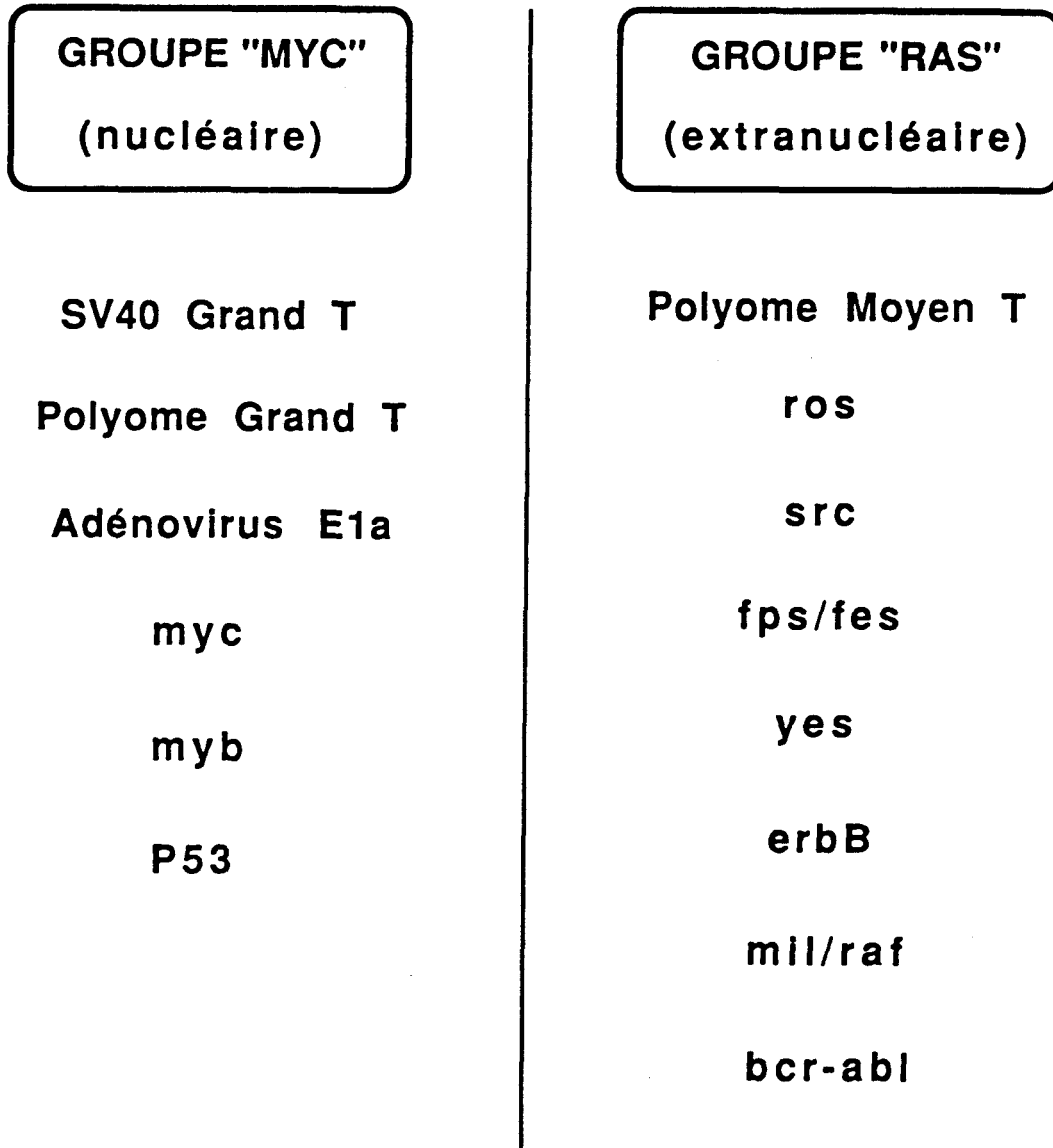
Les gènes *ras* étudiés dans ces expériences sont au nombre de trois : *c-Ha-ras*, *c-Ki-ras* et *N-ras* (Land et al., 1983). Ces gènes codent pour des protéines similaires. Ces gènes ont été impliqués dans un grand nombre de tumeurs de la vessie, du colon, du poumon, dans des carcinomes pancréatiques, des neuroblastomes, des sarcomes et plusieurs types d'hémopathies malignes (Santos et al., 1982 ; Der et al., 1982 ; Taparowsky et al., 1983). Ces gènes activés présentent un pouvoir transformant en coopération avec les gènes du groupe "*myc*" sur de nombreux systèmes cellulaires, des cultures primaires de rein de hamster nouveau-né (Zerler et al., 1986), des cellules primaires de rein de rat nouveau-né (Ruley, 1983), des cellules de Schwann (Ridley et al., 1988), des fibroblastes embryonnaires de rat (Land et al., 1983).

##### La famille des gènes homologues à *src*

Des passages précoces de cellules surrénales de rat sont transformées par l'action conjointe des oncogènes *v-src* et *v-myc*. Les cellules ainsi transformées deviennent très rapidement indépendantes des facteurs de croissance du sérum et perdent leur inhibition de contact. Ces mêmes cellules infectées par *v-myc* et *v-Ki-ras* ne présentent les mêmes caractéristiques de transformation qu'après plusieurs passages, ce délai suggérant ainsi l'intervention d'un troisième événement dans cette coopération (MacAuley et Pawson, 1988).

Des cellules myéloïdes de poulet transformées par l'oncogène *v-myc* exigent pour proliférer *in vitro* la présence d'un facteur de croissance, le cMGF (pour Chicken Myelomonocytic Growth Factor). Cette dépendance disparaît si les cellules transformées sont surinfectées par un rétrovirus contenant





**figure 13 : Groupes de complémentation**

un oncogène de la famille des protéines kinases dont le représentant est *v-src* (Adkins et al., 1984). Parmi ces gènes on trouve *v-fps/fes* issu des virus de Chat ST-FeSV et de Poulet Fu-ASV, *v-yes* issu du virus de poulet Y73-ASV, *v-ros* issu du virus de poulet UR2, *v-erbB* issue de AEV (Neil, 1983). Enfin un autre oncogène est susceptible d'induire cette indépendance au cMGF, l'oncogène *mil/raf* issu d'un virus de Poulet MH2 et d'un virus murin MSV-3611 (Coll et al., 1983; Rapp et al., 1983). MH2 est un rétrovirus particulier que nous étudierons plus en détail : ce virus a transduit les deux oncogènes *myc* et *mil*. Il est capable de transformer des macrophages de Poulet *in vitro* et de les faire proliférer en l'absence de cMGF (Graf et al., 1986). L'oncogène *c-raf-1* coopère avec *c-myc* dans la transformation de cellules d'épithélium bronchique immortalisées par grand T de SV40. Il transforme ce tissu en carcinome à grandes cellules présentant des marqueurs neuroendocriniens (Pfeifer et al., 1989). Des cellules de foie foetal de souris infectées par *v-raf* et *v-myc* s'établissent en lignées érythroïdes après de probables altérations génétiques secondaires, et deviennent sensibles à la différenciation par l'érythroprotéine. *v-raf* et *v-myc* pris isolément n'ont pas d'effet sur ces cellules (Klinken et al., 1988). Des cellules non tumorigènes de moelle osseuse issues de souris transgéniques portant un gène *c-myc* contrôlé par le promoteur des chaînes lourdes d'immunoglobuline, sont transformées par infection à l'aide d'un virus contenant *v-raf* (Alexander et al., 1989).

### Moyen T de polyome

Lorsqu'on étudie la transformation par polyome, on constate que deux gènes coopèrent : moyen T induit des modifications morphologiques et supprime l'inhibition de contact, grand T assure l'immortalisation cellulaire (Rassoulzadegan et al., 1982). Dans un système de culture primaire de fibroblastes embryonnaires de rat, moyen T coopère avec *myc* pour transformer les cellules (Land et al., 1983). Lorsque des lignées cellulaires différenciées d'épithélium thyroïdien de rat sont transfectées avec moyen T et le *c-myc* humain, on observe une transformation importante et l'absence de différenciation des cellules (Berlingieri et al., 1988).

### *bcr-abl*

La tyrosine kinase produite par le gène du locus remanié *bcr-abl* du chromosome Philadelphie présent dans les cellules leucémiques de patients atteints de leucémie myéloïde chronique coopère avec l'oncogène *v-myc* pour conférer un phénotype complètement transformé à la lignée cellulaire Rat-1. Cette interaction n'existe pas sur NIH3T3 (Lugo et Witte, 1989). En revanche *v-abl* n'est apparemment pas capable de coopérer avec *myc* pour la transformation de cellules lymphoïdes pré B (Alexander et al., 1989).

### **β) Les gènes du groupe "myc" pouvant coopérer avec des gènes du groupe "ras"**

Des homologies de structures localisées dans des régions importantes pour la transformation ont été retrouvées dans *myc*, dans E1a et dans grand T de SV40 et de polyome (Figge et al., 1988). De nombreuses expériences ont ainsi permis d'étendre le nombre des oncogènes nucléaires susceptibles de coopérer avec le groupe de complémentation de *ras* (Weinberg et al., 1985).

#### **Oncogènes de la famille de *myc***

Dans les travaux de Land et al. (1983) le gène *v-myc* du virus aviaire MC29 sous LTR promotion coopère avec *c-Ha-ras*. Mais cette coopération peut également s'effectuer avec un *c-myc* de souris placé sous le promoteur de SV40. Il en est de même de *N-myc* (Schwab et al., 1985 ; Yancopoulos et al., 1985). *N-myc* est un oncogène homologue à *c-myc* retrouvé dans les neuroblastomes et certains cancers à petites cellules du poumon. La cotransfection de *N-myc* et de *c-Ha-ras* activé transforme les fibroblastes embryonnaires de rat. Ces cellules clonent en agar et produisent des tumeurs chez la souris nude et le rat syngénique.

#### **E1a**

Nous avons vu que le gène E1a de l'adénovirus est susceptible d'immortaliser des cultures primaires de cellules. Lorsque E1a est cotransfecté avec *c-Ha-ras*, ces deux gènes coopèrent pour transformer des cellules de rein de hamster nouveau-né (Ruley, 1983). Les fonctions d'établissement de E1a viennent compléter les fonctions transformantes de *c-Ha-ras* et des autres gènes du groupe de complémentation "ras" comme moyen T de polyome (Zerler et al., 1985).

#### **Grand T de SV40 et de polyome**

La cotransfection de grand T de polyome et de *c-Ha-ras-1* activé conduit à la transformation de fibroblastes embryonnaires de rat en culture primaire (Land et al., 1983). Ces cellules ainsi transformées induisent rapidement des tumeurs chez la souris nude. Ces tumeurs sont d'un diamètre supérieur à celui des tumeurs induites par le tandem *v-myc/c-Ha-ras* et finissent par tuer l'animal.

Dans les cellules de Schwann de rat, grand T de SV40 est susceptible d'induire une transformation selon un mode de coopération particulier avec *c-Ha-ras* (Ridley et al., 1988). L'expression isolée de grand T de SV40 réduit les besoins des cellules de Schwann en facteurs de croissance, mais n'induit pas de transformation.

***myb***

Le virus des leucémies aviaires aiguës contenant l'oncogène *v-myb* est susceptible de transformer des cellules hématopoïétiques de la lignée myélomonocytaire. Ces cellules ainsi transformées dépendent pour leur prolifération *in vitro* du cMGF, comme les cellules myéloïdes infectées par *v-myc* (Beug et al., 1982). La surinfection de ces cellules avec des rétrovirus contenant des oncogènes de la famille *src* assure une coopération permettant de rendre les cellules ainsi transformées, indépendantes du cMGF (Adkins et al., 1984).

**p53**

La phosphoprotéine cellulaire instable p53 est fréquemment retrouvée à des taux élevés dans les cellules transformées et se stabilise par la formation de complexes protéiques avec l'antigène grand T de SV40 ou la protéine adénovirale E1b dans les cellules infectées par ces virus. Bien que plusieurs études aient associé la p53 avec la prolifération cellulaire, son rôle est resté longtemps obscur (Jenkins et al., 1984). La transfection d'un ADN complémentaire de la p53 dans des chondrocytes de rat de durée de vie limitée assure l'immortalisation de ces cellules et les rend susceptibles à la transformation par *ras* (Jenkins et al., 1984). Comme l'oncogène *myc*, la protéine p53 est capable de se lier à l'ADN et tend à s'accumuler dans le noyau des cellules transformées ; la p53 coopère avec *c-Ha-ras* activé pour transformer des fibroblastes embryonnaires de rat en culture primaire (Eliyahu et al., 1984 ; Parada et al., 1984). Cependant pour coopérer avec *ras* dans la transformation, la p53 nécessite d'être activée (Hinds et al., 1989) : la protéine p53 doit présenter une valine en position 135 à la place d'une alanine.

**c) Des exceptions éventuelles aux groupes de complémentation**

Dans ce qui vient d'être décrit, les expériences de coopération impliquent un oncogène du groupe "*myc*" à localisation préférentielle nucléaire et un oncogène du groupe "*ras*" à localisation préférentielle extranucléaire. Cependant deux tentatives d'association entre gènes nucléaires ont été réalisées.

Une complémentation entre *v-fos* et l'antigène grand T de polyome a été observée à deux niveaux : allongement de la durée de vie des cellules et modifications morphologiques (Jenuwein et al., 1985). Les colonies obtenues lors de l'infection de fibroblastes embryonnaires de rat par FBR-MuSV ou FBJ-MuSV n'ont qu'une durée de vie limitée. Lorsqu'elles sont cotransfectées avec grand T, ces cellules traversent un phénomène de crise puis se mettent à proliférer et à acquérir un phénotype de cellules transformées (cellules plus petites, rondes et moins adhérentes). Mais aucun des autres critères de transformation n'a été vérifié.

Il en est de même pour l'association fréquemment observée entre la p53 et l'antigène grand T de SV40 (Santos et Butel, 1985). Dans les cellules possédant grand T, on constate que cette protéine est associée avec la p53 dans le noyau et à la surface des cellules. Des corrélations entre la présence de ce complexe grand T/p53 et les vitesses de croissance de cellules de rein de souris ont été observées.

Dans ces deux expériences, impliquant des gènes à localisation habituellement nucléaire dans les cellules transformées, les critères de transformation se limitent à des modifications morphologiques. De plus la p53 tend à se relocaliser dans la membrane. Aussi dans ces deux études il semble difficile de pouvoir parler de coopération entre oncogènes nucléaires dans la transformation.

#### **d) Des voies possibles de la coopération**

Quelques études ont essayé d'analyser quels mécanismes pouvaient être à l'origine de la coopération des oncogènes du groupe "*ras*" et du groupe "*myc*" (figure 14).

##### **α) La modulation des taux d'expression**

Les conditions de la transformation des fibroblastes embryonnaires de rat par les oncogènes *ras* et *myc* ont été analysées (Land et al., 1986). Dans des conditions de culture en haute densité, aucun des oncogènes n'est capable de transformer seul les fibroblastes embryonnaires de rat. La cotransfection de *ras* avec un plasmide de résistance à la néomycine permet de détruire les cellules normales n'ayant pas incorporé *ras*. Les colonies de cellules exprimant *ras* se maintiennent. 10 % d'entre elles survivent à une crise et deviennent tumorigènes. Cette latence permet de supposer la survenue d'un événement supplémentaire. On note que dans ces conditions les taux d'expression de *ras* sont plus de 10 fois supérieurs à ceux observés lors de la cotransfection *myc/ras*. Le même phénomène de surexpression de *myc* dans des conditions de culture particulières est susceptible d'assurer la transformation de quelques îlots de fibroblastes embryonnaires de rat. Ces conditions de surexpression des gènes sont essentiellement retrouvées pour les oncogènes d'origine rétrovirale. En ce qui concerne les oncogènes cellulaires, les taux d'expression sont beaucoup plus faibles et conduisent à des modifications plus limitées : *ras* modifie la morphologie des cellules, entraîne une perte de l'inhibition de contact, et favorise la sécrétion de facteurs de croissance, *myc* immortalise les cellules.

##### **β) Une troisième étape possible**

Le nombre des paliers impliqués dans la cancérogénèse multiétape n'est pas connu. Si la simple activation de deux oncogènes était suffisante pour assurer la tumorigénèse, les tumeurs issues de cellules diploïdes devraient rester diploïdes ou subir des remaniements chromosomiques aléatoires

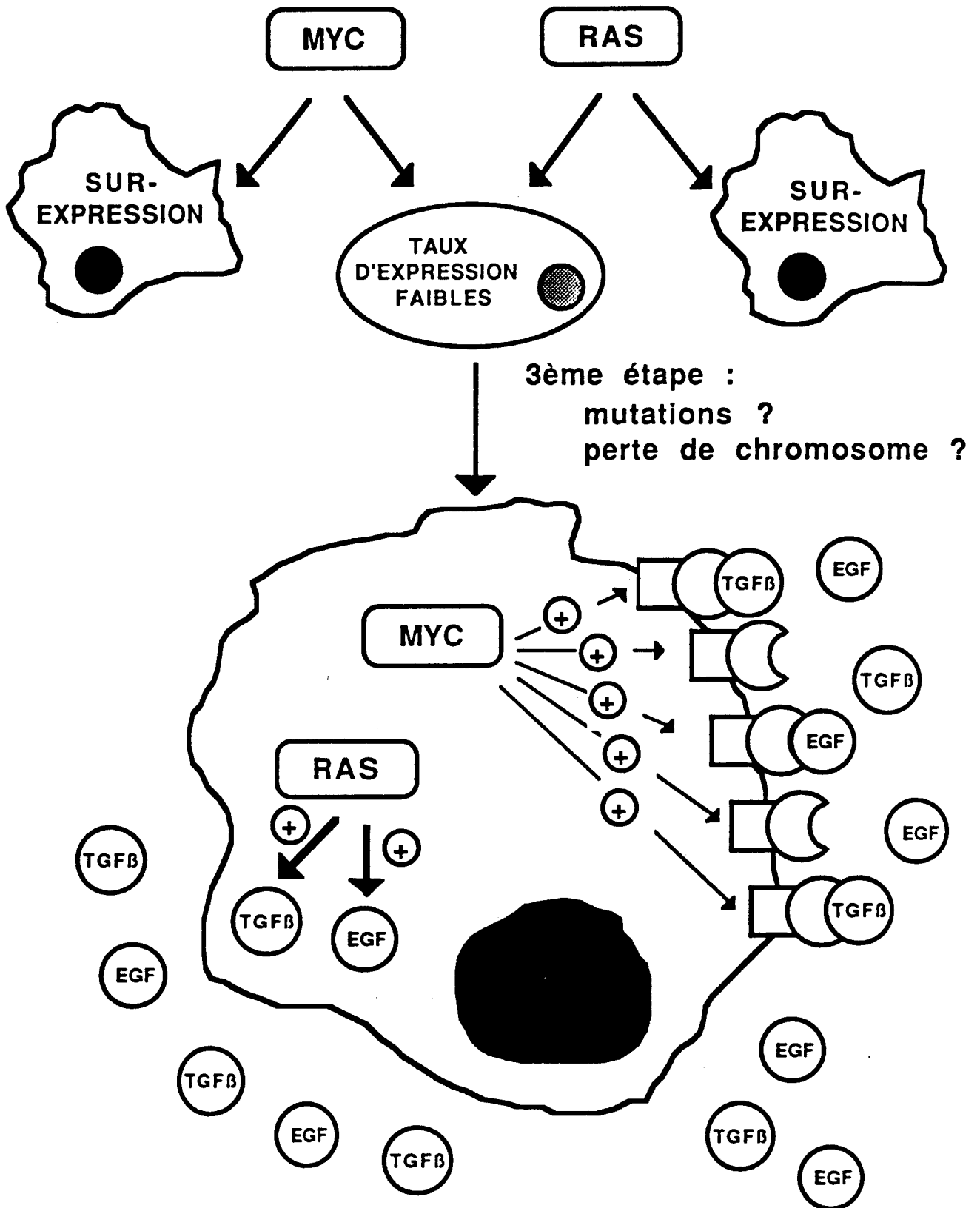


figure 14 : Des mécanismes possibles pour la coopération

comme on l'observe souvent en pratique. Des analyses cytogénétiques de cellules embryonnaires de hamster syrien transfectées avec *v-Ha-ras* et *v-myc* ont été réalisées (Oshimura et al., 1985). Les tumeurs ainsi induites sont monoclonales, c'est à dire que les sites d'intégration de *v-Ha-ras* et *v-myc* sont identiques d'une cellule à l'autre. De plus ces cellules présentent un réarrangement chromosomique préférentiel, une monosomie du chromosome 15. Il semblerait donc que cette perte d'un chromosome 15 favorise ou soit nécessaire à la transformation par *v-Ha-ras* et *v-myc*. Plus de deux étapes pourraient donc être nécessaires. Cette notion est renforcée par le fait que souvent les cellules transfectées présentent dans leur croissance une phase de crise au cours de laquelle certaines anomalies génétiques favorables pourraient aisément se sélectionner.

### γ) Les relations avec les facteurs de croissance

Comme nous l'avons vu précédemment, beaucoup d'oncogènes interviennent directement ou indirectement dans des processus régulés par les facteurs de croissance. Un rôle des facteurs de croissance dans la transformation a été mis en évidence pour la première fois lors de la mise en évidence de la sécrétion de facteurs de croissance par des cellules transformées par des virus des sarcomes murins Kirsten (contenant *ras*) et Moloney (contenant *mos*) (De Larco et Todaro, 1978). Cela suggère un modèle autocrine dans lequel la transformation maligne résulte de la production inappropriée de facteurs de croissance par des cellules portant des récepteurs fonctionnels de ces facteurs. Ces cellules sont stimulées dans leur capacité à proliférer par les facteurs de croissance qu'elles sécrètent (Sporn et Todaro, 1980). La transformation par *v-sis* procède de ce mécanisme autocrine (Deuel et al., 1983). L'introduction de l'oncogène *v-erbB* dans une cellule entraîne la production d'un récepteur de l'EGF tronqué constitutionnellement activé (Privalsky et al., 1983). Un autre type de relation existant entre facteurs de croissance et oncogènes a pu être établi par la constatation que l'expression de proto-oncogènes est régulée par des facteurs de croissance. Par exemple, le PDGF stimule l'accumulation de transcrits *c-myc* et *c-fos* dans les cellules (Muller et al., 1984) ; le TGF- $\beta$  (pour transforming growth factor) augmente le nombre de récepteurs de l'EGF (proto-oncogène *erbB*) à la surface de la cellule (Assoian et al., 1984).

Pour préciser l'implication des facteurs de croissance dans les mécanismes de coopération dans la transformation, trois facteurs de croissance l'EGF, le PDGF et le TGF- $\beta$  ont été étudiés sur des cellules de rat FR3T3 dans lesquelles l'oncogène *ras* ou l'oncogène *myc* activés ont été introduits. L'EGF est un facteur de croissance mitogène contenu dans le sérum (Stern et al., 1986). L'EGF présente des homologies avec le TGF- $\alpha$ , un facteur de croissance souvent sécrété par les cellules transformées. L'EGF et le TGF- $\alpha$  agissent en se fixant au récepteur de l'EGF et ont des effets similaires sur la physiologie cellulaire (Roberts et al., 1983). Le TGF- $\beta$  présente deux types de propriétés : il inhibe ou stimule la croissance selon la cellule cible et la présence ou l'absence d'autres facteurs de croissance (Roberts et al., 1985). Les cellules contrôles FR3T3 non transfectées

ne poussent pas en milieu semi-solide quelles que soient les conditions de culture. Les cellules transfectées avec *ras* poussent en agar dans toutes les conditions de culture et sont insensibles aux stimulations par des facteurs de croissance exogènes. Ces cellules sécrètent des taux élevés de facteurs de types EGF et TGF- $\beta$  suggérant que l'absence de réponse aux facteurs de croissance exogène est due à une stimulation autocrine. Les cellules transfectées par *myc* perdent leur inhibition de contact sous certaines conditions : l'EGF permet la croissance de nombreuses colonies en agar alors que le nombre de ces colonies est faible en présence de PDGF ou de TGF- $\beta$ . Ces cellules ne sécrètent pas de facteurs de type EGF ou TGF- $\beta$ .

Ces résultats suggèrent l'hypothèse d'un mécanisme de coopération entre *myc* et *ras* dans lequel les gènes du groupe "*ras*" induiraient la production de facteurs de croissance alors que les gènes du groupe "*myc*" augmenteraient la sensibilité des cellules à ces facteurs. Selon les systèmes, l'implication de facteurs de croissance peut être différente. Ainsi des cellules de rein de rat immortalisées par différents oncogènes présentent des réponses différentes aux facteurs de croissance (Kelekar et Cole, 1987). Les cellules immortalisées par E1a sont indépendantes des facteurs de croissance du sérum alors que les cellules immortalisées par *c-myc* répondent mieux au sérum qu'à l'EGF ou l'Insuline. Les cellules immortalisées par *H-ras* répondent à l'insuline seule et fournissent une réponse maximum à l'EGF et à l'insuline.

## B. DES EVIDENCES BIOLOGIQUES DE COOPERATION

Les travaux que nous avons analysés jusqu'à présent font état de substances ou de gènes dont l'action combinée *in vitro* sur un système cellulaire permet d'aboutir à la transformation. D'autres expériences plus proches des réalités biologiques viennent renforcer la notion de coopération.

### 1) Les souris transgéniques

Les études sur les cellules en culture ne peuvent rendre compte de l'influence de la circulation sanguine, du système immunitaire, du système hormonal, des contrôles cellulaires de la croissance bien que ces éléments soient supposés être fondamentaux pour le développement du processus malin. C'est pourquoi des auteurs ont utilisé pour leurs études les souris transgéniques, un système dans lequel l'action d'un oncogène peut être analysée dans un être vivant susceptible de répondre physiologiquement au développement d'une tumeur.

Des souris transgéniques contenant l'oncogène *c-myc* sous le contrôle du promoteur de MMTV (pour Mouse Mammary Tumor Virus) ont été produites (Leder et al., 1986). Ces animaux expriment l'oncogène et développent des tumeurs mammaires et occasionnellement des lymphomes.



Cependant, dans ces expériences, *c-myc* semble être nécessaire, mais non suffisant pour la tumorigénèse. En effet le mode d'apparition de ces tumeurs laisse supposer l'existence d'étapes supplémentaires pouvant coïncider avec l'activation d'autres oncogènes. C'est pourquoi le gène *v-Ha-ras* a été introduit dans des souris transgéniques sous le contrôle du promoteur de MMTV (Sinn et al., 1987). Les animaux ainsi produits développent une hypertrophie des glandes lacrymales. Occasionnellement après une période de 6 à 12 mois des tumeurs malignes apparaissent : des adénocarcinomes mammaires en majorité, des tumeurs des glandes salivaires, et quelques lymphomes malins. Des croisements ont été effectués entre des porteurs de MMTV/*v-Ha-ras* et MMTV/*c-myc* à l'état hétérozygote, pour obtenir des doubles hétérozygotes pour chaque gène. Le type des tumeurs obtenues chez ces animaux n'est pas différent de celui observé pour les souris porteuses uniquement de MMTV/*v-Ha-ras*, mais la vitesse d'apparition de ces tumeurs est totalement différente. Pour les lignées *c-myc*, 50 % des souris développent ces tumeurs vers 325 jours de vie. Pour les lignées *v-Ha-ras*, 50 % des souris développent ces tumeurs vers 168 jours de vie. Alors que pour les porteuses de *c-myc* et *v-Ha-ras* 50 % des souris développent ces tumeurs vers 46 jours, et 100 % des souris vers 163 jours. Les tumeurs les plus fréquemment observées restent les adénocarcinomes mammaires, ensuite viennent les lymphomes malins. Il est intéressant de constater que les vitesses de survenues des tumeurs, que les caractères isolés des tumeurs solides et les caractéristiques monoclonales des lymphomes ne correspondent guère à un simple modèle de coopération à deux oncogènes. D'autres événements génétiques doivent probablement intervenir.

D'autres travaux ont été menés sur les coopérations obtenues lors de croisements entre souris transgéniques (VanLohuizen et al., 1989). Des souris transgéniques portant l'oncogène *pim-1* (gène impliqué dans les lymphomes de type T activé par insertion provirale de MuLV (Selten et al., 1985)) sous contrôle de l'activateur des immunoglobulines et d'un LTR de MuLV expriment l'ARN messager *pim-1* à des taux élevés dans les cellules B et T. Entre 5 et 10 % de ces souris développent des lymphomes à cellules T clonaux avant 7 mois. Quand ces souris porteuses de *pim-1* sont infectées par MuLV, les lymphomes à cellules T se développent beaucoup plus vite (7 à 8 semaines). Dans tous ces cas de lymphomes, on peut constater que *c-myc* ou *N-myc* se retrouvent toujours activés par insertion provirale, suggérant une coopération entre *pim-1* et *myc* dans la genèse des lymphomes.

## 2) Les organes reconstitués (Thompson et al., 1989)

Bien que les souris transgéniques représentent un modèle *in vivo*, la surexpression ubiquitaire des oncogènes reste un phénomène non physiologique. Pour approcher plus finement le rôle des oncogènes dans la tumorigénèse *in vivo*, il est intéressant de transférer les oncogènes étudiés dans une petite fraction des cellules d'un organe intact, d'identifier précisément ces cellules et de suivre leur développement. Thompson et al. ont ainsi utilisé des rétrovirus ne se propageant pas (vecteurs

et lignées  $\Psi$ ) pour introduire les oncogènes *myc* et *ras* activés, seuls ou en association, dans les cellules d'une prostate reconstituée de souris. Seul, *ras* est susceptible d'induire une dysplasie de l'organe. Cependant cet effet nécessite un pourcentage critique de cellules viralement infectées. Un petit nombre de cellules contenant *ras* n'affecte pas l'organe et participe au développement normal des différents tissus. L'oncogène *myc* seul induit un type de lésion différent correspondant à une hyperplasie. Des oncogènes peuvent donc induire des phénotypes apparentés à des étapes précoces de la tumorigénèse. En revanche, lorsque *ras* et *myc* sont associés, ils coopèrent pour induire préférentiellement des carcinomes, dans lesquels des altérations génétiques semblent jouer un rôle dans la progression des tumeurs. En effet, des analyses caryotypiques de passages précoces en culture de carcinomes de prostate reconstituée ont révélé systématiquement des anomalies. La présence de chromosomes "double minute" (Alitalo et Schwab, 1986) témoins de l'amplification de certaines zones du génome a été mise en évidence. Les copies des virus, ainsi que celle des proto-oncogènes ne sont pas amplifiées. C'est pourquoi la présence de ces chromosomes "double minute" pourrait correspondre à l'amplification d'autres gènes impliqués dans la progression tumorale.

### 3) Les tumeurs *in vivo*

Quelques études ont cherché à savoir s'il était possible de mettre en évidence un ou plusieurs proto-oncogènes activés dans les tumeurs ou les lignées. Pour les détecter, deux types de stratégie sont utilisés.

L'hypothèse sous-tendant la première stratégie est que l'ADN des cellules tumorales contient des gènes transformants. Cet ADN est transfecté dans des fibroblastes initiés de souris, les NIH3T3 (figure 15). Une fois intégré, le gène actif, est repéré par son aptitude à transformer les NIH3T3. De l'ADN de la lignée promyélocytaire humaine HL-60 a ainsi été transfecté sur NIH3T3 (Murray et al., 1983). L'oncogène *N-ras* activé a pu être isolé. De plus une amplification du gène *c-myc* a été retrouvée dans ces cellules. Selon la même technique, l'oncogène activé *N-ras* a été isolé d'une lignée cellulaire de lymphome de Burkitt (AW Ramos), associé à une amplification de *c-myc*. Cette constatation a également pu être faite dans les cellules de neuroblastome en lignée SK-N-SH, pour *N-ras* et *N-myc*. Dans un carcinome à cellules géantes du poumon d'origine humaine, maintenu dans la souris nude, l'oncogène *c-Ki-ras-2* activé a été trouvé associé à l'amplification génomique de l'oncogène *c-myc* (Taya et al., 1984).

Une autre stratégie consiste à analyser par la technique de Southern un ensemble d'oncogènes connus pour détecter la présence d'anomalies (délétion, insertion, amplification) dans leur locus. C'est ainsi que Suarez et al. (1987) ont recherché dans une douzaine de tumeurs solides ou de lignées d'origine humaine présentant une activation d'un oncogène de la famille *ras*, des modifications d'autres oncogènes :

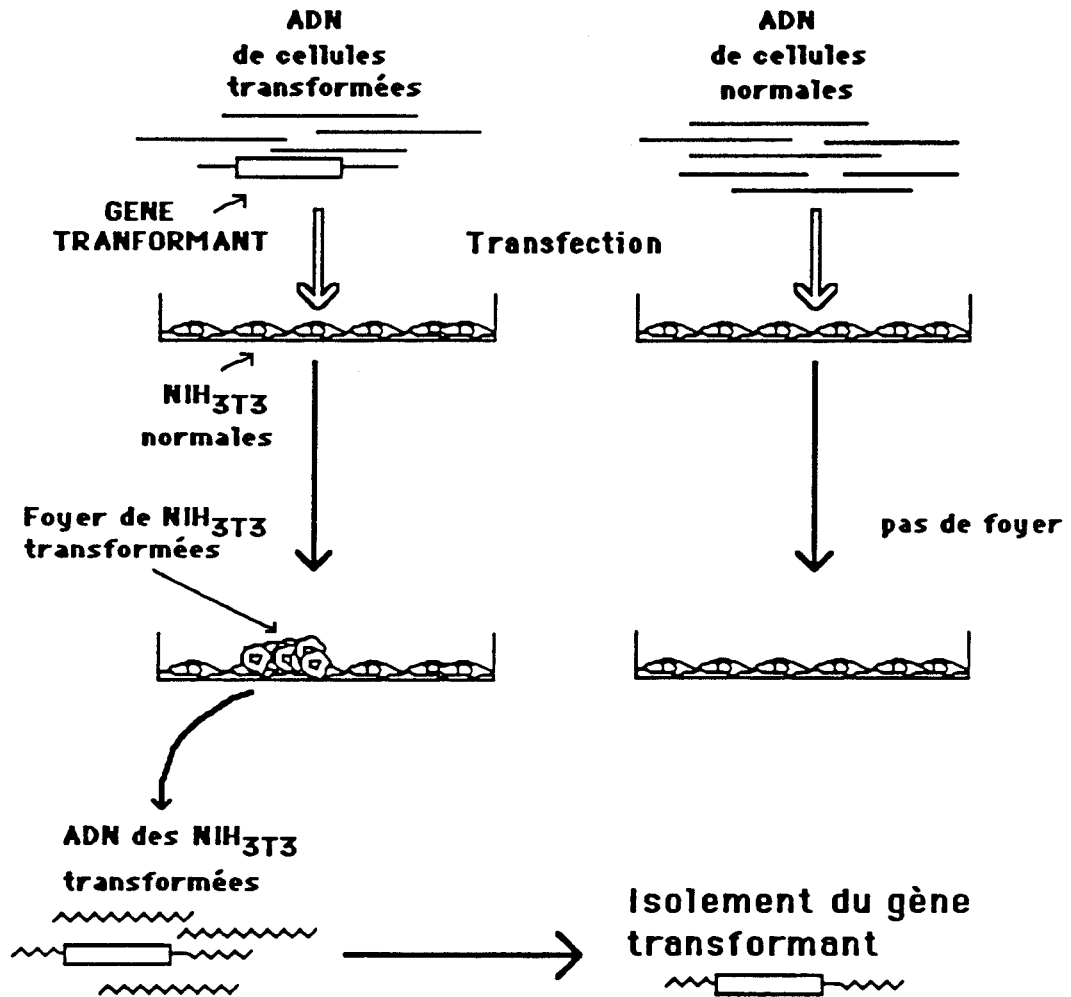


figure 15 : Isolement de c-onc activés par transfection sur NIH3T3

- 40 % des cellules étudiées présentaient un ou plusieurs oncogènes anormaux, avec une amplification constante de *c-myc*,
- 17 % des cellules étudiées présentaient une activation de trois oncogènes, *c-Ha-ras*, *c-myc* et *N-ras*.

Ces expériences tendent donc à montrer que plusieurs oncogènes activés peuvent coexister dans des tumeurs ou lignées humaines. Cependant la stratégie d'analyse par transfection sur NIH3T3 a été beaucoup critiquée dans la mesure où ont été isolés des gènes qui avaient été activés au cours de la transfection elle-même (l'oncogène *mas*, Young et al., 1986). De même, en ce qui concerne les lignées, l'établissement de ces cellules *in vitro* pourrait avoir entraîné l'altération et l'activation des oncogènes détectés.

#### 4) Les rétrovirus à deux oncogènes

Une autre évidence de la synergie entre oncogènes est fournie par la constatation que certains rétrovirus contiennent naturellement plusieurs oncogènes. C'est le cas de AEV, virus de l'érythroblastose aviaire, du rétrovirus E26 et du rétrovirus MH2 (figure 16).

##### a) AEV

Le virus AEV contient deux oncogènes, *v-erbA*, forme tronquée du récepteur des hormones thyroïdiennes (Sap et al., 1986) et *v-erbB*, forme tronquée du récepteur de l'EGF. L'étude de mutants isolés *in vivo* ou construits *in vitro* a permis de montrer une action complémentaire entre *v-erbA* et *v-erbB* dans le blocage de la différenciation des cellules érythroïdes transformées par AEV. Des travaux réalisés par Kahn et al. (1986) portant sur la coopération entre le produit *v-erbA* et le produit 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*, *v-sea* permettent la prolifération dans des milieux de culture complexes des érythroblastes indépendamment de l'érythropoïétine, les cellules restant toutefois dépendantes de l'hormone pour se différencier. La surinfection de ces cellules par un virus contenant l'oncogène *v-erbA* seul (Frykberg et al., 1983) assure leur prolifération en milieu standard et bloque leur maturation en érythrocyte, même en présence d'hormones. Ces résultats suggèrent que *v-erbA* agirait sur le contrôle de la différenciation des érythroblastes transformés, et *v-erbB* (et les autres oncogènes cités) sur le contrôle de la mitose.

##### b) MH2

Le rétrovirus aviaire MH2 fait partie des rétrovirus leucémogènes défectifs (DLV). Ce virus a transduit dans son génome deux oncogènes : le gène *v-myc* et le gène *v-mil* (ou *v-mht*) dont

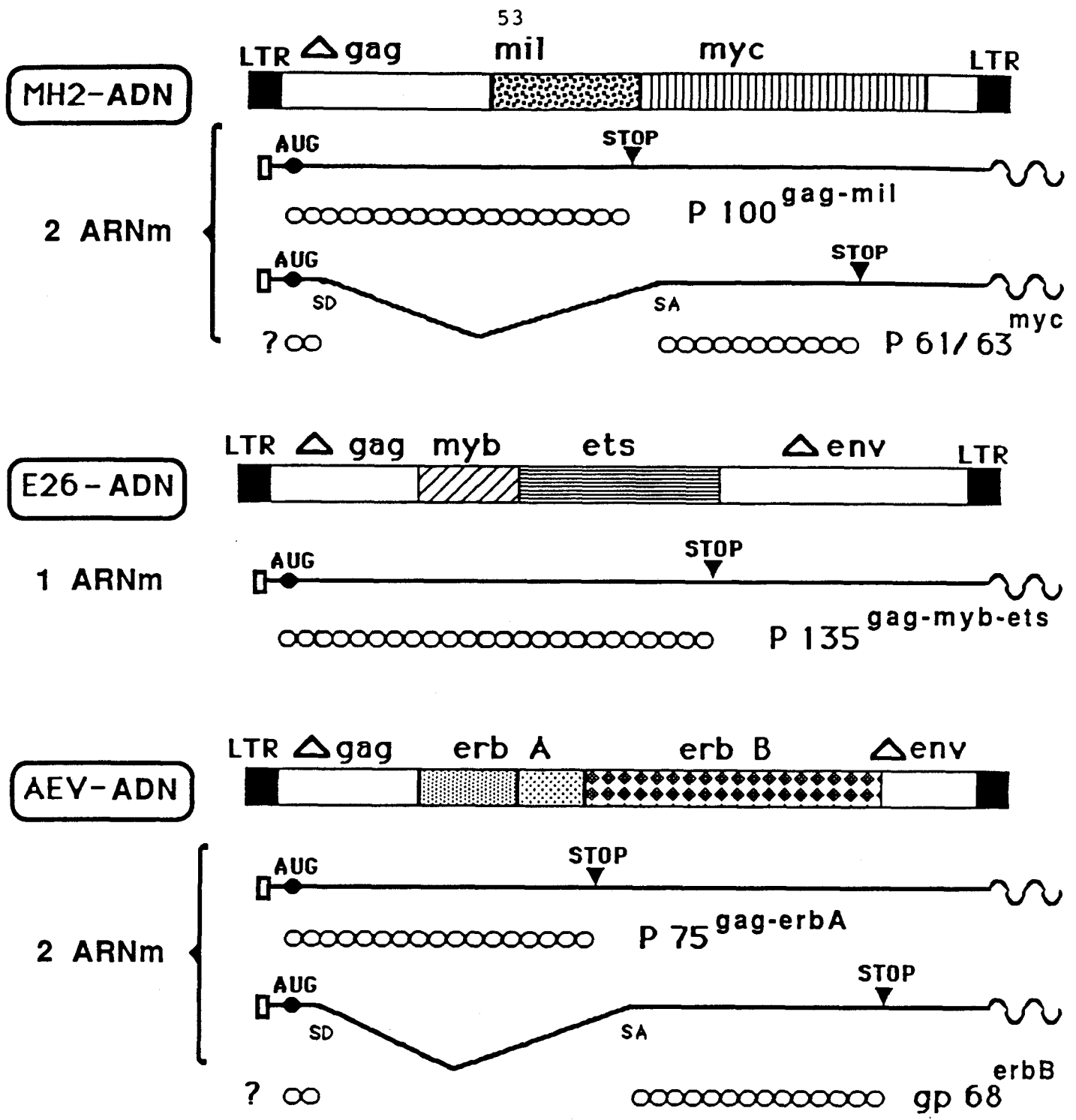


figure 16 : Rétrovirus ayant transduit deux oncogènes

l'équivalent murin est appelé *v-raf* (Saule et al., 1983 ; Kan et al., 1983 ; Coll et al., 1983 ; Jansen et al., 1983). L'expression de *v-mil* et *v-myc* s'effectue par l'intermédiaire de 2 ARN distincts (Pachl et al., 1983 ; Saule et al., 1983). *v-mil* est traduit à partir d'un ARN génomique de 5,5 kb sous la forme d'une protéine de fusion de 100 kD contenant des déterminants de *gag* dans sa partie aminotermine : la P100*gag-mil* (Hu et al., 1978 ; Haymann et al., 1979) de localisation cytoplasmique. *v-myc* est exprimé sous la forme d'une protéine nucléaire de 57 kD (Pachl et al., 1983 ; Hann et al., 1983) possédant la propriété de se lier à l'ADN (Bunte et al., 1983). *In vivo*, *v-mil* confère à MH2 une pathogénicité plus aiguë que celle des autres rétrovirus aviaires ne contenant que *v-myc* (Linial, 1982) : l'infection de cailles japonaises de 2 à 3 semaines par le virus MC29 ne provoque l'apparition de tumeurs que chez 7% des animaux, tandis que ce pourcentage s'élève à 75% avec MH2.

*In vitro*, nous avons précédemment décrit l'effet des virus *v-myc* et *v-mil* sur le système des macrophages. Ces deux oncogènes coopèrent également dans un autre système cellulaire : la neurorétine. Ces cellules proviennent de neurorétines d'embryon de Poulet (Bechade et al., 1985). MH2 est susceptible de faire proliférer les neurorétines et de les transformer. Des virus mutants de délétion, spontanés ou obtenus par recombinaison, n'exprimant que l'un ou l'autre des deux oncogènes ont été utilisés pour caractériser le rôle de chacun des gènes dans le processus de coopération. L'expression de *v-mil* est nécessaire et suffisante pour faire proliférer les neurorétines sans toutefois les transformer, alors que *v-myc* seul n'est capable, dans les conditions de culture utilisées (Basal Eagle Medium avec 5 % de sérum de veau foetal), ni de faire proliférer les cellules, ni de les transformer. *v-myc* peut par surinfection transformer les neurorétines lorsqu'elles sont au préalable induites à proliférer par *v-mil*. Cependant ces constatations sont différentes lorsqu'on utilise des conditions de culture différentes (Casalbore et al., 1987). Lorsque des boîtes de culture prétraitées au collagène sont utilisées avec un milieu plus riche DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) contenant 10 % de sérum de veau foetal, 1 % de sérum de poulet et 10 % de Bactotryptose, on observe une transformation et une prolifération avec l'oncogène *v-myc* seul. On peut interpréter cette différence par l'hypothèse que *v-mil* induit la sécrétion de facteurs de croissance dans les conditions de cultures utilisées par Béchade et al.

### c) E26

Le rétrovirus E26 contient deux séquences d'origine cellulaire, *v-myb* et *v-ets* (Leprince et al., 1983 ; 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 du virus E26 est une protéine de fusion de 135 kD, la P135*gag-myb-ets*, de localisation nucléaire (Klempnauer et al., 1984).

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 et par l'augmentation du nombre des

réticulocytes plus ou moins différenciés (Radke et al., 1982). E26 induit *in vivo* une leucémie mixte érythroïde et myéloïde, à prédominance érythroïde (Moscovici et al., 1981 ; Radke et al., 1982). *In vitro*, E26 est susceptible de transformer des cellules hématopoïétiques à partir de moelle osseuse de poussin, ou d'embryon de poulet de 1 à 3 jours (stade blastoderme).

*In vitro*, E26 a un effet mitogène sur les fibroblastes de Poulet (Jurdic et al., 1987). L'intégration et le nombre de copies d'ADN proviral intégrées sont similaires dans les fibroblastes et les cellules hématopoïétiques transformées. En revanche l'expression de l'ARN génomique est beaucoup plus importante dans les cellules hématopoïétiques que dans les fibroblastes. De plus, au niveau de la traduction, la P135gag-myb-ets n'est pas détectée dans les fibroblastes.

Des mutants thermosensibles pour la transformation myéloïde ont été isolés (Beug et al., 1984). A la température permissive, les cellules myéloïdes transformées par ce mutant de E26 ressemblent aux cellules myéloïdes transformées par le virus sauvage, et prolifèrent rapidement en présence de cMGF. A la température non permissive, elles arrêtent de proliférer et acquièrent plusieurs caractères de macrophages. Les myéloblastes transformés par ces mutants thermosensibles, après passage à la température non permissive et en présence de TPA se différencient et arrêtent leur prolifération, même en présence de cMGF. En comparant ces résultats avec ceux du virus AMV, rétrovirus de la myéloblastose aviaire ne contenant que *v-myb*, il semble que la transformation des myéloblastes soit due à *v-myb*, alors que la transformation des érythroblastes semble dépendre de *v-ets*. Les P135gag-myb-ets purifiées à partir des mutants thermosensibles de E26 ont perdu leur capacité à fixer l'ADN (Moelling et al., 1985). Un de ces mutants a été séquencé, le ts143 E26, et une mutation (substitution d'une thréonine par une arginine) a pu être localisée en N-terminal de *v-myb* dans une position phylogénétiquement conservée du domaine de fixation à l'ADN (Li et al., 1989). L'introduction de cette mutation dans le génome d'un virus E26 sauvage est suffisante pour induire un phénotype thermosensible identique à celui obtenu avec le ts143 E26.

Un autre mutant thermosensible de E26 pour la transformation érythroïde, mais non pour la transformation myéloïde a été caractérisé (Golay et al., 1988). Ce virus E26ts 1.1 possède une seule mutation dans la partie 3' de *v-ets*. Les érythroblastes transformés à la température permissive se différencient en érythrocytes normaux quand ils sont cultivés à la température non permissive. 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. *v-ets* de E26 semble donc jouer un rôle sur la différenciation des cellules érythroïdes, mais aussi sur la différenciation des cellules myéloïdes.

### III. LES ONCOGENES NUCLEAIRES

Des progrès récents ont été faits dans la compréhension du fonctionnement de certains oncogènes à localisation nucléaire. Plusieurs ont pu être identifiés et rapprochés de facteurs de transcription. Après quelques généralités sur les facteurs de transcription, nous détaillerons les études menées sur trois oncogènes nucléaires *myb*, *ets* et *myc*.

#### A. LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION

L'initiation de la synthèse de l'ARN messager (ARNm) joue un rôle primaire fondamental dans la régulation de l'expression différentielle des gènes. Les cellules répondent à des sollicitations intra et extracellulaires en activant ou en réprimant certains gènes et en modulant la transcription des gènes activés. Chez les eucaryotes supérieurs, ces modifications transcriptionnelles peuvent avoir des conséquences à long terme lorsqu'elles s'inscrivent dans un programme de développement. Les mécanismes et les voies biochimiques par lesquelles une cellule intègre les sollicitations physiologiques pour aboutir à des modifications transcriptionnelles adaptées sont encore largement inconnus. Il est cependant établi que la fréquence d'initiation de la synthèse d'ARNm dépend en fin de compte de facteurs qui interagissent avec des séquences spécifiques situées dans les promoteurs des gènes. C'est à ces protéines nucléaires régulant l'initiation de la transcription par l'ARN polymérase II que nous allons nous intéresser.

##### 1) Les régions en cis liant les facteurs de transcription

Chez les eucaryotes, pour un gène donné, existent dispersées en amont et en aval de l'origine d'initiation de l'ARNm tout un ensemble de séquences régulatrices de l'ARN polymérase II (Mc Knight et Tjian, 1986 ; Maniatis et al., 1987 ; Jones et al., 1988a).

Des études de mutations systématiques ont montré que chaque gène possède une combinaison particulière de séquences régulatrices en cis à effet positif ou négatif spécifiquement organisées quant à leur nombre, leur type et leurs localisations relatives. Ces séquences constituent des sites de fixation pour des facteurs de transcriptions spécifiques qui vont activer ou réprimer la transcription du gène. Habituellement, ces éléments en cis sont disposés sur une longueur de plusieurs centaines de paires de bases à partir du site d'initiation, mais certains éléments peuvent exercer un contrôle sur des distances bien plus importantes, de l'ordre de 1 à 30 kb. La région de contrôle située dans l'environnement immédiat du site d'initiation est appelée promoteur ; les régions qui régulent un promoteur à des distances plus importantes et dans une orientation quelconque sont appelées activateurs (Ptashne, 1986). Certaines séquences promotrices sont communes à de nombreux gènes transcrits par l'ARN polymérase II : TATA, GC et CCAAT consensus. Cependant des expériences



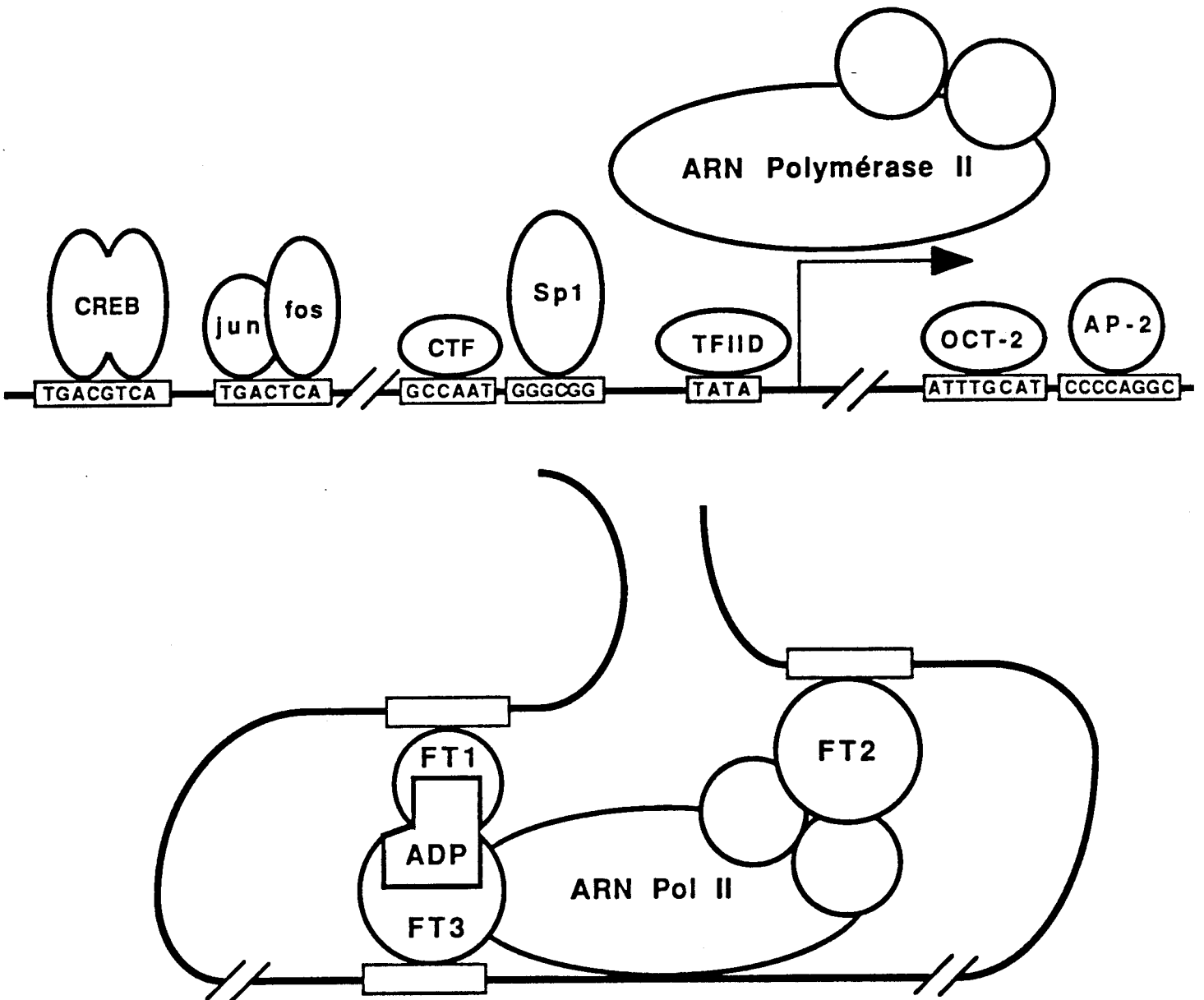
chez la levure ont montré qu'un grand nombre de séquences d'ADN pouvaient remplacer un consensus TATA, assurer la fixation du facteur TFIID et stimuler la transcription (Singer et al., 1990). Il existe par ailleurs un grand nombre de séquences moins fréquemment rencontrées impliquées dans des régulations transcriptionnelles dépendant d'un signal hautement spécialisé en réponse à des chocs thermiques, des hormones ou des facteurs de croissance. L'importance d'une séquence cis donnée peut grandement varier dans différents types cellulaires et en réponse à des signaux physiologiques, probablement en raison de la quantité ou de la capacité variable à agir selon les tissus des facteurs se liant à l'ADN (Ondek et al., 1987 ; Shirayoshi et al., 1987 ; Sen et Baltimore, 1986). Des chevauchements entre des sites de fixation de multiples facteurs peuvent aboutir à la compétition de protéines à effet positif ou négatif dans certains cas ; des effets synergiques dépendant d'éléments en cis adjacents ont été observés (Akerblom et al., 1988 ; Comb et al., 1988 ; Schüle et al., 1988).

Il existe divers types de régions inhibitrices qui peuvent bloquer la fonction de régions activatrices en cis (Laimins et al., 1986 ; Kuhl et al., 1987 ; Fujita et al., 1988). Certains gènes possèdent des sites d'initiation de transcription multiples qui sont régulés chacun par des sites de fixation pour des associations différentes de facteurs (Simeone et al., 1988). Bien que les interactions entre les différents facteurs qui peuvent se fixer à ces régions ne soient pas clairement comprises, on peut supposer que des combinaisons d'éléments en cis précisément et spécifiquement ordonnées permettent de construire pour chaque gène un programme de transcription temporel et spatial déterminé.

La figure 17 représente une combinaison d'éléments en cis constituant les régions promotrices et activatrices d'un gène transcrit par l'ARN polymérase II. Les protéines qui se fixent dans ces régions sont schématiquement représentées et comprennent l'ARN polymérase II, le TFIIA, le TFIIB, le TFIID et diverses autres protéines liant l'ADN spécifiquement (CREB, *Jun*, *Fos*, CTF, Sp1, OCT-2 et AP-2) au niveau de séquences consensus. Le ou les mécanismes par lesquels des éléments en cis activent la transcription à distance sont inconnus, mais des interactions spécifiques protéine-protéine entre certains facteurs de transcription, les facteurs du complexe d'initiation transcriptionnelle et d'autres protéines adaptatrices ou coactivatrices (Lewin, 1990) peuvent être nécessaires pour que des facteurs éloignés puissent participer directement au processus d'initiation de l'ARNm.

## 2) Les protéines liant des séquences spécifiques d'ADN

Les facteurs qui se lient aux séquences ADN en cis peuvent être détectés dans des extraits cellulaires et caractérisés en fonction de la séquence de leur site consensus à l'aide de diverses expériences de fixation à l'ADN *in vitro* (Gilbert et al., 1976 ; Mc Kay, 1981). Ces protéines, très peu abondantes, peuvent être purifiées à partir d'extraits nucléaires par chromatographie d'affinité d'une séquence



FT: facteur de transcripton

ADP : adaptateur

figure 17 : Régions promotrices, facteurs de transcription

spécifique d'ADN en vue d'obtenir des quantités de matériel suffisantes pour les études biochimiques et l'analyse de la séquence protéique (Kadonaga et Tjian, 1986). Les propriétés de fixation de ces protéines à l'ADN ont aussi été utilisées comme un moyen de sonder des clones de cDNA issus de banques d'expression (Singh et al., 1988).

Des études structure-fonction de facteurs de transcription ont employé les stratégies classiques de dissection de la protéine par délétion afin de comparer les activités biochimiques des protéines ainsi modifiées. Ces expériences sont pour la plupart menées *in vitro*, et les activités transcriptionnelles sont mesurées en exprimant le facteur de manière transitoire dans des cellules en culture et en mesurant la transcription du promoteur d'un gène cotransfecté contenant le site de fixation spécifique du facteur (Gorman et al., 1982). De telles approches ont permis de montrer que les facteurs de transcription possèdent différents domaines identifiables : région de fixation à l'ADN, région d'activation transcriptionnelle.

### **3) Les domaines de fixation à l'ADN des facteurs de transcription**

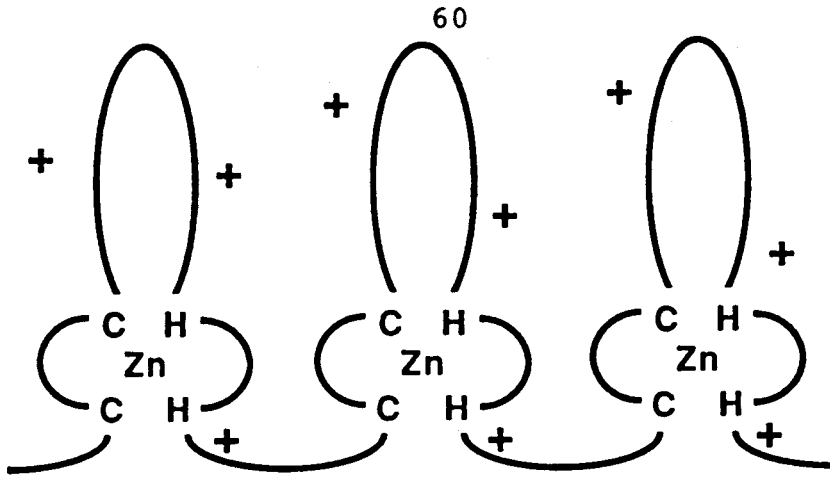
Les domaines de fixation de l'ADN de plusieurs facteurs de transcription ont été localisés sur des régions assez courtes de 60 à 100 acides aminés. Ces études ont montré que ce domaine de fixation à l'ADN est nécessaire mais non suffisant pour l'activation transcriptionnelle. Plusieurs types de domaines de fixation ont été décrits et de nouveaux sont régulièrement découverts .

#### **a) Motifs en "doigts de zinc" (Zinc finger)**

Ces motifs ont été initialement identifiés dans le facteur de transcription TFIIA de l'ARN polymérase III. Ce facteur se lie à la région de contrôle du gène de l'ARN 5S (Miller et al., 1985). Depuis au moins deux types de "doigts de zinc" ont aussi été décrits pour des facteurs participant à la transcription dirigée par l'ARN polymérase II (Evans et Hollenberg, 1988 ; Parraga et al., 1988 ; Berg, 1988) (figure 18).

#### **$\alpha$ ) Le facteur de transcription SpI**

Les motifs en "doigts de zinc" sont présents dans le facteur de transcription SpI (Kadonaga et al., 1987 ; Kadonaga et al., 1988 ; Courey et Tjian, 1988) et dans d'autres protéines de régulation des eucaryotes supérieurs et inférieurs. Ces motifs en "doigts de zinc" sont formés d'environ 30 acides aminés avec deux cystéines et deux histidines qui stabilisent la région en se fixant toutes les quatre à un même ion zinc (figure 18). La région d'environ 12 acides aminés entre les paires constantes de



CHIQQCGKVYVGKTSHLRAHLRWHTGERPFMCTWSYCGKRFRTRSD<sup>60</sup>ELQQRHKRTHHTGEKKFA  
 ↑    ↑                    ↑    ↑                    ↑    ↑                    ↑    ↑

"doigts de zinc" de Sp1



RRRKKRTSIETNVRFALEKSFLANQKPTSEEILLIAEQLHMEKEVIRVWFCNRRQKEKRIN

homéodomaine de OCT-2

figure 18 : Domaines de fixation à l'ADN

cystéine et d'histidine est caractérisée par des résidus basiques dispersés et plusieurs résidus hydrophobes conservés entre les motifs en "doigts de zinc" de différentes protéines. Le facteur de transcription Sp1, qui active la transcription en se fixant sur un consensus GC contient trois doigts de zinc à son extrémité C-terminale ; en présence d'ions zinc ces structures sont nécessaires et suffisantes pour la liaison à l'ADN.

### **β) Les récepteurs d'hormones stéroïdiennes**

Un deuxième groupe de motif "en doigts de zinc" est retrouvé au niveau du domaine de fixation des récepteurs d'hormones stéroïdes. Ces motifs comportent deux paires de résidus cystéine au lieu de l'arrangement cys-his retrouvé dans le domaine de fixation de Sp1. Le récepteur des glucocorticoïdes de rat demande du zinc pour assurer la liaison à l'ADN, et des substitutions par mutation des résidus cystéines conduisent à une perte de la fonction de fixation (Freedman et al., 1988 ; Sevrme et al., 1988).

### **γ) Des protéines ne liant pas l'ADN**

Des motifs contenant des cystéines, très proches des "doigts de zinc" de Sp1 et des récepteurs des hormones stéroïdes ont été retrouvés dans des protéines eucaryotes et procaryotes ne se liant pas nécessairement à l'ADN (Berg, 1986). Ces résidus sont utilisés pour fixer des ions métalliques et permettent de créer des ponts disulfidés dans des structures protéiques, à la fois au sein d'une même protéine et entre des protéines différentes.

Les protéines de fixation à motif en "doigts de zinc" ainsi caractérisées présentent des spécificités de séquences diverses. Ainsi, bien que la haute conservation en acides aminés du motif en "doigts de zinc" puisse définir une structure pour la fixation à l'ADN, les déterminants de la spécificité de la liaison doivent se situer en un autre endroit. Par exemple, les spécificités de fixation à l'ADN des récepteurs à la progestérone et aux oestrogènes ont été montrées dépendre de différences situées au niveau d'acides aminés non conservés à la base des régions en "doigts de zinc" (Mader et al., 1989).

### **b) Les homéodomains (Homeodomain)**

Ces régions constituées d'une soixantaine d'acides aminés sont des segments conservés de protéine retrouvés dans des régulateurs de l'embryogénèse chez la Drosophile. Ces segments ont rapidement été localisés également dans les gènes des organismes vertébrés (Hoey et Levine, 1988). La séquence primaire des homéodomains se rapproche des structures de liaison à l'ADN de type hélice- coude-hélice des répresseurs procaryotes (figure 18). Les résidus les plus conservés entre les homéodomains de différentes protéines sont les acides aminés basiques et hydrophobes. En raison

des fonctions régulationnelles communes à un grand nombre de protéines de la *Drosophila* contenant des homéodomaines, on peut supposer que d'autres protéines contenant ces régions pourraient être des facteurs se liant à l'ADN pour réguler la transcription des gènes (Levine et Hoey, 1988). Le fait que certaines protéines contenant des homéodomaines puissent se lier à certaines séquences riches en AT dans la région de contrôle de leur propre gène et/ou de gènes d'autres facteurs contenant des homéodomaines conforte cette hypothèse (Fainsod et al., 1986 ; Desplan et al., 1988 ; Beachy et al., 1988 ; Cho et al., 1988). De plus des expériences de transcription *in vitro* et de cotransfection transitoire d'une région de promotion avec des gènes codant pour diverses protéines régulant le développement et possédant des homéodomaines dans des cellules issues de tissus de *Drosophila* en culture suggèrent que les effets de ces protéines sur l'expression génique se font au niveau de la transcription (Han et al., 1989).

Les confirmations définitives de l'hypothèse selon laquelle les protéines contenant des homéodomaines peuvent lier et activer directement la transcription de gènes cibles proviennent d'études biochimiques et d'expériences *in vivo* sur trois facteurs de transcription récemment clonés :

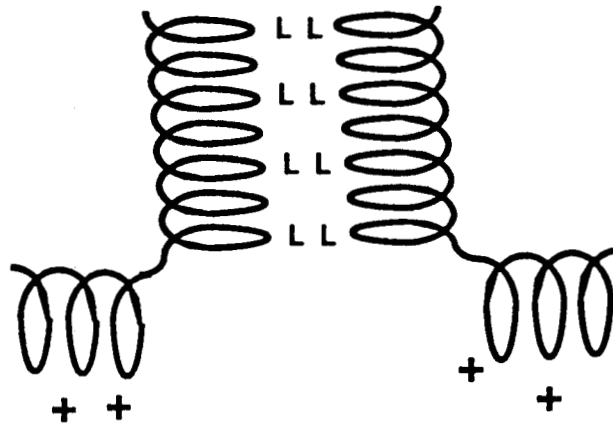
- OCT-1 (Sturm et al., 1988) appelé aussi OTF-1, NF-A1 et NFIII,
- OCT-2 (Ko et al., 1988 ; Müller et al., 1988 ; Scheidereit et al., 1988) appelé aussi OTF-2 et NF-A2,
- Pit-1 appelé aussi GHF-1, facteur spécifique hypophysaire (Ingraham et al., 1988 ; Bodner et al., 1988).

La présence d'un homéodomaine dans OCT-1 tend à démontrer que cette structure n'est pas uniquement liée aux régulations du développement, car OCT-1 est exprimé dans toutes les cellules mammifères et active la transcription de gènes cibles comme l'histone H2B. Les domaines de fixation à l'ADN des facteurs Pit-1, OCT-1, OCT-2 spécifiques des cellules lymphoïdes et Unc-86, protéine de régulation du développement du nématode *Caenorhabditis elegans* (Finney et al., 1988), constituent une sous classe au sein de la famille des protéines contenant des homéodomaines. Ces facteurs contiennent un domaine conservé d'environ 160 acides aminés, en deux parties, appelé domaine POU (Sturm et al., 1988).

### c) Les "leucine zipper"

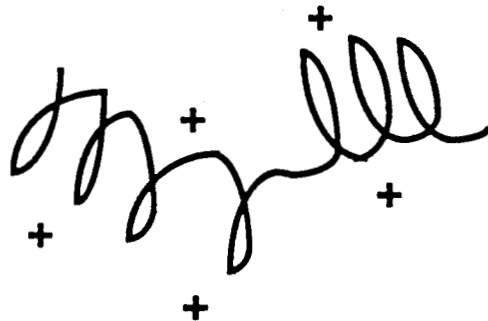
Un troisième type de domaine fixant l'ADN a été observé pour la première fois dans un activateur protéique de mammifère, la C/EBP (Landschulz et al., 1988a). La recherche de protéines présentant des homologies avec la C/EBP a permis de caractériser plusieurs facteurs partageant en commun une région en deux parties constituée par un motif d'une trentaine d'acides aminés possédant une charge basique importante immédiatement suivi par une région contenant quatre résidus leucine disposés tous les sept aminoacides (figure 19). Ce dernier segment, appelé "leucine zipper" par MacKnight et al. est nécessaire pour la dimérisation et pour la liaison à l'ADN (Landschulz et al., 1988b). La

63



SQERIKAEKRMNRNRIAASKCRKRKLERIARLEEKVKTLLKAQNSELASTANMLREQVAQLKQ  
↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑

domaine de fixation et "leucine zipper" de jun



RKRKYFKKHEKRMSKDEERAVKDELLGEKPEVKQKWASRLAKLRKDIRPECREDFVLSITGKKAP  
GCVLSNPDQKGMRRIDCLRQADKVRWLDLVMVILFKGIPLESTDGERLVKAAQC GHPVLCVQPHH

domaine de fixation de CTF

figure 19 : Domaines de fixation à l'ADN

dimérisation des protéines de ce groupe, qui comporte la C/EBP, *Jun*, *Fos* et CREB, est supposée stabilisée par des interactions hydrophobes entre les régions des deux sous unités au niveau des hélices  $\alpha$  contenant les leucines (Landschulz et al., 1989 ; O'Shea et al., 1989). Les régions basiques adjacentes aux motifs présentant les leucines semblent nécessaires pour la liaison à l'ADN, mais pas pour la dimérisation, et les sous unités ainsi réunies concourent toutes deux à la constitution du domaine de liaison à l'ADN (Kouzarides et Ziff, 1988 ; Turner et Tjian, 1989).

D'autres protéines, comme *myc* et OCT-2, contiennent des motifs répétés de leucines sans la région basique retrouvée dans les facteurs homologues à la C/EBP. La région riche en leucine de *myc* est nécessaire pour la tétramérisation et pour la transformation des cellules primaires (Dang et al., 1989). OCT-2 possède une structure de fixation à l'ADN de type homéodomain ; la fonction de sa région riche en leucine n'est pas connue (Clerc et al., 1988).

#### d) Autres motifs

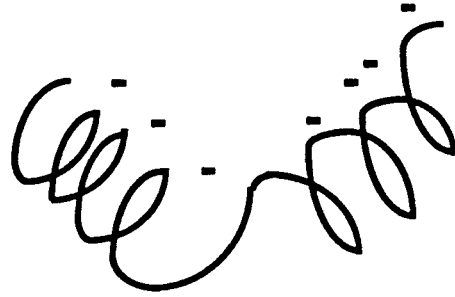
Le domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription et de réplication CTF/NF-I a été situé dans le tiers N-terminal de la protéine par des études de délétion (Santoro et al., 1988 ; Paonessa et al., 1988 ; Gil et al., 1988). Cette région pourrait s'organiser selon une structure en hélice  $\alpha$  ; elle possède une haute densité d'acides aminés basiques comme dans la structure de liaison à l'ADN ; mais aucune ressemblance caractéristique des domaines de liaison associés aux "doigts de zinc", aux homéodomains ou aux "leucine zipper" (figure 19).

Les séquences primaires de plusieurs autres facteurs de transcription clonés indiquent que le nombre de types de régions liant l'ADN n'est pas limité aux seuls quatre décrits précédemment. Par exemple, les facteurs AP-2 (Imagawa et al., 1987) et SRF (pour Serum Response Factor) (Norman et al., 1988) ne contiennent aucune homologie entre eux ni avec les domaines de liaison décrits plus haut. Nous détaillerons plus loin deux autres types de régions : le domaine de fixation de *myb* et *ets* et celui de *myc*.

#### 4) Les domaines d'activation transcriptionnelle

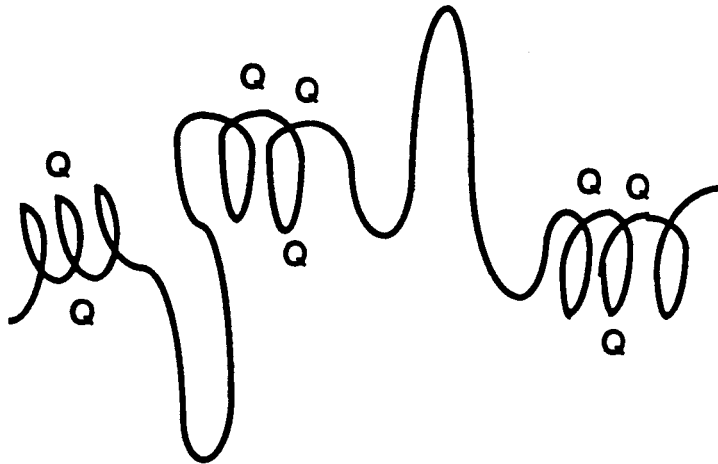
Les propriétés d'activation transcriptionnelle des facteurs se liant à l'ADN reposent sur des domaines d'environ 30 à 100 aminoacides séparés du domaine de fixation à l'ADN. Les facteurs de transcription ont souvent plus d'un domaine d'activation et plusieurs motifs structuraux apparemment sans dénominateur commun ont été identifiés comme responsables de ces fonctions (figure 20). Différents types de domaines d'activation ont été échangés et couplés avec différents domaines de liaison à l'ADN pour produire des facteurs de transcription chimériques. Les premières régions d'activation de facteurs de transcription eukaryotiques ont été caractérisées par des études de





domaine acide  
de  
GAL4

DSAAAHHDNSTIPLDFMPRDALHGFDWSEEDDMSDGLPFLKTDPNNGF

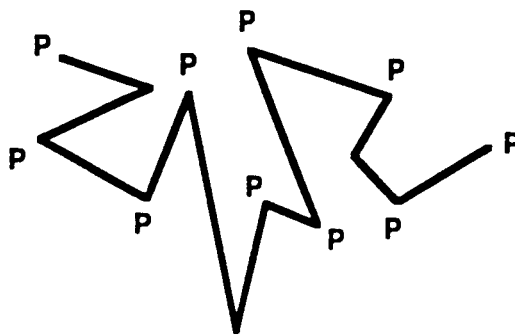


domaine riche  
en glutamine  
de  
Sp1

QGQTPQRVSGLQGS DALNIQQNQTS GGS LQAGQQKEGEQNNQQTQQQIQI

LIQPQLVQGGQALQALQAAPLSGQTFTTQAISQETLQHLQLQAVPNSG

PIIIRTPTVGPNGQVSWQTLQLQNLQVQNPQAQTITLAPMQGVS LGQ



domaine riche  
en proline  
de  
CTF

PPHLNPQDPLKDLVSLACDPASQQPGRLNGSGQLKMP SHCLS

AQMLAPPPPGLPRLALPPATK PATTSEGGATSPSYSPD TSP

figure 20 : Domaines d'activation transcriptionnelle

facteurs de levures, GAL4 et GCN4 (Brent et Ptashne, 1985 ; Ma et Ptashne, 1987 ; Ptashne, 1988 ; Hope et Struhl, 1986 et 1987 ; Hope et al., 1988). Les domaines d'activation de ces facteurs sont constitués d'enchaînements d'acides aminés n'ayant apparemment que deux points communs : une charge négative importante et la possibilité de former des structures en hélice  $\alpha$  amphipathiques.

### a) Types de domaine

#### $\alpha$ ) Riches en résidus acides

GAL4 a deux domaines acides séparés, qui, en dépit de leur absence d'homologie, semblent être fonctionnellement redondants. Chacun de ces domaines développe une activité transcriptionnelle significative quand il est placé à des positions variables par rapport au domaine de fixation à l'ADN. Quand ces domaines d'activation sont liés à un domaine de fixation hétérologue, ils peuvent activer la transcription de gènes témoins (pour reporter genes) présentant un site de fixation pour un facteur hétérologue dans la levure et dans des cellules de différents organismes supérieurs (Ptashne, 1988).

Un des deux domaines d'activation transcriptionnelle identifié dans le récepteur des hormones glucocorticoïdes correspond à la description en hélice  $\alpha$  acide (Hollenberg et Evans, 1988). De même, il semble exister un certain rapport entre l'activation et les régions en hélice  $\alpha$  négativement chargées du facteur de transcription AP-1/Jun (Bohmann et al., 1987 ; Struhl, 1988). Une hypothèse de fonctionnement serait que les domaines d'activation acides puissent faciliter l'initiation de la transcription en interagissant de manière non spécifique avec un des éléments du complexe d'initiation, comme le TFIID qui se lie au consensus TATA ou à l'ARN polymérase II elle-même (Ptashne, 1988 ; Buratowski et al., 1988 ; Guarente, 1988). En faveur de cette hypothèse, certains domaines acides peuvent stabiliser un complexe avec un facteur reconnaissant un motif TATA sur un promoteur dans des cellules de mammifère et de levure (Horikoshi et al., 1988a et 1988b).

#### $\beta$ ) Riches en résidus glutamine

Des analyses de délétion du facteur de transcription Sp1 ont montré quatre régions séparées qui contribuent à l'activation transcriptionnelle (Courey et Tjian, 1988). Toutes ces régions sont situées en dehors du domaine de liaison à l'ADN en "doigts de zinc". Deux de ces domaines d'activation les plus puissants contiennent environ 25 % de résidus glutamine et très peu de résidus acides aminés chargés. Le troisième domaine d'activation, adjacent aux "doigts de zinc" comprend environ 30 acides aminés et possède une charge nettement positive. L'extrémité C-terminale de 30 acides aminés de la protéine constitue le quatrième domaine. Ces deux dernières régions ne présentent pas d'homologie évidente entre elles ni avec les domaines d'activation riches en glutamine.

Les séquences amino acides des domaines d'activation ainsi que des domaines de fixation en "doigts de zinc" de Sp1 sont hautement conservés entre l'homme et la grenouille par rapport à d'autres régions de la protéine. Cela suppose une forte pression de sélection du cours de l'évolution pour maintenir la spécificité de ces structures (Courey et Tjian, 1988).

### **γ) Riches en résidus proline**

Un troisième type de domaine d'activation a été caractérisé dans le facteur de transcription CTF/NF-1 (Santoro et al., 1988). Un domaine riche en proline (20 à 30 %) situé à l'extrémité C-terminale de CTF active la transcription quand ce domaine est lié à différentes régions fixant l'ADN, y compris les "doigts de zinc" de Sp1. Ces régions riches en proline qui viennent rompre les hélices  $\alpha$  ont aussi été localisées dans de nombreux autres facteurs de transcription mammifères, incluant AP-2 (Imagawa et al., 1987), *Jun* (Struhl et al., 1988), OCT-2 (Ko et al., 1988) et SRF (Norman et al., 1988).

### **b) Mécanismes d'activation**

Les trois motifs différents qui caractérisent les domaines d'activation précédemment décrits (riches en résidus acides, riches en glutamine, riches en proline) sont des régions qui pourraient agir par contact avec d'autres protéines. L'idée que tous les domaines d'activation entrent directement en contact et stabilisent le même facteur général de transcription comme le TFIID de la séquence TATA, semble improbable, à moins que TFIID ne présente de multiples surfaces d'interaction. Au moins cinq facteurs de transcription sont nécessaires à l'initiation de l'ARN polymérase II, et il n'est pas difficile d'envisager que des facteurs de transcription possèdent différents types de domaines d'activation pour entrer en contact avec différents autres facteurs ou différentes sous unités de l'ARN polymérase II (Mitchell et Tjian, 1989), directement ou par l'intermédiaire d'adaptateurs (Lewin, 1990).

L'hypothèse a été proposée que certains facteurs de transcription eucaryotes puissent fonctionner en interagissant avec l'extrémité C-terminale riche en thréonine et en sérine de la sous-unité la plus large de l'ARN polymérase II (Allison et al., 1988 ; Sigler, 1988). Cette région pourrait en effet constituer une surface d'interaction non spécifique, riche en groupements hydroxyl, par l'intermédiaire desquels des domaines d'activation d'un ou plusieurs facteurs de transcription lié à l'ADN engageraient des ponts hydrogènes avec la molécule de polymérase. La phosphorylation de ces groupements hydroxyl serait un mécanisme possible de décrochement de la polymérase de ces facteurs, pour assurer ensuite l'initiation de la transcription et l'élongation (Mitchell et Tjian, 1989).

Les régions 5' des gènes transcrits activement peuvent souvent être structurellement caractérisées comme des zones sans nucléosome, hypersensibles à la desoxyribonucléase, occupées par des protéines non histones se liant à l'ADN (Gross et Garrard, 1988). Des expériences ont montré que la formation et la stabilisation des complexes d'initiation de transcription avec des facteurs de transcription peuvent éliminer compétitivement les histones et empêcher l'effet inhibiteur des nucléosomes sur la transcription *in vitro* (Wolfe et Brown, 1988 ; Workman et al., 1988).

Il est probable qu'il existe de nombreux mécanismes par lesquels les complexes d'initiation sont stabilisés *in vivo*, et que les différents domaines d'activation des facteurs de transcription sous-tendent certains de ces mécanismes. Des associations spécifiques entre des régions régulatrices de gènes transcrits et des protéines nucléaires de structure ont aussi été décrites (Gasser et Laemmli, 1986) ; on peut supposer ainsi que certains domaines d'activation entrent en contact avec des protéines de la matrice nucléaire. Ces interactions pourraient faciliter la transcription, si, par exemple, elles servaient à maintenir des gènes dans des régions du noyau présentant des concentrations localement élevées en facteurs transcriptionnels divers (Mitchell et Tjian, 1989).

### **5) Familles de facteurs de transcription avec des homologies dans leur spécificité de fixation à l'ADN**

Comme beaucoup de gènes qu'ils contrôlent, les facteurs de transcription liant l'ADN ont augmenté en nombre et en diversité au cours de l'évolution par des mécanismes comme la duplication des gènes, la divergence, et les combinaisons d'exons. Les homologies de spécificité de séquence nucléotidique de plusieurs groupes de facteurs de transcription mammifères suggèrent que l'expression, les modifications post-traductionnelles, l'affinité de liaison, l'environnement du site de fixation et les interactions avec d'autres protéines régulatrices jouent un rôle important dans la détermination de l'action de ces facteurs sur les promoteurs de leurs gènes cibles (Mitchell et Tjian, 1989).

#### **a) Famille AP-1**

Les protéines de la famille AP-1 peuvent être purifiées à partir d'extraits nucléaires par chromatographie d'affinité pour l'ADN à partir d'extraits nucléaires et à l'aide de séquences oligonucléotidiques du type TGACTCA (Bohmann et al., 1987 ; Lee et al., 1987). Chez les mammifères, ces protéines sont codées par de nombreux gènes comme *c-jun*, *jun B*, *jun D*, *fos* et *fra-1* (Curran et Franza, 1988). Les facteurs de transcription qui se lient au consensus AP-1 sont également retrouvés chez la Drosophile et chez la Levure (Jones et al., 1988b ; Perkins et al., 1988). La spécificité de fixation à l'ADN des membres de la famille AP-1 est retrouvée au niveau de la conservation de leur "leucine zipper" intervenant dans la dimérisation et donc dans la fixation à

l'ADN. Les régions en dehors du domaine de liaison à l'ADN sont généralement différentes ou ont beaucoup divergé entre les différents membres de la famille. Des études sur les protéines *fos* et *jun* montre que l'homodimérisation et l'hétérodimérisation des protéines AP-1 par l'intermédiaire de leur domaine "leucine zipper" semble jouer un rôle important dans la régulation de la transcription en créant ainsi de nouveaux facteurs de transcription avec des propriétés fonctionnelles différentes. La protéine p39, caractérisée pour la première fois par son association stable avec *fos* dans les extraits cellulaires, a été identifiée comme étant la protéine AP-1/*c-jun* (Curran et Franza, 1988). Des expériences ont montré que les protéines *c-jun* et *fos*, lorsqu'elles sont synthétisées ensemble dans des systèmes de transcription *in vitro*, forment des hétérodimères qui peuvent se lier aux sites AP-1 ; *c-jun* (mais pas *fos*), lorsqu'elle est synthétisée seule, forme des homodimères qui se fixent sur les sites AP-1 (Turner et Tjian, 1989).

Des études de mutations dans la région des motifs répétés de leucine de *fos* montrent que cette région est nécessaire à l'hétérodimérisation entre *fos* et *c-jun* et aux fonctions transformantes de *fos* (Schuermann et al., 1989). La synthèse *in vitro* des hétérodimères *c-jun-fos* et *c-jun-fra-1* ainsi que des hétéro et des homodimères entre les différentes protéines *jun*, suggèrent que la régulation transcriptionnelle des gènes présentant des sites AP-1 est complexe (Curran et Franza, 1988 ; Halazonetis et al., 1989 ; Nakabeppo et al., 1988). Le promoteur du gène *fos* lui-même montre un exemple de cette complexité. La plupart des protéines AP-1 peuvent être induites par le sérum (et aussi par le TPA) dans différents types cellulaires ; mais les cinétiques et les spécificités cellulaires d'accumulation des ARNm et de renouvellement des protéines varient parmi les membres de la famille (Curran et Franza, 1988 ; Hirai et al., 1989). L'induction de l'ARNm de *fos* lors de la stimulation par le sérum semble être autorégulée dans les cellules mammifères par des boucles de rétroaction négative, et les phases d'induction positive et négative sont toutes les deux contrôlées par une région du promoteur de *fos* qui contient un site AP-1 (Sassone-Corsi et al., 1988 ; Chiu et al., 1988).

Il existe un motif nucléotidique qui confère l'inductibilité par l'adénosine 3', 5' monophosphate (cAMP) aux promoteurs de certains gènes mammifères le CRE (pour c-AMP-responsive element). Ce motif diffère du site consensus AP-1 par l'insertion d'un nucléotide (Montminy et Bilezikjian, 1987 ; Yamamoto et al., 1988). La protéine CREB se fixe à ce motif. Isolée dans des lignées humaines JEG-3 et des lignées de rat PC12, cette protéine contient une région présentant une homologie de 61 % avec la région positivement chargée du domaine de liaison à l'ADN de *jun* (Hoeffler et al., 1988 ; Gonzales et al., 1989) et est associée à un motif de type "leucine zipper". D'autres régions de CREB sont apparemment sans homologie avec les protéines AP-1 connues. Les protéines AP-1 et CREB peuvent chacune se lier faiblement aux deux types de séquence consensus, cependant on ne sait pas si ces deux types de protéine peuvent former des hétérodimères qui associent leurs propriétés respectives (Ivashkiv et al., 1990).

### **b) Famille des protéines à homéodomaine**

Plusieurs études comparant des facteurs présentant des spécificités de liaison à l'ADN semblables ont montré que cette spécificité de séquence n'est certainement pas le seul mécanisme déterminant le choix d'un promoteur pour un facteur transcriptionnel. Par exemple, les facteurs OCT-1 et OCT-2 ont des régions de fixation à l'ADN homologues, contenant un homéodomaine et se liant *in vitro* avec des spécificités identiques au consensus octomérique (ATTTGCAT). Le facteur OCT-1 qui est exprimé de manière ubiquitaire, n'est dans les conditions habituelles pas capable d'activer la transcription des gènes des immunoglobulines spécifiques des cellules lymphoïdes présentant les consensus octamériques (Robertson, 1988 ; Schaffner, 1989). L'activation sélective de ces gènes par OCT-2 pourrait être assurée par des domaines fonctionnels spécifiques de OCT-2 qui lui permettraient d'interagir efficacement avec d'autres protéines associées aux complexes d'initiation du promoteur des immunoglobulines. Le facteur OCT-2 contient un motif répété de leucine non présent dans OCT-1 ; mais on ne sait pas si c'est la capacité à former des dimères qui différencie ces facteurs, ni si cette dimérisation intervient dans leur régulation. Comme les protéines OCT, les autres protéines contenant des homéodomains de différentes origines semblent avoir des sites de fixation à l'ADN similaires (Mitchell et Tjian, 1989).

### **c) Famille des protéines reconnaissant les motifs CCAAT**

Une autre famille de facteurs de transcription mammifère reconnaît des éléments CCAAT retrouvés dans les promoteurs et les activateurs de nombreux gènes. Les épissages alternatifs des ARNm du gène CTF/NF-1 dans les cellules HeLa produisent plusieurs protéines se fixant sur des motifs CCAAT et qui diffèrent toutes par leur extrémité C-terminale contenant le domaine d'activation transcriptionnel riche en proline : ces protéines pourraient être organisées en vue de réguler la transcription dans des environnements différents (Santoro et al., 1988 ; Gil et al., 1988).

## **6) Régulation des activités des facteurs de transcription**

### **a) Modifications post-traductionnelles**

Beaucoup de facteurs de transcription sont des phosphoprotéines et leurs fonctions pourraient être régulées par des phénomènes de phosphorylation et de déphosphorylation (Mitchell et Tjian, 1989). L'augmentation de la transcription des gènes de choc thermique de la levure est corrélée à l'augmentation de la phosphorylation de la protéine HSF déjà liée aux promoteurs de ces gènes (Wu et al., 1987 ; Zimarino et Wu, 1987a). Les groupements phosphates négativement chargés pourraient activer la transcription par un mécanisme apparenté à celui utilisé par les domaines riches en résidus acides de facteurs de transcription de levure comme GAL4 et GCN4 (Sorger et al., 1987 ; Sorger et

Pelham, 1988). La protéine CREB, qui possède un domaine de liaison avec une structure de type "leucine zipper", existe sous la forme d'un mélange de dimères actifs transcriptionnellement et de monomères relativement inactifs, en équilibre ; la phosphorylation déplace cet équilibre en faveur des dimères (Yamamoto et al., 1988 ; Gonzales et al., 1989).

La glycosylation est une modification post-traductionnelle commune à beaucoup de facteurs de transcription de l'ARN polymérase II (Jackson et Tjian, 1988). La protéine Sp1 isolée à partir de cellules HeLa est fortement glycosylée : elle contient en moyenne 10 O-N-acetylglucosamine par molécule. Le traitement par des agglutinines du germe de blé inhibe spécifiquement l'activité transcriptionnelle de Sp1 *in vitro*, sans modifier sa capacité à se lier à l'ADN. Cependant l'existence de ce mode de régulation par les glycosylations n'a pas été démontré *in vivo*. Il est intéressant de noter que ces glycosylations surviennent sur des résidus serine et thréonine pouvant être également l'objet de phosphorylation ; ces deux types de modification pourraient être mutuellement exclusifs.

#### **b) Régulation par des interactions protéine-protéine**

Le récepteur des hormones stéroïdes s'associe avec la protéine de choc thermique, hsp 90, abondante dans le cytoplasme. A la suite de la fixation de l'hormone sur son récepteur, il y a dissociation du complexe récepteur/hsp 90 et les signaux de localisation nucléaire du récepteur dirigent ce dernier dans le noyau, où il se lie et active ou réprime la transcription des gènes possédant les motifs de fixation. L'effet inhibiteur de la protéine hsp 90 sur le récepteur libre est assuré par le domaine de fixation de l'hormone au récepteur (Picard et Yamamoto, 1987 ; Picard et al., 1988).

Beaucoup de produits de gènes précoces viraux sont des régulateurs de transcription spécifiques qui activent ou répriment la transcription des gènes viraux ou cellulaires sans se lier directement aux promoteurs cibles (Berk, 1986). Certaines expériences permettent de supposer que les effets de ces transactivateurs viraux passent par des interactions protéine-protéine avec des facteurs de transcription se liant à l'ADN. La protéine E1a de l'Adénovirus 2 transactive des promoteurs de gènes viraux et cellulaires par l'intermédiaire des sites de fixation pour TFIID et ATF, un facteur apparenté à CREB (Wu et al., 1987b ; Kovesdi et al., 1987 ; Lee et Green, 1987 ; Leong et al., 1988 ; Hoeffler et Roeder, 1985 ; Simon et al., 1988). La fonction de transactivation de E1a a été localisée dans une région de 49 acides aminés présente dans la plus grande des deux protéines E1a obtenues par épissage alternatif (Green et al., 1988). Cependant, on ne sait pas si ce domaine entre directement en contact avec l'un ou l'autre des facteurs de transcription précédemment mentionnés. E1a peut indirectement réprimer la transcription de gènes contrôlés par certains éléments activateurs viraux et cellulaires. Un certain nombre d'études montrent que cet effet de répression est assuré par une région de E1a distincte du domaine d'activation transcriptionnel (Hen et al., 1985 ; Lillie et al., 1986). Une autre protéine virale transformante, l'antigène grand T de SV40 possède également la

propriété d'activer et de réprimer la transcription. L'antigène grand T régule négativement la transcription précoce virale par au moins deux mécanismes indépendants. Premièrement, l'antigène grand T peut bloquer l'initiation du promoteur précoce de SV40 par encombrement stérique en se fixant sur des séquences nucléotidiques qui recouvrent le site d'initiation précoce (Rio et al., 1980 ; Tjian et al., 1981). Deuxièmement, l'antigène grand T peut former un complexe avec le facteur de transcription cellulaire AP-2 et ainsi inhiber la fixation spécifique de AP-2 aux éléments activateurs de SV40 importants pour la transcription précoce (Mitchell et al., 1987). Ce dernier mécanisme est à rapprocher de celui utilisé par E1a pour la répression transcriptionnelle puisqu'il n'implique pas la fixation directe à l'ADN.

Ces quelques notions sur les facteurs de transcription dans les cellules animales ont montré qu'il s'agit d'un groupe d'une remarquable diversité qui s'est construit à partir d'une combinatoire de domaines fonctionnels. Les mécanismes par lesquels des dizaines de facteurs spécifiques de séquences nucléotidiques touchent différents contrôles de l'initiation de la transcription sont encore inconnus. Les études qui permettent de lier les systèmes de transduction du signal cellulaire à la régulation des facteurs de transcription sont importantes pour la compréhension des mécanismes de croissance cellulaire, de différenciation, de développement et d'oncogénèse. En effet, un certain nombre de protéines dites oncogènes se sont révélées être des facteurs de transcription.

## B. LES ONCOGENES NUCLEAIRES *myb*, *ets* et *myc*

### 1) *myb*

De ces trois oncogènes nucléaires, c'est *myb* qui fait l'objet des études les plus avancées en ce qui concerne un rôle de facteur de transcription. Les rétrovirus AMV et E26 contiennent l'oncogène *v-myb*. Il existe un équivalent cellulaire de *v-myb*, le proto-oncogène *c-myb*, exprimé à des taux importants dans les cellules immatures des lignées hématopoïétiques érythroïdes, lymphoïdes et myéloïdes (Chen, 1980 ; Gonda et al., 1982).

#### a) Le domaine de fixation à l'ADN

L'oncogène *v-myb* code pour une protéine nucléaire, *p48<sup>v-myb</sup>*. Cette protéine possède une activité de liaison à l'ADN *in vitro* (Boyle et al., 1984 ; Moelling et al., 1985 ; Klempnauer et al., 1984). Son équivalent cellulaire *c-myb* code pour une *p75<sup>c-myb</sup>* présente dans le noyau et possédant une activité de liaison à l'ADN (Klempnauer et Sippel, 1986).



En ce qui concerne *v-myb*, un domaine d'environ 120 acides aminés localisé dans la région N-terminale constitue le support de l'activité de liaison à l'ADN. Cette région contient deux enchaînements répétés d'environ 50 acides aminés rappelant le site de fixation du facteur de transcription TFIIIA du Xenope (Klempnauer et Sippel, 1987). La région équivalente de fixation à l'ADN de *c-myb* comporte trois enchaînements répétés imparfaits de 51 à 52 acides aminés. La plus grande partie du premier enchaînement a été perdue par les virus AMV et E26. Cette structure répétée est fortement conservée dans l'évolution (Howe et al., 1990). Les séquences protéiques murines et humaines sont identiques dans cette région et la séquence de poulet ne diffère que par la substitution de trois acides aminés dans le premier enchaînement répété. De plus cette région est conservée chez la Drosophile et dans deux gènes apparentés au *c-myb* chez l'homme (Nomura et al., 1988). Cette région est également retrouvée avec une homologie partielle chez le maïs. En effet une homologie protéique de 40 % existe entre *myb* et la protéine C1 de *Zea mays* (Paz-Ares et al., 1987) ; C1 code pour un facteur de transcription impliqué dans la régulation de la biosynthèse des anthocyanines du maïs. Ces régions sont contenues dans des transposons (Schwarz-Sommer et al., 1987). Il existe également une homologie entre le gène BAS-1 de la levure et *myb* dans la région amino terminale qui possède les trois motifs répétés. BAS-1 est un activateur transcriptionnel du gène HIS4 de la levure. BAS-1 agit en coopération avec BAS-2 lui même facteur de transcription de type homéodomaine (Tice-Baldwin et al., 1989). Toutes ces homologies décrites pour *myb* sont en faveur d'un rôle d'activateur transcriptionnel.

#### **b) *myb*, un nouveau type de domaine de fixation à l'ADN**

La région de fixation de *myb* à l'ADN n'a pas de ressemblance avec les domaines précédemment décrits pour les facteurs de transcription. Si l'on étudie en détail les 160 acides aminés conservés de cette région, on constate qu'il existe neuf résidus tryptophanes conservés entre les protéines de Poulet et de Drosophile (figure 21). De plus à l'intérieur de chaque segment répété il y a 18 ou 19 acides aminés entre le premier et le deuxième résidu tryptophane et 18 entre le deuxième et le troisième. *v-myb* a perdu le premier et le deuxième résidu du premier segment répété. Des études de délétion (Klempnauer et Sippel, 1987) ont permis de montrer que la région minimale pouvant encore assurer la fixation à l'ADN nécessitait la dernière moitié du deuxième segment et le troisième segment. Une protéine ne contenant que le troisième segment perd des propriétés de fixation à l'ADN. Chez C1 de *Zea mays* on retrouve le deuxième et le troisième segment répété ainsi que cinq des six tryptophanes, une leucine remplaçant le premier tryptophane du troisième segment. Cette conservation au cours de l'évolution laisse à penser que ces tryptophanes répétés à intervalle régulier peuvent jouer un rôle dans la structure et la fonction de *myb*. *myb* pourrait être ainsi le prototype d'un nouveau type de fixation à l'ADN. Dans une région hautement conservée entre les gènes de la

61 LGY - ENGL - EDVKTI CQSNHLSKCI AWDVLATRFKHTVRTSKDVRKRWTGSLDPIN BAS1  
 83 GFGKRWSKSEDVLLKCL - VETHG - ENWEIIGPHEK - - DRLEQCVOCRWAKVLNPE Drosophile  
 38 LGKTRWTREEEKLKKL - VEQNGTDDWKVIANYLP - - NRTDVOCOHRWQKVLNPE Souris  
 1 MGRRACCAKEG Cl(mais)  
 38 LGKTRWTREEEKLKKL - VEQNGTEDWKVIASFLP - - NRTDVOCOHRWQKVLNPE Poulet  
 Virus

REPETITION 1

114 LKKGKWTCEEDEQL KAYEEHGP - HWL - SISMDIPGRTEDQCAKRYIEVLGPGSK BAS1  
 134 LIKGPWTRDEDDMVI KLVRNFGPKKWT - LIARYLNGRIGKOCRERWHNHLNPE Drosophile  
 90 LIKGPWTKEEDORVI KLVQKYGPKRWS - VIAKHLKGRIGKOCRERWHNHLNPE Souris  
 12 VKRGAWTSKEDDALAAYVKAHGEGKWREVPQAGL RRCGKSCRLRWLNYLRPN Cl(mais)  
 90 LIKGPWTKEEDORVI ELVQKYGPKRWS - VIAKHLKGRIGKOCRERWHNHLNPE Poulet

REPETITION 2

167 GRLREWTLEEDLNL SKVKAYGTKWRKI SSEMEFR PSLTCRNRWRKIITMVV BAS1  
 186 IKKTAWTEKEDEIIYQAHLELGNWAKI AKRLPGRTDNAIKNHWNSTMRRKY Drosophile  
 142 VKKTSWTEEDRIIYQAHKRLGNRWAEI AKLLPGRTDNAIKNHWNSTMRRKV Souris  
 65 IRRGNISYDEEDLIRLHRLLGNRWSLI AGRLPGRTDNEIKNYWNSTLGRRA Cl(mais)  
 142 VKKTSWTEEDRIIYQAHKRLGNRWAEI AKLLPGRTDNAIKNHWNSTMRRKV Poulet

REPETITION 3

\* : résidu tryptophane

**figure 21 : Conservation du domaine de fixation de myb à l'ADN**

famille *ets* existe un triplet de tryptophanes ; le premier et le deuxième tryptophanes sont séparés par 17 acides aminés et le deuxième et le troisième par 18 (Anton et Frampton, 1988).

### c) Motif de fixation de *myb* à l'ADN

Des études de fixation des protéines *v-myb* et *c-myb* ont été réalisées selon la technique de Mc Kay modifiée (Bading et al., 1987). C'est grâce à l'utilisation de fragments d'ADN de poulet qu'a pu être détecté le site de fixation à l'ADN de *v-myb* Py AACG/T G (Biedenkapp et al., 1988). Ce motif de fixation a été retrouvé pour la protéine *c-myb*. Les protéines *c-myb* montrent une interaction plus importante avec des motifs de fixation répétés en tandem, qu'avec des motifs isolés. Les fragments d'ADN de poulet utilisés pour repérer le site de fixation de *v-myb* contenaient plusieurs copies du consensus (Howe et al., 1990).

Cependant la capacité de liaison de *v-myb* à l'ADN n'est pas suffisante pour l'envoi de la protéine dans le noyau ni pour la transformation (Ibanez et al., 1988). En ce qui concerne le ciblage dans le noyau une séquence putative se situerait à partir de la proline 521 et correspondrait au consensus P<sup>521</sup>-L-L-K-K-I-K-Q. Ce consensus riche en résidus basiques a été obtenu par homologie avec d'autres signaux de ciblage nucléaire (Dang et Lee, 1989). Pour la transformation, d'autres domaines vers la région C-terminale interviennent (Ibanez et al., 1988).

### d) Domaines nécessaires à la transformation

Des études de délétion ont été effectuées sur *v-myb* pour explorer les régions nécessaires à la transformation (Ibanez et Lipsick, 1988 ; Lane et al., 1990). Ces résultats tendent à prouver que *v-myb* constitue la région minimale du proto-oncogène *c-myb* nécessaire à la transformation (figure 22). La perte d'une partie de la région carboxyterminale de *v-myb* entraîne une dissociation entre le phénomène de transformation morphologique et la capacité à former des colonies en agar. De plus les myéloblastes infectés par les mutants ayant perdu cette région en 3' doivent être cultivés sur un tapis de macrophage. Or il est intéressant de constater que le *v-myb* de E26 qui transforme les myéloblastes *in vitro* en présence de facteurs de croissance a également perdu cette région (Beug et al., 1982). Ces observations suggèrent que ce domaine carboxyterminal de la p48<sup>*v-myb*</sup> conditionne l'hormono-indépendance d'AMV. On peut donc penser que la p48<sup>*v-myb*</sup> interagit directement sur une voie de transmission du signal provenant de la membrane. Dans cette région carboxyterminale existe une structure constituée par une série de trois leucines séparées par sept résidus caractéristiques de la structure en "leucine zipper" nécessaire à la dimérisation et à la liaison à l'ADN de protéines transactivatrices comme C/EBP, GCN4, *jun*, *fos* et *myc*. Cependant des mutations dans cette région n'altèrent apparemment pas les propriétés transformantes du virus (Lane et al., 1990).

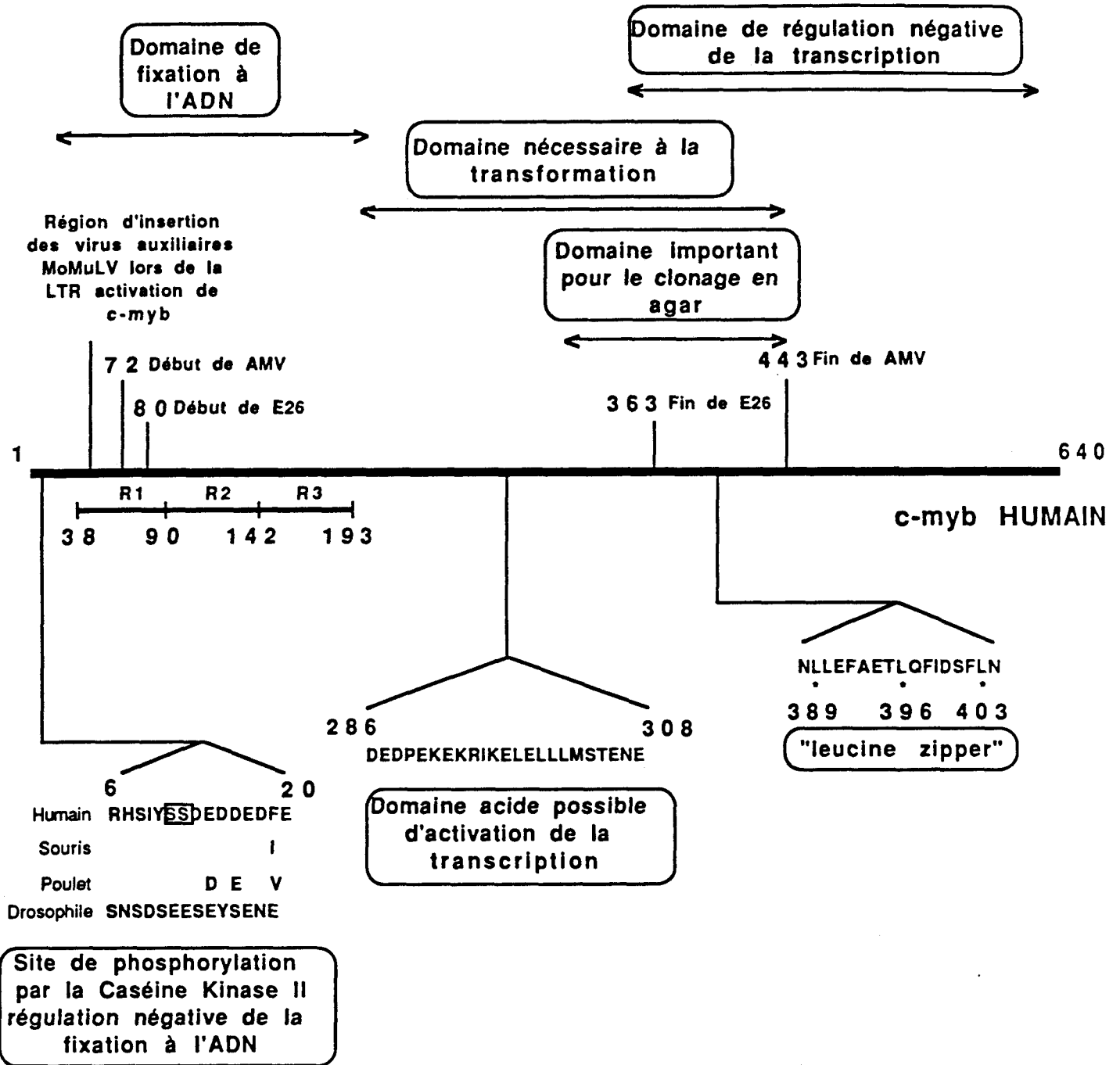


figure 22 : Les domaines fonctionnels de myb

### e) *myb*, un transactivateur

Des travaux de transactivation de gènes témoins ont démontré que *myb* est un transactivateur. Cette transactivation a lieu directement au niveau de la transcription comme le suggère la localisation nucléaire, l'activité de liaison à l'ADN. Ces résultats rejoignent les homologies retrouvées avec C1 chez *Z. mays* et BAS1 chez *S.cerevisiae*, eux-mêmes facteurs de transcription (Weston et Bishop, 1989 ; Klempnauer et al., 1989).

Des travaux plus récents confirment que le domaine de fixation à l'ADN de *v-myb*, couplé à la protéine HSV VP16 se fixe *in vivo* sur la séquence consensus Py AAC G/T G, et active fortement la transcription. Cependant, la transcription par la *p48<sup>v-myb</sup>* elle-même n'est pas activée de la même façon. Il semble donc que la protéine *p48<sup>v-myb</sup>* seule soit nécessaire mais non suffisante pour stimuler la transcription (Ibanez et Lipsick, 1990). Aussi peut-on supposer que la *p48<sup>v-myb</sup>* nécessite l'interaction avec un autre facteur de transcription liant l'ADN, ce qui rendrait la transactivation par *myb*, promoteur- ou tissu-spécifique. Il est par ailleurs intéressant de constater que la protéine BAS-1 apparentée à *myb* n'active la transcription de HIS4 qu'en association avec BAS2 (Tice-Baldwin et al., 1989). Des mutants de délétions ont permis de montrer par ailleurs que la région carboxy terminale est nécessaire à la transactivation (Ibanez et Lipsick, 1990).

*c-myb* est lui aussi un transactivateur (Nishina et al., 1989). Deux régions ont pu être identifiées dans l'extrémité 3', importantes pour l'activité de *c-myb*. Une région correspondant au domaine transactivateur (résidus 241 à 325), riche en résidus acides (comme les domaines transactivateurs de GAL4 et GCN4), contient entre les positions 286 et 308 neuf résidus acides et quatre résidus basiques. Cette région de 80 résidus est proche du domaine de liaison à l'ADN. Vers l'extrémité C-terminale, on trouve une région susceptible d'entraîner une répression de la transcription. La délétion de cette région de 175 acides aminés augmente significativement la transcription (Sakura et al., 1989).

Cette fraction de répression n'est pas sans rappeler l'augmentation de la transcription par le récepteur des hormones stéroïdiennes lors de la délétion du domaine de liaison à l'hormone (Hollenberg et al., 1987). Le domaine de régulation négative de *c-myb* implique une région (résidus 460-494 du *c-myb* de souris) qui est conservée dans beaucoup d'espèces dont la *Drosophile*. La séquence d'acides aminés en amont (résidus 415-459) est conservée entre le *c-myb* humain et le gène *B-myb* apparenté. *c-myb* pourrait donc à la fois transactiver et réprimer la transcription comme le récepteur des glucocorticoïdes (Ackerblom et al., 1988) et le récepteur des hormones thyroïdiennes (Glass et al., 1988).

### f) *mim-1*, un gène cible pour *v-myb*

Il existe des consensus de fixation pour *myb* situés sur différents gènes. Parmi eux on trouve *c-myb*, lui même (Dvorak et al., 1989), le génome de SV40 avec MBS-1 et MBS-II (Sakura et al., 1989). Il existe des mutants thermosensibles de E26 permettant par un changement de température d'induire ou de réprimer la différenciation de myéloblastes (Beug et al., 1987). Ce système est très utile pour trouver par criblage différentiel des gènes spécifiques de l'un ou l'autre état de différenciation. C'est ainsi qu'on a pu découvrir le gène *mim-1* exprimé dans les granulocytes normaux immatures et codant pour un produit sécrétable des granules trouvés dans ces cellules (Ness et al., 1989). Le gène *mim-1* est activé par *v-myb* dans les cellules de type myéloïde uniquement mais pas dans les lignées érythroïdes ou autres. Cela traduit la haute spécificité de *v-myb*. Il est intéressant de noter également que *mim-1* n'est pas transcrit dans les cellules myéloïdes transformées par AMV. L'étude de la région promotrice de *mim-1* a permis de retrouver trois sites consensus pour la fixation de *v-myb*, fonctionnellement susceptibles de fixer *v-myb*. Des expériences ont suggéré la possibilité de la fixation de plusieurs protéines *myb* selon un mode de coopération.

### g) Régulation de l'activité transcriptionnelle de *myb*

Des travaux concernant *v-myb* semblent montrer que la forme dimère est plus stable que la forme monomère, d'autant qu'existerait une séquence homologue à un domaine "leucine zipper" (Bading, 1988). Cependant cette notion est controversée (Ibanez et Lipsick, 1990). *myb* contient plusieurs sites consensus conservés pour la phosphorylation par la caséine kinase II. *myb* est phosphorylé *in vivo* et *in vitro* par la caséine kinase II en un site situé près du domaine de fixation à l'ADN. La phosphorylation en ce site régule négativement la fixation spécifique de *myb* à l'ADN. Les délétions observées dans l'extrémité N-terminale de *myb* entraînent l'élimination de ce consensus de phosphorylation. Ces délétions rendent la fixation à l'ADN indépendante de la phosphorylation par la caséine kinase II. Le site de phosphorylation est composé de deux résidus sérine situés en position 11 et 12 au milieu d'un consensus de reconnaissance de la caséine kinase II compris entre les positions 11 à 18 (Lüscher et al., 1990). L'activation oncogénique de *myb* implique des délétions des régions N-terminale et C-terminale à des degrés divers. Ainsi aucune incorporation de phosphate par la caséine kinase II n'a-t-elle pu être détectée dans la protéine *v-myb* de AMV, ni dans les protéines *c-myb* des lignées leucémiques murines induites par des virus.

Des associations avec des protéines de la matrice nucléaire pourraient avoir un certain rôle dans la régulation de l'activité transcriptionnelle (Boyle et Baluda, 1987 ; Mitchell et Tjian, 1989).

Une régulation indirecte par la demi-vie courte des protéines *c-myb* pourrait intervenir. En effet la dégradation de la protéine est sensible au choc thermique qui accroît la stabilité des protéines *c-myb* (Lüscher et Eisenman, 1988).

## 2) *ets*

### a) La famille des gènes *ets*

Le génome du rétrovirus E26 contient deux oncogènes, *v-myb* et *v-ets* qui contribuent tous deux à la transformation. Plusieurs gènes d'origine cellulaire homologues à l'oncogène *v-ets* ont été identifiés dans plusieurs espèces vertébrées et invertébrées :

- chez le Poulet : *ets1* (Gegonne et al., 1987 ; Leprince et al., 1988), le progéniteur de *v-ets* et *ets2* (Boulukos et al., 1988),
- chez la Souris : *ets1* et *ets2* (Watson et al., 1988),
- chez l'Homme : *ets1* et *ets2* (Watson et al., 1986 ; De Taisne, 1984), *erg-1* (Rao et al., 1987 ; Reddy et al., 1987), *elk-1* et *elk-2* (Rao et al., 1989),
- chez la Drosophile : *ets2* (Pribyl et al., 1988), E74 (Burtis et al., 1990 ; Urness et Thummel, 1990),
- chez l'Oursin : *ets2* (Chen et al., 1988)

Les produits des gènes *c-ets1* et *c-ets2* ont pu être identifiés dans différents types cellulaires (Chen, 1985 ; Ghysdael et al., 1986 a et b ; Pognonec et al., 1988 ; Leprince et al., 1988 ; Fujiwara et al., 1988). Il s'agit de phosphoprotéines à durée de vie courte. Les protéines *c-ets1* et *c-ets2* ont une localisation nucléaire, elles font partie des protéines associées à la chromatine. Elles sont susceptibles *in vitro*, de se lier à l'ADN lorsqu'elles ne sont pas phosphorylées (Pognonec et al., 1990). Ces protéines ont en commun deux domaines de forte homologie : la première région (70 % d'homologie) s'étend sur 96 acides aminés proches de l'extrémité N-terminale, la seconde région (90 % d'homologie) comprend 110 acides aminés de l'extrémité C-terminale (Boulukos et al., 1988 ; Watson et al., 1988). Le domaine C-terminal est conservé chez tous les membres de la famille *ets* identifiés à l'heure actuelle. Ce haut degré de conservation est en rapport avec la fonction essentielle de cette région qui est de diriger ces protéines dans le noyau et d'assurer la capacité de liaison à l'ADN *in vitro* (Boulukos et al., 1988).

Plusieurs études tendent à montrer que les protéines *c-ets1* et *c-ets2* ont des fonctions de régulation dans la cellule. Ces protéines assurent au niveau du noyau la transmission de signaux moléculaires initiés à la surface de la cellule. L'expression de *c-ets2* est induite rapidement de façon transitoire lors de la régénération du foie de souris (Bhat et al., 1987). De même *c-ets2* est induit lors du traitement des macrophages par le cMGF (Boulukos et al., 1990). *c-ets1* et *c-ets2* sont exprimés lors de la stimulation de la croissance de fibroblastes de souris par le sérum (Bhat et al., 1987). La stimulation du récepteur des cellules T par des lectines mitogènes ou des anticorps monoclonaux dirigés contre des composants de ce récepteur induisent une phosphorylation rapide et transitoire, dépendante du calcium des protéines *c-ets1* et *c-ets2* (Pognonec et al., 1988). Cette phosphorylation entraîne une perte de l'affinité de ces protéines *in vivo* pour la chromatine et *in vitro* pour l'ADN (Pognonec et

al., 1989). Toutes ces constatations seraient en faveur d'un rôle des protéines *ets* dans la régulation de la transcription.

### b) Les protéines *ets*, des facteurs de transcription

Wasylyk et al. en 1990, démontrent que les proto-oncogènes *c-ets1* et *c-ets2* sont des facteurs de transcription. Le motif de fixation à l'ADN a été retrouvé dans le domaine  $\alpha$  de l'activateur du virus de polyome. Cette région contient les sites de fixation de PEA1 (AP1) de PEA2 et de PEA3. PEA3 est une cible nucléaire pour l'activation de la transcription par les oncogènes *v-src*, moyen T de polyome, *c-Ha-ras*, *v-mos*, *v-raf*, par le TPA et par les composants du sérum (Wasylyk et al., 1989). Dans cette activation, PEA1 et PEA3 coopèrent dans la réponse du domaine  $\alpha$  du virus de polyome à l'expression d'oncogènes.

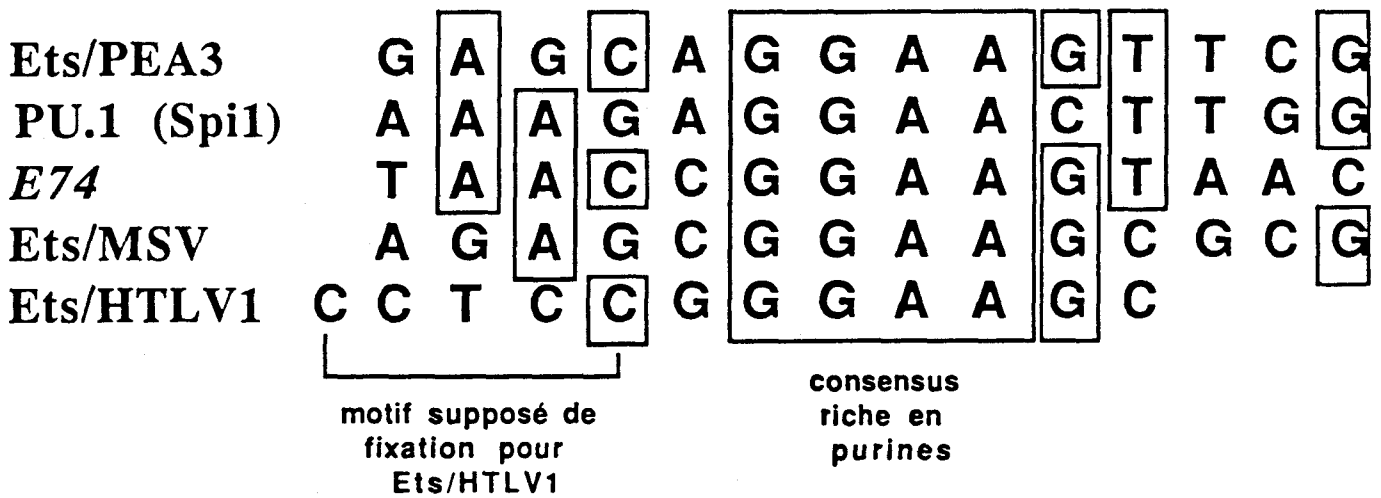
L'expression de la protéine p68<sup>*c-ets1*</sup> peut activer la transcription en présence du motif PEA3 uniquement (présent à une ou plusieurs copies) des mutations dans le site AP1 ne modifiant pas son activité. La protéine p68<sup>*c-ets1*</sup> forme un complexe spécifique avec le motif PEA3. Lorsque la protéine p68<sup>*c-ets1*</sup> est liée à un domaine de fixation hétérologue à l'ADN, les résultats obtenus permettent de confirmer l'existence d'un ou plusieurs domaines activateurs de la transcription. De plus p68<sup>*c-ets1*</sup> coopère dans l'activation de la transcription avec le complexe *c-fos/c-jun* se fixant sur AP1. Les protéines p54<sup>*c-ets1*</sup>, p58/64<sup>*c-ets2*</sup> activent également la transcription en se fixant sur le motif PEA3 (figure 23).

En conclusion, les protéines de la famille *ets* présentent un domaine de fixation à l'ADN situé dans la région C-terminale basique et hautement conservée entre les membres de la famille ; le domaine activateur de la transcription semble se situer dans la partie N-terminale. L'absence d'homologie entre les membres de la famille *ets* et les autres facteurs de transcription suggère que nous sommes en présence d'une nouvelle famille de facteurs de transcription. Le domaine présumé de fixation à l'ADN des gènes de la famille *ets* est d'un type nouveau : 3 tryptophanes séparés par 17 ou 18 acides aminés, comme pour *myb*, sont hautement conservés (Karim et al., 1990). Il est intéressant de noter que l'association des motifs AP1 et PEA3 est retrouvée dans un certain nombre de promoteurs conditionnant la réponse aux oncogènes de certains gènes : *stromelysin*, *IL2*, *fos*.

### c) Les protéines *ets*, des facteurs de transcription : des confirmations

En étudiant les protéines impliquées dans la régulation de la transcription des rétrovirus murins dans les lymphocytes T, Gunther et al. (1990) ont démontré qu'un membre de la famille des gènes *ets* codait pour une de ces protéines. En effet un clone incomplet d'ADN complémentaire du gène *c-ets1* murin a été obtenu par criblage d'une banque d'ADNc de souris avec une sonde oligonucléotidique constituée d'une séquence de 20 paires de bases du LTR du virus du sarcome murin de Moloney.





**figure 23 : Consensus de fixation sur l'ADN des gènes de la famille ets**

Des facteurs nucléaires présents dans les lymphocytes se lient à une séquence consensus, le motif PU, riche en purines. La protéine PU-1 a ainsi pu être isolée en criblant une banque d'ADN complémentaire de macrophage à l'aide de sondes oligonucléotidiques contenant le motif PU (Klemsz et al., 1990). La séquence protéique du facteur de transcription PU-1 présente une homologie de 40 % dans son extrémité C-terminale avec les gènes de la famille *ets*, cette région conditionnant la localisation nucléaire et la fixation à l'ADN. De plus l'oncogène présumé *Spi-1* activé par l'insertion provirale du virus murin SFFV (pour Spleen Focus Forming Virus) dans les tumeurs érythroblastiques de Friend et le gène PU-1 sont identiques (Moreau-Gachelin et al., 1988 ; Moreau-Gachelin et al., 1990 ; Goebel et al., 1990).

Les proto-oncogènes *c-ets1* et *c-ets2* transactivent le LTR du virus des leucémies humaines à T-lymphocytes, HTLV-1, mais en se fixant à une séquence différente des consensus PU (Bosselut et al., 1990).

### 3) *myc*

L'expression contrôlée du proto-oncogène *c-myc* est impliquée dans la régulation de la prolifération cellulaire (Einat et al., 1985 ; Kaczmarek et al., 1985). Son expression anormale intervient dans la pathogénie de différents processus malins, tumeurs lymphoïdes chez le Poulet, la Souris et l'Homme, cancer du poumon à petites cellules chez l'Homme (pour revue : Martin, 1986 ; Saule, 1987). Les gènes *c-myc* aviaires, murins et humains sont composés de trois exons, dont seuls les exons 2 et 3 codent pour la protéine (Ferré, 1986). Les protéines *c-myc* sont des phosphoprotéines de durée de vie courte (15 à 30 minutes), à localisation nucléaire, et pouvant lier l'ADN *in vitro* (Eisenman et al., 1985 ; Hann et al., 1985 ; Ramsay et al., 1984). Les protéines *c-myc* sont phosphorylables par la caseine kinase II (Lüscher et al., 1989). La séquence protéique obtenue à partir de la séquence nucléotidique est composée de 439 acides aminés avec une masse moléculaire de 49 kD (Watt et al., 1983), mais des anticorps spécifiques précipitent des protéines avec une masse apparente de 62 à 67 kD (Hann et Eisenman, 1984 ; Ramsay et al., 1984). *c-myc* fait partie des oncogènes à localisation nucléaire prédominante. Ce groupe comprend les protéines *myb*, *fos*, *ski*, *erbA* et *jun* (Eisenman et Thompson, 1986 ; Varmus, 1987).

#### a) Domaines fonctionnels de *c-myc*

Trois caractéristiques principales de *c-myc* peuvent être définies :

- la coopération avec l'oncogène EJ *ras* pour la transformation de fibroblastes embryonnaires de rat,
- la transformation de la lignée Rat-1,
- la localisation nucléaire.

Les exons 2 et 3 codant pour la protéine *c-myc* de 439 acides aminés peuvent être globalement divisés en quatre domaines (Stone et al., 1987).

- le domaine I (acides aminés 1 à 104) dans l'exon 2,
- le domaine II (acides aminés 105 à 143) dans l'exon 2,
- le domaine III (acides aminés 144 à 319) dans l'exon 2 et l'exon 3,
- le domaine IV (acides aminés 320 à 439) dans l'exon 3.

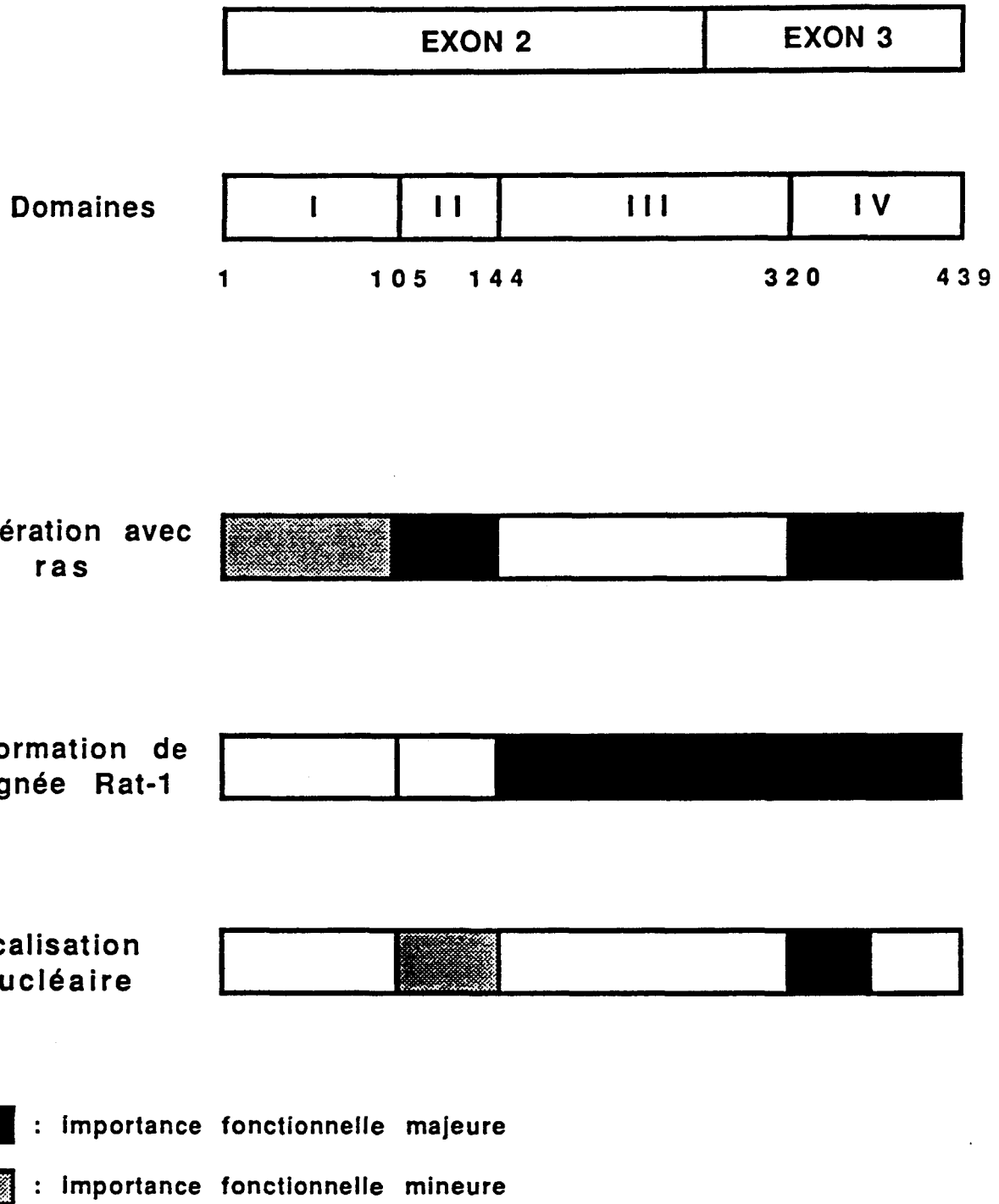
Des études de mutants d'insertion et de délétion (Stone et al., 1987) ont permis de rattacher les propriétés et les domaines (figure 24). Les régions II et IV sont indispensables aux propriétés de coopération de *myc* avec *ras*. La région I joue un rôle dans cette propriété sans que sa délétion supprime totalement la fonction. La région III ainsi que la fin de la région IV sont importantes pour la transformation des cellules Rat-1. La région I a une importance beaucoup plus réduite pour la transformation que pour la coopération. Les séquences indispensables à la localisation nucléaire se situent dans la région IV, C-terminale.

#### **b) La région IV : une région de fixation**

En analysant la séquence de la région IV (figure 25) située entre les acides aminés 346 et 434 à la recherche de consensus, Dang et al. (1989) ont mis en évidence une structure pouvant correspondre à un domaine de liaison de type "leucine zipper". D'autres auteurs considèrent que ces leucines et les autres acides aminés de la région constituent une nouvelle structure de fixation s'étendant de la position 346 à la position 403 (Murre et al., 1989a). Cette région prendrait une conformation de type hélice-boucle-hélice (en anglais Helix-Loop-Helix ou HLH). Ce nouveau motif de fixation a pu être décrit à partir de l'isolement de deux ADN complémentaires (ADNc), E12 et E47 dont les produits sont susceptibles de se fixer sur l'activateur des chaînes Kappa d'immunoglobuline,  $\kappa E2$ . Ces ADNc présentent de fortes homologies avec le gène de *Drosophile* "daughter less", les trois protéines *myc*, les gènes apparentés à Myo D impliqués dans la myogénèse et les membres des familles de gènes "twist" et "achaete-scute" de la *Drosophile*. Les régions homologues ont toutes la propriété de former deux hélices amphipathiques séparées par une séquence intermédiaire en forme de boucle. Cette région intervient dans la fixation des protéines entre elles en vue de la formation d'homo ou d'hétérodimères et dans la fixation à l'ADN (Murre et al., 1989b). Cependant *myc* ne semble pas pouvoir se fixer sur la séquence consensus de  $\kappa E2$  (Murre et al., 1989a).

#### **c) *myc* est-il un facteur de transcription ?**

Alors que les effets biologiques attribués à *c-myc* sont très nombreux, les mécanismes d'action sont très mal connus. Bien que beaucoup d'auteurs pensent que *c-myc* est un activateur transcriptionnel, les observations accréditant cette hypothèse sont indirectes, et parfois incompatibles avec cette fonction (Prendergast et Cole, 1989). Bien que les protéines *myc* soient capables de lier l'ADN



**figure 24 : Domaines fonctionnels de c-myc**



double brin et simple brin, aucune séquence spécifique n'a pu être clairement identifiée comme pour les autres oncogènes *jun*, *myb* ou *ets* (Abrams et al., 1982). Quand la région N-terminale de *c-myc* est fusionnée avec la région de fixation à l'ADN du répresseur de *LexA* dans la levure, la protéine de fusion peut activer la transcription des gènes situés en aval de l'opérateur *LexA* (Smith et al., 1990 ; Lech et al., 1988). Cependant cet effet est beaucoup moins important qu'avec *c-fos* et son implication dans l'activation de la transcription des cellules des organismes supérieurs n'est pas clairement confirmée.

La région C-terminale de *myc* contient un motif susceptible d'interagir avec l'ADN ou d'autres protéines. Des études de fixation covalente chimique entre *myc* et d'autres protéines ont permis d'isoler une protéine appelée MYAP (pour *myc* Associated Protein) d'une masse apparente de 500 kD présentant une durée de vie longue (demi-vie supérieure à 3 heures) (Gillepsie et Eisenman, 1989). Des travaux effectués sur *v-myc* ont permis de suspecter une fixation de la protéine, directe ou indirecte à une région d'ADN riche en A-T (Dissous et al., soumis).

Iguchi-Arigo et al. (1987) ont montré que *c-myc* pouvait intervenir dans la réplication de l'ADN cellulaire à partir de séquences pouvant se répliquer de façon autonome dans les cellules murines et humaines. La séquence de fixation consensus TGAATAGTCA a pu être ainsi définie (Iguchi-Arigo et al., 1988). Des travaux plus récents effectués par la même équipe (Arigo et al., 1989) ont permis de détecter une séquence consensus de 7 bases TCTCTTA, située en amont du premier exon du gène *c-myc* lui-même, sur laquelle *c-myc* pourrait se fixer et réguler sa propre transcription.

Le produit de *c-myc* peut transactiver le promoteur de E4 de l'Adénovirus dans des cellules embryonnaires en utilisant la même séquence cible que le produit du gène E1a (Onclercq et al., 1988). Lorsque E1a transactive les gènes de l'adénovirus, il agit par l'intermédiaire d'un facteur cellulaire appelé ATF (pour Activating Transcription Factor). Ce facteur se lie à plusieurs sites dans l'ADN (Lee et Green, 1987). *c-myc* peut activer le promoteur de la protéine de choc thermique humaine HSP 70 (Kaddurah-Daouk et al., 1987). Or il existe un site consensus de fixation de ATF dans le promoteur de HSP 70 (Green et al., 1987). Aussi peut-on supposer que *c-myc* n'agit pas directement dans la transactivation, mais passe par l'intermédiaire de complexes protéiques.

Récemment Eisenman et al., en criblant une banque d'expression avec un segment de 92 acides aminés de *myc* contenant les motifs HLH et "leucine zipper" (Marx, 1990) ont pu isoler une autre protéine spécifique se liant à *myc* baptisée MAX et possédant une homologie partielle avec *myc* dans la région HLH et "leucine zipper". Dans la régulation de la transcription surviennent de nombreuses interactions protéine-protéine. Un groupe particulier de protéines, les adaptateurs ou coactivateurs, a été conçu sur la base de résultats expérimentaux. Il s'agirait de protéines servant d'intermédiaire de liaison entre des facteurs de transcription et d'autres protéines du complexe transcriptionnel (Lewin, 1990) ; *myc* pourrait appartenir à ce groupe.

## RESULTATS

Notre travail a essentiellement porté sur l'influence de certains oncogènes sur les neurorétines d'embryon de poulet et de caille en culture. A partir des travaux réalisés dans le laboratoire sur la coopération des oncogènes *v-myc* et *v-mil* dans la transformation des neurorétines (Bechade et al., 1985), nous avons participé à l'analyse de divers mutants (article I et II). Nous avons étudié l'influence des virus sauvages et mutants sur la différenciation des cellules. Il est possible de caractériser quatre types cellulaires particuliers dans la neurorétine. De plus les différences observées entre les mutants dans la différenciation permettent d'avoir une idée des cibles cellulaires touchées par les oncogènes.

D'autres oncogènes ont été étudiés au niveau de leur influence tant sur la croissance des neurorétines que sur la différenciation. Nous avons testé des coopérations entre plusieurs oncogènes. Les coopérations sont habituellement effectuées entre groupes de complémentation, un oncogène du groupe "*myc*" associé à un oncogène du groupe "*ras*". Aucune coopération effective dans la transformation d'un système de cellule n'a été décrite dans la littérature en associant uniquement des oncogènes du groupe "*myc*". C'est pourquoi nous avons construit un virus exprimant deux protéines oncogènes à localisation nucléaire, la p61/63<sup>*myc*</sup> et la P135<sup>*gag-myb-ets*</sup>. Ces deux protéines bien qu'appartenant au même groupe de complémentation coopèrent pour transformer la neurorétine (article III).

La description de ce travail comporte trois parties :

- l'étude de l'influence des oncogènes *v-mil* et *v-myc* sur la croissance des cellules de neurorétine d'embryon de caille,
- l'étude de l'influence des oncogènes *v-mil* et *v-myc* sur la différenciation et la transdifférenciation de cellules de neurorétine d'embryon de caille,
- l'analyse de la coopération dans la transformation des protéines oncogènes nucléaires p61/63<sup>*myc*</sup> et P135<sup>*gag-myb-ets*</sup> et leur influence sur la différenciation et la transdifférenciation.

## I. LE SYSTEME DES NEURORETINES AVIAIRES

La neurorétine est un tissu d'origine neurectodermique. Ce tissu est facilement accessible par dissection de l'oeil. Son étude a pu être approfondie chez les oiseaux et certains reptiles (Okada et al., 1979). Chez l'embryon de poulet de sept jours (CNR), ou chez l'embryon de caille de six jours (QNR), il est possible de disséquer la couche de cellules constituant la neurorétine et de la débarrasser des cellules pigmentaires. Les cellules sont dissociées et mises en culture. Après leur mise en culture, les cellules effectuent 2 à 4 cycles de division et peuvent ensuite être maintenues à l'état quiescent pendant plusieurs semaines (Calothy et al., 1980). Ces cultures contiennent des neurones et des cellules gliales qui, lors de la culture *in vitro*, se transdifférencieront selon les conditions, en cellules du cristallin et en cellules pigmentaires. Ces cellules constituent donc un modèle dans lequel, il est possible d'étudier la prolifération, la différenciation et la transdifférenciation cellulaire.

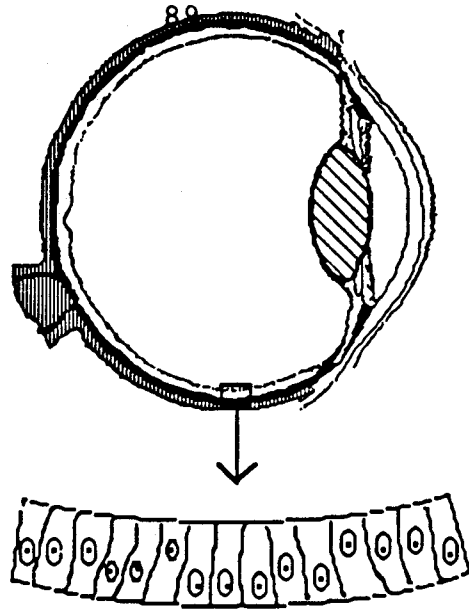
### A. TYPES CELLULAIRES PRESENTS DANS LA NEURORETINE EN CULTURE (revue Okada et al., 1979)

La différenciation et la transdifférenciation cellulaires ont pu être étudiées dans la neurorétine aviaire *in vitro* (Eguchi et Okada, 1973 ; Okada et al., 1979 ; Okada, 1983) (figure 26). Quand des cellules de neurorétines sont mises en culture, deux types cellulaires sont présents : des cellules neuronales et des cellules épithéliales. Ces différents types cellulaires ont la capacité, en culture, de se transdifférencier en deux autres types cellulaires, des cellules de cristallin (Pircher et al., 1987), et des cellules pigmentaires. Ces constatations viennent supporter l'idée de la présence de cellules progénitrices multipotentes.

Une des techniques les plus adaptées à cette étude est la culture clonale des cellules, dans laquelle, une cellule multipotente pourrait donner naissance à des clones présentant plus d'un type de cellules différenciées. Quatre types de clones ont ainsi pu être obtenus : des clones de cellules de cristallin, des clones de cellules pigmentaires, des clones de cellules pigmentaires et cristalliniennes et des clones de cellules non identifiables. Dans les premiers temps de la culture, chaque clone présente un certain nombre de cellules de type neuronal. Ces observations permettent donc de penser qu'existent des cellules progénitrices multipotentes. Après 10 jours de culture, les clones présentent des cellules plates de type épithélial, et des cellules rondes et réfringentes de type neuronal. Après une durée de culture de 30 jours, on constate l'apparition de cellules cristalliniennes et pigmentaires. En revanche, si l'on se situe à un âge embryonnaire de mise en culture supérieur à 6 ou 7 jours aucune colonie mixte n'est observée. Des expériences ont permis de clairement démontrer que les cellules



œil d'embryon de 6 jours de Caille ou de 7 jours de Poulet



Neuroretine

Cellules souches multipotentes

Cellules neuronales

Cellules épithéliales

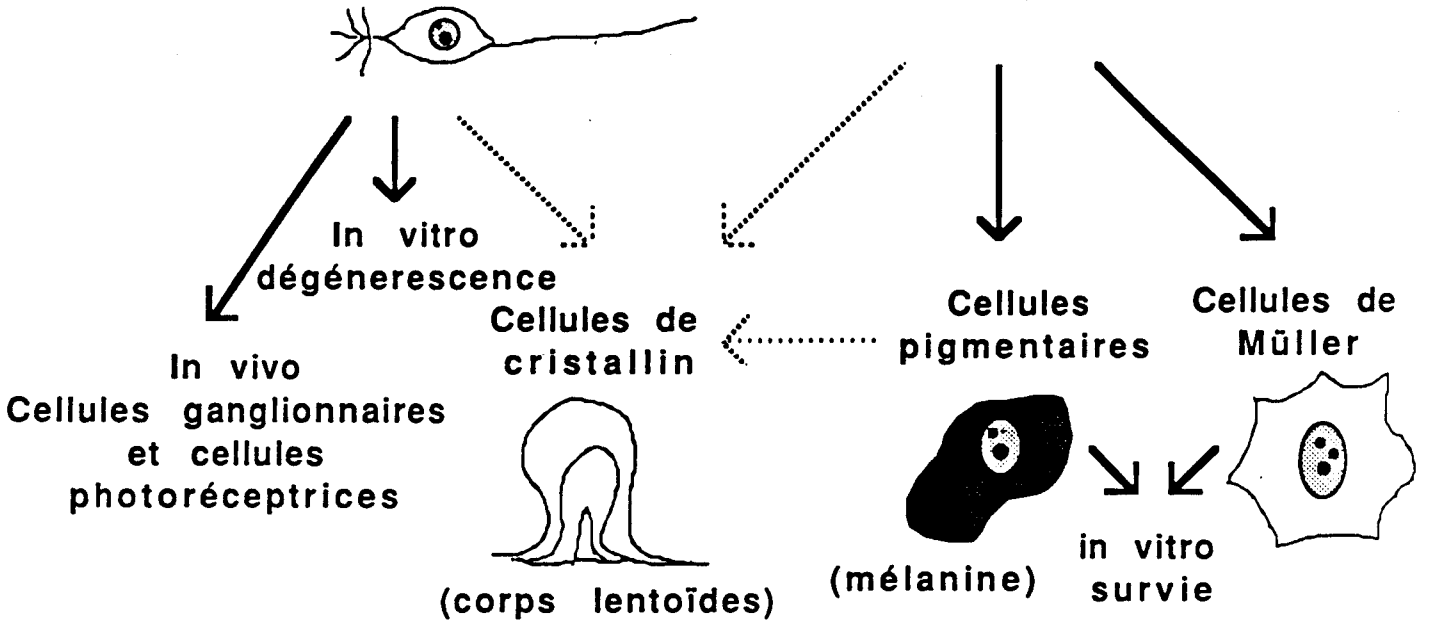


figure 26 : Voies de différenciation des neuroretines

cristalliniennes et pigmentaires provenaient des cellules épithéliales. Des études de micro-cinéma ont montré que les cellules d'origines neuronales ne se transdiffénciaient qu'en cellules de cristallin.

En conclusion, il semble donc exister une cellule multipotente susceptible de se différencier en des cellules neuronales et des cellules épithéliales. Les cellules neuronales se différencient ensuite en cellules ganglionnaires et en cellules photoreceptrices. Les cellules épithéliales se différencient en cellules de Müller, de type glial. Des transdifférenciations s'observent en culture : les cellules neuronales se transdifférencient en cellules de cristallin, et les cellules épithéliales en cellules pigmentaires et en cellules du cristallin.

## B. INFLUENCE DES ONCOGENES SUR LA CROISSANCE DES NEURORETINES EN CULTURE

### 1) Le rétrovirus RSV

Ce virus induit des fibrosarcomes chez les oiseaux et transforme *in vitro* les fibroblastes. La transformation cellulaire est sous la dépendance de l'expression du gène *v-src* (Hanafusa, 1977). L'expression de la protéine phosphorylée pp60<sup>v-src</sup> induit la prolifération des cellules de neurorétine de caille ou de poulet en culture (Pessac et Calothy, 1974 ; Calothy et Pessac, 1976). Ces cellules se modifient morphologiquement, sont susceptibles de donner des colonies en milieu semi-solide et deviennent tumorigènes (Calothy et al., 1978 ; Poirier et al., 1987). Différents mutants de RSV ont permis de localiser entre les acides aminés 32 et 127 de la protéine *v-src* une région responsable des changements morphologiques observés et de l'inhibition de contact (Poirier et al., 1987). En revanche, *c-src* n'est pas susceptible d'induire la prolifération des neurorétines aviaires (Iba et al., 1985b).

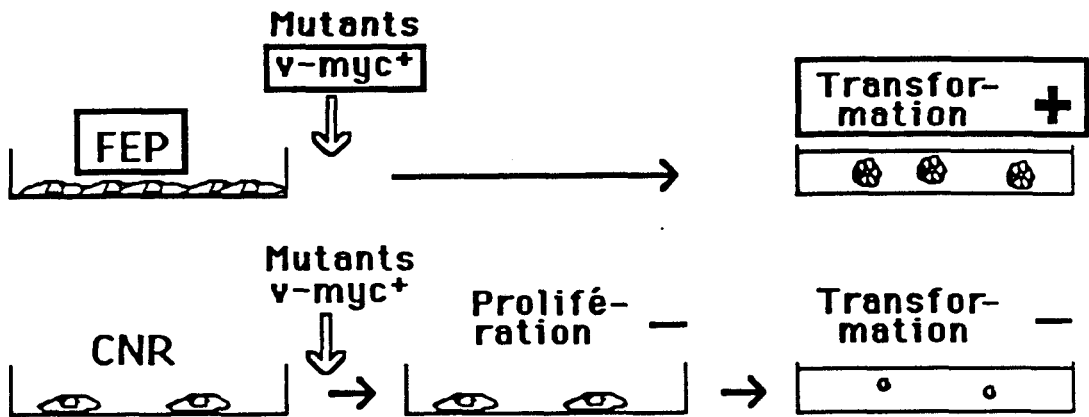
### 2) *v-fos* et *c-fos* (Iba et al., 1988)

Les gènes *v-fos* et *c-fos* peuvent induire la prolifération de cellules de neurorétines aviaires sans changement morphologique particulier. Cet effet est détectable dès le troisième jour après l'infection.

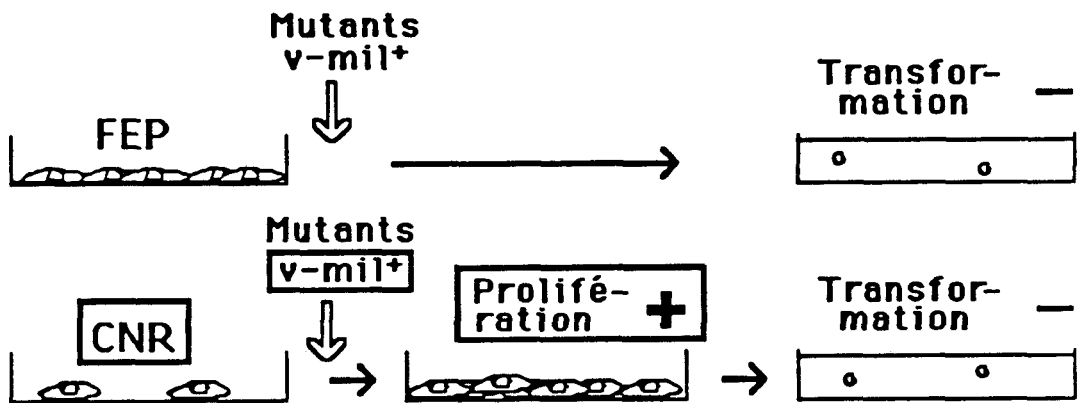
### 3) Les mutants du virus MH2 (articles I et II)

Le virus MH2 et le virus MC29 induisent la transformation des fibroblastes. La prolifération et la transformation des cellules de neurorétine (CNR) peuvent être induites par l'infection à l'aide du virus MH2 (figure 27). En revanche, l'infection des CNR quiescentes par le virus MC29 n'a pas d'effet apparent sur ces cellules dans des conditions de culture données (Bechade et al., 1985). Si

Propriétés biologiques des mutants v-myc<sup>+</sup>



Propriétés biologiques des mutants v-mil<sup>+</sup>



Expérience de reconstitution

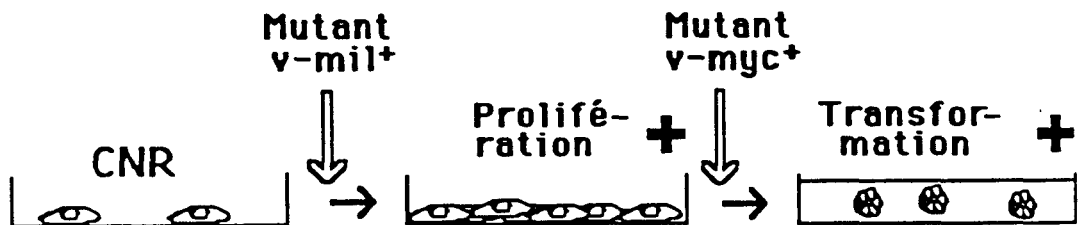


figure 27 : Propriétés biologiques des mutants du virus MH2 et expérience de reconstitution

l'on suppose que les différences de comportement des virus MH2 et MC29 ne sont pas dues aux différences de structure des gènes *v-myc* de ces virus ou à la nature des LTR, cela laisse entrevoir un rôle du gène *v-mil* dans l'induction de la prolifération et/ou de la transformation des CNR par le virus MH2.

Après infection des CNR par MH2, une étude des virus produits dans le surnageant a été entreprise. Cette étude a permis l'isolement de mutants biologiques (figure 28) :

- le mutant MH2-CL25 n'exprimant que le gène *v-myc* de MH2,
- le mutant MH2-PA200 n'exprimant que le gène *v-mil* de MH2.

La caractérisation du mutant MH2-CL25 (Martin et al., 1986a) a montré que le génome de ce virus est en fait l'ARN sous-génomique de MH2 (Saule et al., 1983) propagé par le virus RAV-1.

La caractérisation du mutant MH2-PA200 suggère une recombinaison homologue entre les virus MH2 et RAV-1, conservant seul l'oncogène *v-mil* fonctionnel (article I). Le virus MH2-PA200 a été cloné à partir de cellules de neurorétine de Caille infectées par MH2-RAV-1. Les points de recombinaison des extrémités 3' ont été séquencés. Un deuxième mutant, obtenu dans des conditions similaires mais par des expériences indépendantes, a été obtenu. Ce mutant appelé MH2-PA201 a été cloné à partir de cellules de neurorétine de Poulet infectées par MH2. Les deux mutants semblent provenir de recombinaisons homologues entre le virus MH2 sauvage et le virus auxiliaire RAV-1. Ces mutants sont constitués par des molécules de RAV-1 ayant acquis le gène *v-mil* et 200 à 300 nucléotides du gène *v-myc* à partir du virus MH2 sauvage. Dans le cas des deux virus, MH2-PA200 et MH2-PA201, les points de recombinaison en 3' sont localisés entre les séquences *myc* et *env*.

D'autres mutants construits en laboratoire ont été étudiés. Les mutants ne contenant que *v-myc* fonctionnel (*v-myc+*) se comportent comme le virus MC29. Les mutants *v-mil+* n'ont pas d'effet apparent sur les fibroblastes embryonnaires de poulet. En revanche, ces mutants *v-mil+* induisent la prolifération des CNR ; les courbes de croissance sont semblables à celles observées pour MH2 (Bechade et al., 1985). Cependant les CNR infectées par les mutants *v-mil+* ne clonent pas en milieu semi-solide. Si les gènes *v-myc* et *v-mil* des mutants de MH2 sont supposés avoir conservé respectivement les propriétés des gènes *v-myc* et *v-mil* de MH2, cela implique donc la possible coopération des gènes *v-myc* et *v-mil* pour la transformation des CNR par MH2. Cela a pu être confirmé par une expérience de reconstitution : des CNR quiescentes ont été induites à proliférer par infection avec un mutant *v-mil+* et ces CNR proliférantes mais non transformées ont alors pu être transformées par surinfection avec un mutant *v-myc+*. Cependant, si dans les mutants *v-myc+* aucun peptide de la protéine *v-mil* ne peut être exprimé, dans les mutants *v-mil+* un ARN codant pour une vingtaine d'acides aminés de *v-myc* est produit. Pour éliminer l'influence de ces peptides, des mutants de *v-mil* ont été construits (Dozier et al., 1987 ; Coll et al., 1988). L'étude de ces mutants a montré une activité identique au virus MH2-PA200. Des chimères entre les gènes *v-mil* et

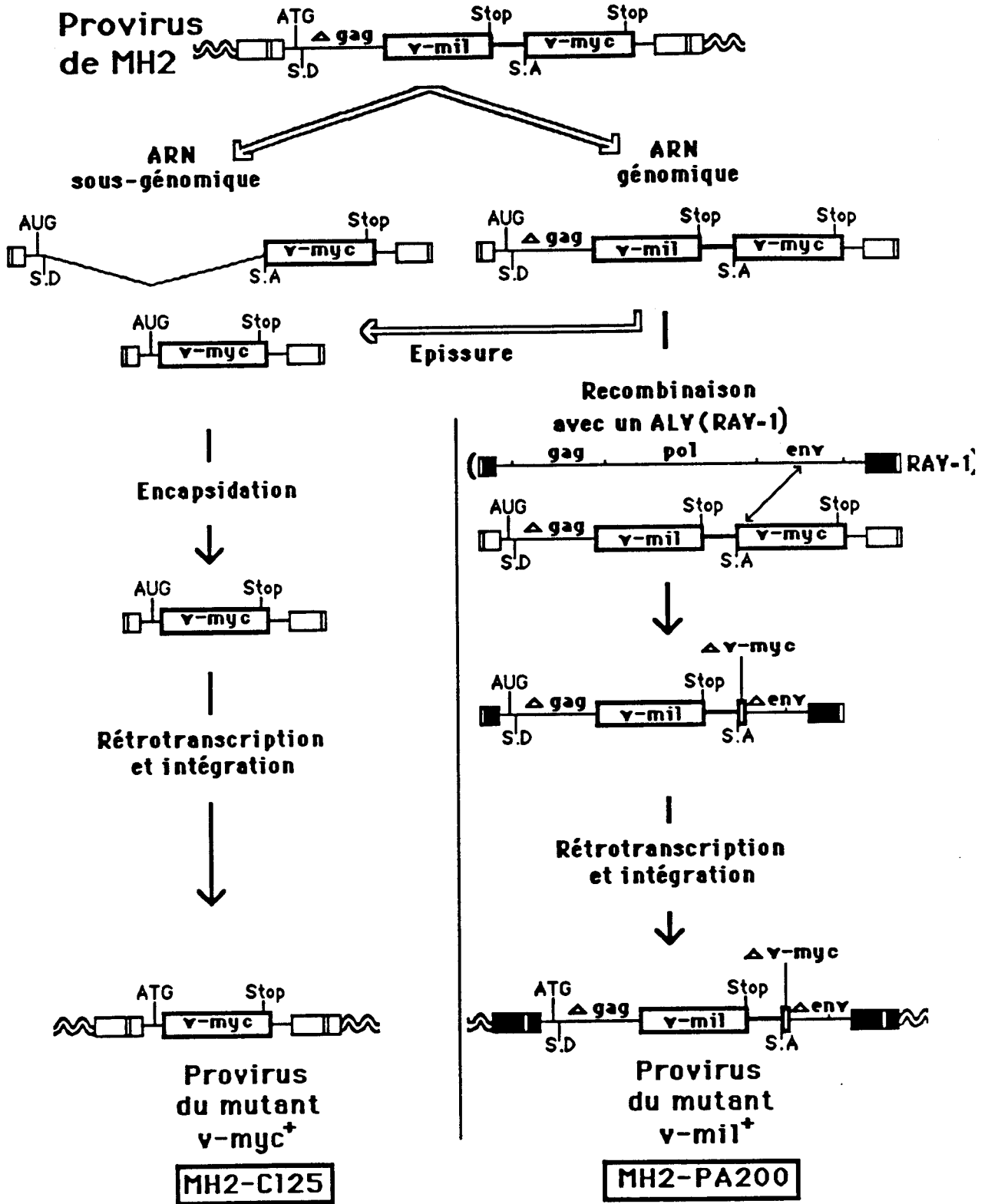


figure 28 : Structure des ARN du virus MH2 et caractérisation des mutants MH2-CL25 et MH2-PA200

*c-mil* aviaires et humains ont été construites pour déterminer précisément les régions du gène *v-mil* impliquées dans l'effet biologique observé sur les CNR (article II). C'est la région carboxyterminale du gène *c-mil* qui s'est montrée suffisante pour induire cette prolifération. Il est intéressant de constater que cette région correspond à la séquence d'acides aminés la mieux conservée au sein des membres de la famille des kinases. De plus des études à partir de tumeurs humaines *in vivo*, ont montré que l'élimination de l'extrémité 5' du gène *c-mil* est suffisante pour activer son potentiel prolifératif (Shimizu et al., 1985 ; Stanton et Cooper, 1987), cette délétion ayant pu survenir lors de la transfection elle-même.

D'autres travaux réalisés sur la neurorétine de poulet ont permis à partir de l'infection par le rétrovirus RAV-1, un ALV, de transduire l'oncogène *v-Rmil* homologue à l'oncogène *c-mil* de Poulet (Marx et al., 1988 a et b) et responsable de la prolifération des CNR induites par le recombinant.

## II. INTERFERENCE DES ONCOGENES *V-MIL* ET *V-MYC* SUR LA DIFFERENCIATION DES CELLULES DE NEURORÉTINE D'EMBRYON DE CAILLE DE 6 JOURS.

Des cultures primaires de cellules de neurorétine d'embryon de caille de 6 jours ont été infectées par le rétrovirus MH2 ainsi que par des mutants obtenus à partir de provirus clonés. Des marqueurs spécifiques des différents types cellulaires observés dans la neurorétine ont été analysés sur les cultures. En utilisant plusieurs marqueurs de surface et des filaments intermédiaires, en réalisant des doubles marquages nous avons pu montrer que des cellules de type neuronal et épithélial prolifèrent. Des corps lentoides et des cellules pigmentaires sont retrouvées dans toutes les cultures sauf avec *v-mil* qui ne permet pas de transdifférenciation. Tous ces types cellulaires sont en proportions variées. On note également que les profils de différenciation évoluent en fonction du nombre de passage des cultures. Avec *v-myc*, après le 10<sup>ème</sup> passage les cellules pigmentées deviennent rapidement prédominantes.

### A. MATERIEL ET METHODES

#### 1) Les virus

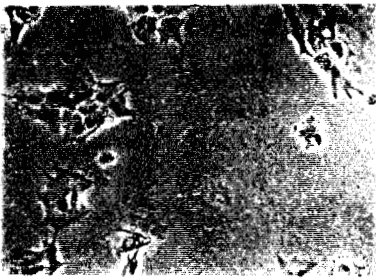
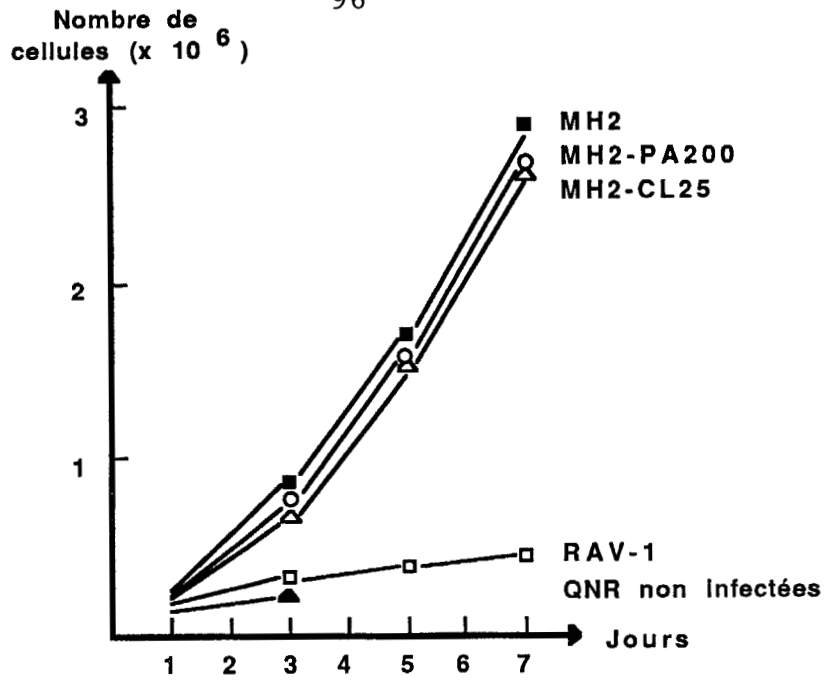
Quatre virus ont été utilisés :

- le virus RAV-1, le "helper", un ALV,
- le virus MH2 sauvage,
- le virus MH2-CL25 porteur de l'oncogène *v-myc*,
- le virus MH2-PA200 porteur de l'oncogène *v-mil*.

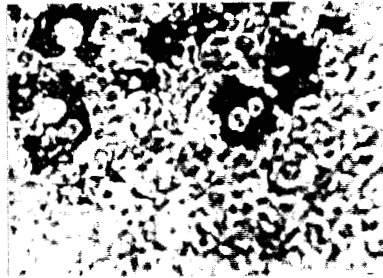
Les virus MH2-CL25 et MH2-PA200 sont des mutants biologiques (Martin et al., 1986a et b) obtenus à partir de l'infection de neurorétines par le virus MH2. Ces trois virus possèdent donc les mêmes séquences activatrices, les LTR du virus MH2.

#### 2) Les cellules (figure 29)

Les neurorétines ont été disséquées à partir d'embryon de caille de six jours. Les cellules ont été dissociées et mises en suspension dans du milieu BME complété avec 10 % de sérum de veau foetal et 1 % de sérum de poulet. Des boîtes de 60 mm contenant  $2 \times 10^6$  cellules dissociées ont été infectées avec les différents virus. Les cellules ont été incubées à 39°C.



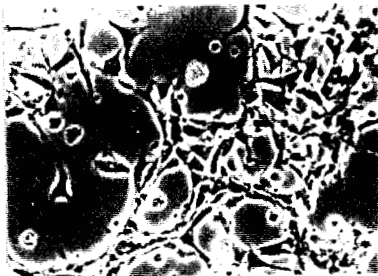
QNR



QNR RAV-1



QNR MH2 RAV-1



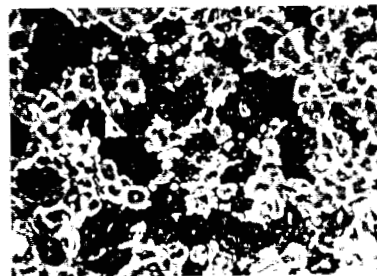
QNR MH2 CL25 RAV-1



QNR MH2 PA200 RAV-1



Corps lentoides



Cellules pigmentaires



figure 29 : Courbes de croissance et morphologies des QNR



### 3) Techniques d'immunofluorescence (figure 30)

Les cellules destinées à être caractérisées ont été cultivées sur des lamelles de microscope de 12 mm préalablement traitées au collagène. Ces lamelles ont été fixées pendant 20 minutes avec du paraformaldéhyde à 3,7 % dans le PBS puis traitées pendant 20 minutes à 4°C avec de l'éthanolamine (150 mM, pH 7,5), rincées et perméabilisées à l'aide de Triton X 100 à 0,15 % dans le PHEM (60 mM piperazine diethylsulfonic acid, 25 mM hydroxyethylpiperazine-N-1,2 éthane sulfonic acid, 10 mM EGTA, 2 mM MgCl<sub>2</sub> pH 6,9) pendant une minute. Ce dernier traitement a été exclus pour les marqueurs à localisation membranaire. Les cellules fixées sont ensuite incubées pendant une heure avec l'anticorps, puis rincées au PBS et incubées avec le deuxième anticorps marqué à l'isothiocyanate de fluoresceine, rincées et montées sur une lame avec du glycérol. Les techniques de double marquage utilisent deux anticorps différents et deux anticorps fluorescents marqués avec un fluorochrome différent (rhodamine ou fluoresceine). Les cellules sont examinées à l'aide d'un microscope Zeiss IM35. Les comptages sont effectués sur plusieurs champs (en moyenne 10) et sur plusieurs lames indépendantes. Les pourcentages sont calculés sur 300 cellules au moins par lame.

### 4) Marquages cellulaires, immunoprécipitation, western blot

Les cellules sont incubées 45 minutes en présence de 30  $\mu$ Ci de L-<sup>35</sup>S méthionine (activité spécifique 1000 Ci/mmmole) et immunoprécipitées selon la technique précédemment décrite (Bechade et al., 1985).

Les cellules sont comptées et lysées, fractionnées sur un gel de polyacrylamide SDS, électrotransférées sur nitrocellulose et marquées avec un antiserum. Les immunoglobulines fixées sont ensuite révélées avec de la protéine A Iodée à l'<sup>125</sup>Iode selon la technique précédemment décrite (Dozier et al., 1987).

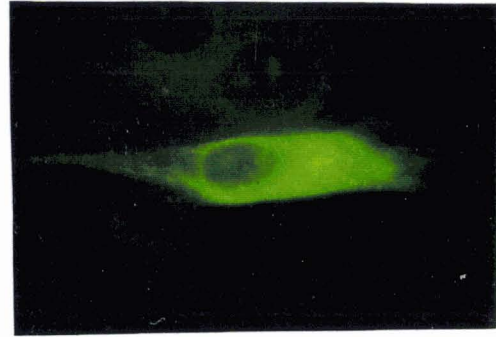
### 5) Anticorps utilisés

Huit anticorps spécifiques ont été utilisés :

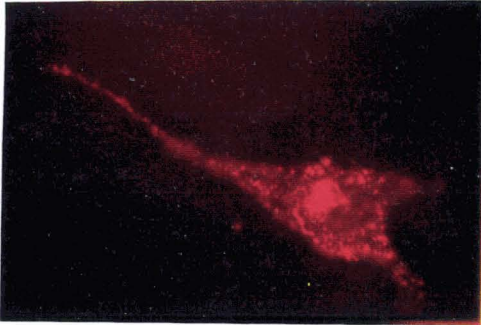
- un anticorps antineurofilament polyclonal (Amouyel et al., 1988) caractéristique des cellules neuronales (fourni par A.Delacourte, Lille),
- un anticorps monoclonal reconnaissant un épitope glycosylé obtenu à partir de ganglion rachidien de poulet et susceptible de marquer un certain type de cellules d'origine neurectodermique neuronale (10 %) ou gliale (90 %) (Snyder et al., 1990 ; Barbu et al., 1986),



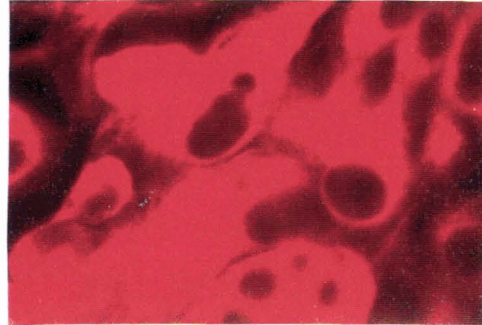
QNR MH2  
Ac anti-neurofilaments



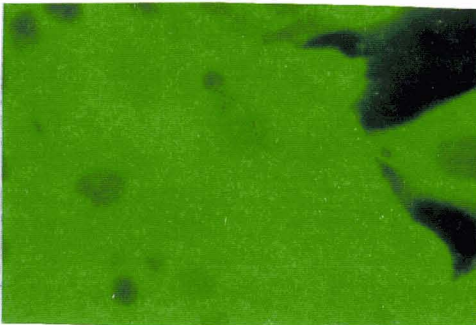
QNR MH2-PA200  
Ac anti-neurofilaments



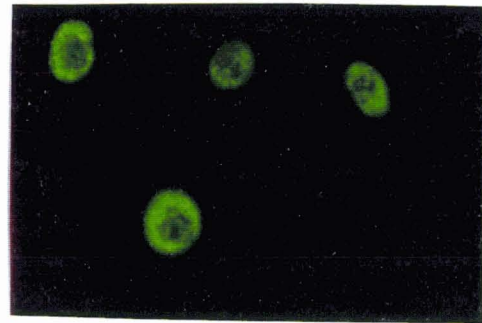
QNR MH2-CL25  
Ac anti-A2B5



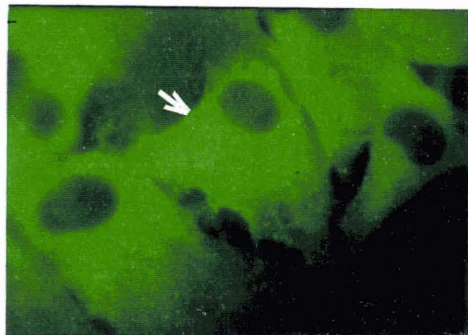
QNR MH2  
Ac anti-3A7



QNR MH2-PA200  
Ac anti-mil

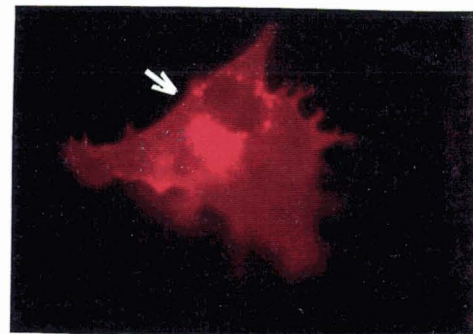


QNR MH2-CL25  
Ac anti-myc



QNR MH2-PA200  
Ac anti-mil

Double  
marquage



QNR MH2-PA200  
Ac anti-Gln1



figure 30 : Aspect des cellules en immunofluorescence

- un anticorps monoclonal dirigé contre un antigène dérivé de rétine d'embryon de poulet de 8 jours, A2B5 caractéristique des cellules de la rétine d'origine neuronale (Eisenbarth et al., 1979) donnant un marquage de surface,
- un anticorps monoclonal dirigé contre un antigène dérivé de rétine d'embryon de poulet de 14 jours, 3A7 caractéristique des cellules de la rétine d'origine gliale (Lemmon, 1985),
- un anticorps monoclonal anti acétylcholine marquant les cellules produisant de l'acétylcholine (Biosoft),
- un anticorps polyclonal dirigé contre le troisième exon de la protéine nucléaire *c-myc* d'origine humaine (Ferré et al., 1986),
- un anticorps polyclonal dirigé contre la protéine cytoplasmique *v-mil* (Bechade et al., 1985),
- un anticorps polyclonal dirigé contre les protéines cristalliniennes ( $\alpha, \beta, \delta$ ) et préparé selon la technique décrite par Pircher et al. (1987).

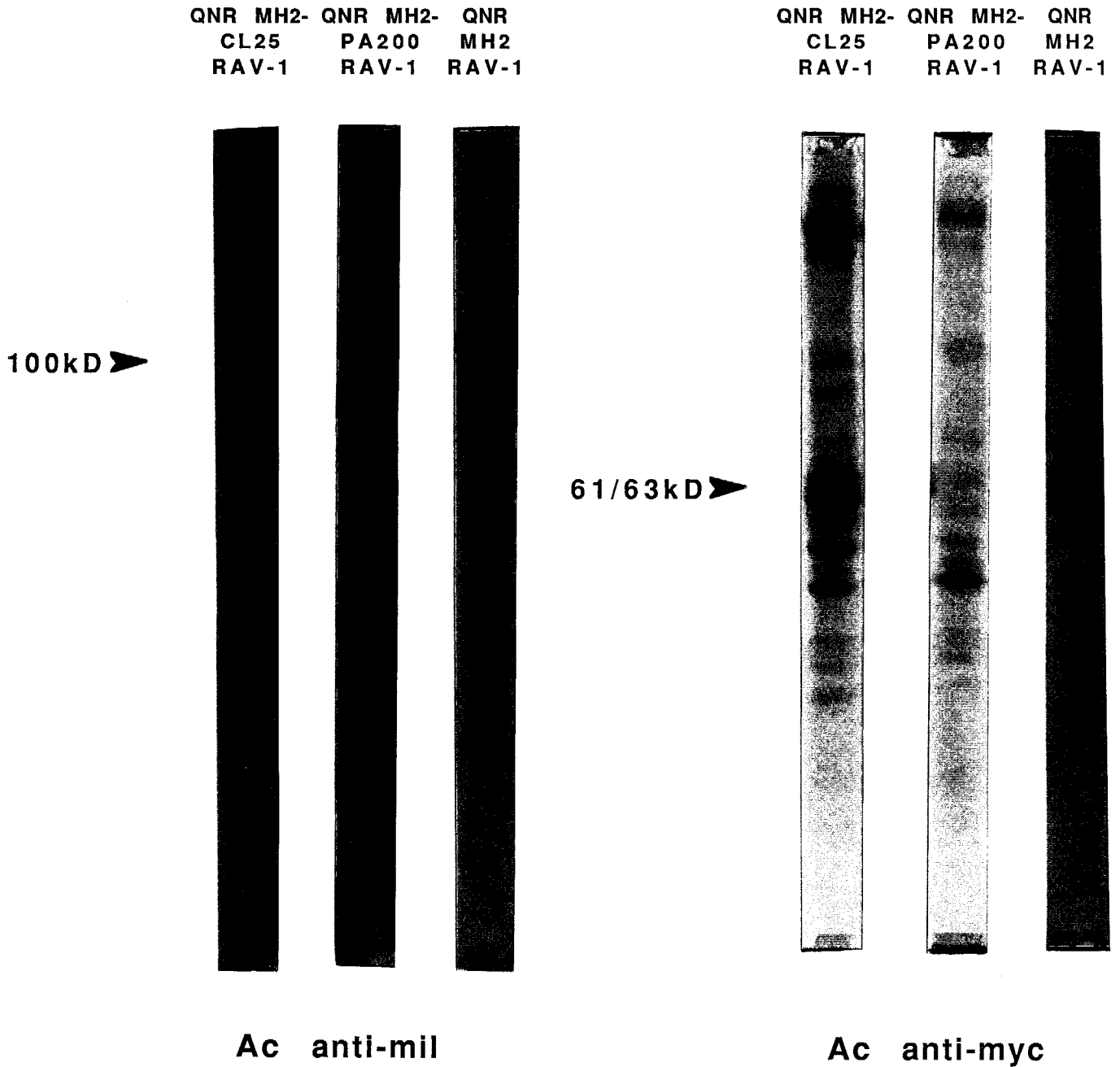
#### 6) Dosage de la mélanine (Hosoi et al., 1985)

Les cellules sont lavées deux fois au PBS, décrochées de la boîte avec une spatule en caoutchouc, centrifugées à 300 g pendant 10 minutes et conservées à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Les cellules sont soniquées dans 1 ml d'eau et le lysat est centrifugé à 1200 g pendant 20 minutes. Le surnageant est éliminé, et le culot est traité par deux précipitations à l'acide trichloroacétique à 10 % et un lavage à l'éthanol absolu. Le précipité est ensuite séché et solubilisé dans un mélange de soude 1 N et de diméthylsulfoxyde à  $10^{\circ}\text{C}$  2 heures à  $80^{\circ}\text{C}$ . Une gamme étalon de mélanine (Sigma) est traitée dans les mêmes conditions. L'absorbance est mesurée à 470 nm, et le contenu en mélanine est exprimé en  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de protéine. La concentration en protéines est mesurée par la méthode de Bradford (1976).

## B. RESULTATS

Les cellules de neurorétine de caille (QNR) non infectées ainsi que les QNR infectées par le virus auxiliaire RAV-1 ont été utilisées comme témoin.

La qualité de l'infection a été contrôlée par immunofluorescence et immunoprécipitation avec des anticorps dirigés contre les différentes protéines oncogènes (figure 31 et 32). Les localisations cellulaires des oncogènes, ainsi que les tailles des protéines visualisées confirment que les QNR expriment les protéines oncogènes. Les courbes de croissance présentent le même profil que celles obtenues sur les neurorétines de poulet (Béchade et al., 1985). Sauf en ce qui concerne l'oncogène



**figure 31 :** Immunoprécipitation des protéines virales oncogènes

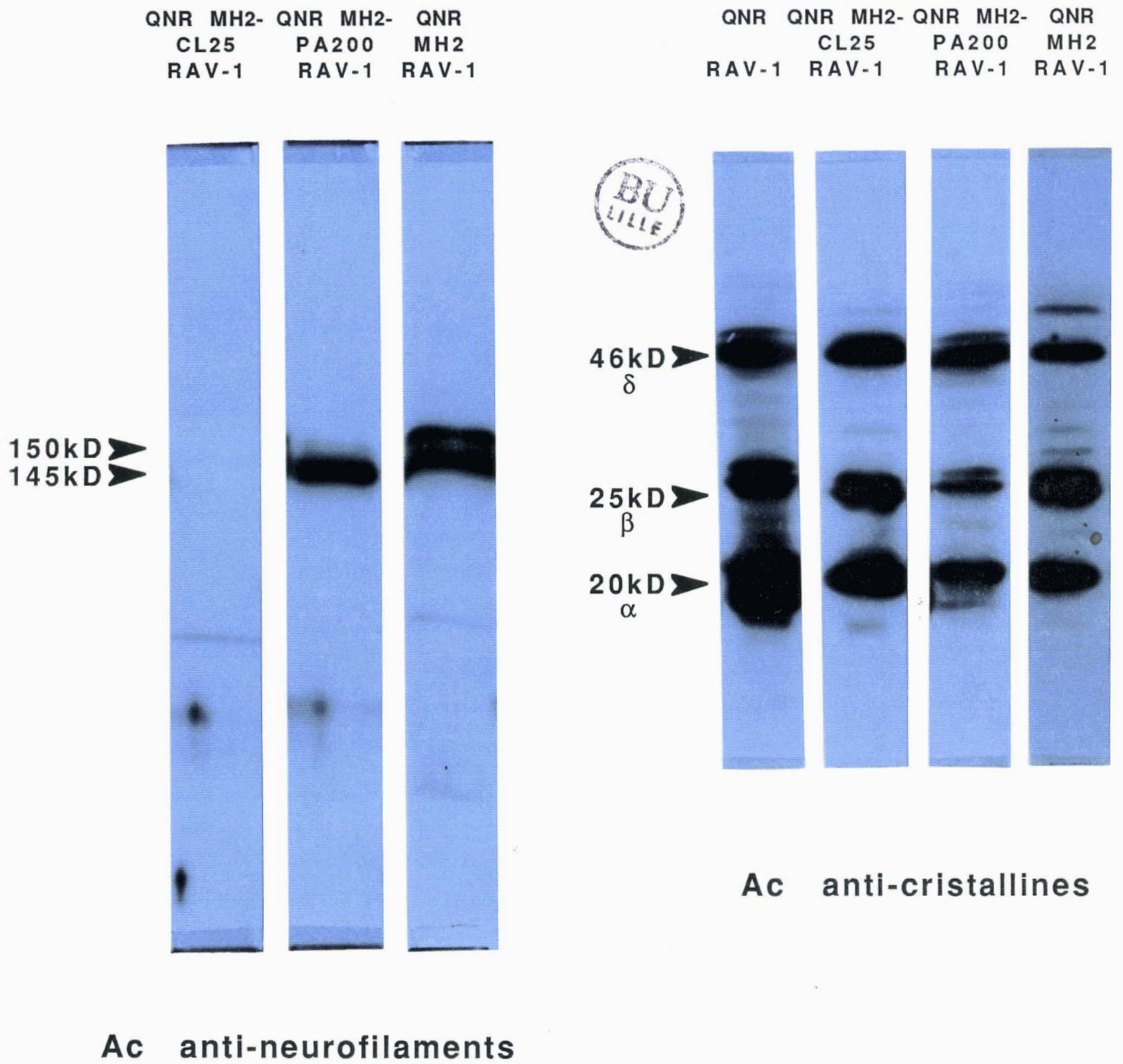


figure 32 : Immunotransferts de marqueurs protéiques de différenciation

*v-myc*. En effet, contrairement à ce qui est observé sur les cellules de neurorétines de poulet, *v-myc* est susceptible d'induire une prolifération des cellules de neurorétines de caille.

Le figure 33 résume les distributions des différents marqueurs caractérisant le type neuronal ou épithélial des cellules. On constate que la grande majorité des cellules, quel que soit le virus utilisé, est marquée par l'anticorps 3A7 dirigé contre les cellules épithéliales. Des doubles marquages associant des anticorps d'origine neuronale entre eux et des anticorps d'origine épithéliale ont été effectués. On note que les QNR présentent l'ensemble des types cellulaires en différentes proportions. Les cellules témoins infectées par RAV1 ne présentent que des marqueurs d'origine épithéliale. Avec le mutant MH2-CL25 porteur de l'oncogène *v-myc* lors des premiers passages, on constate l'existence de quelques cellules exprimant les neurofilaments et d'un nombre important de cellules exprimant l'antigène de surface A2B5. Avec le mutant MH2-PA200 on constate une prédominance de cellules exprimant les neurofilaments, et la persistance de cellules exprimant l'antigène Gln1. Le virus MH2 sauvage présente un profil superposable à celui obtenu avec MH2-PA200. Avec le nombre des passages, ces marqueurs se maintiennent. Un western blot des cellules a été réalisé avec l'anticorps dirigé contre les neurofilaments pour vérifier la spécificité du marquage. On constate qu'en dessous d'un certain pourcentage de cellules, les neurofilaments sont indétectables. C'est la sous-unité moyenne qui est détectée dans les QNR infectées par MH2-PA200 et les sous-unités hautes et moyennes (150 et 145 kD chez les oiseaux) avec MH2.

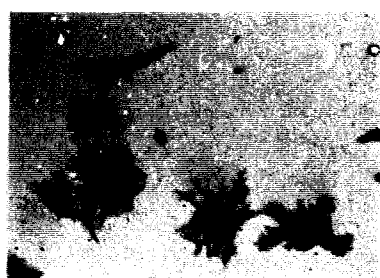
La transdifférenciation des cellules pigmentaires est estimée par la morphologie des cellules et la quantification de leur contenu en mélanine. Lors des 10 premiers passages, seules les QNR infectées par RAV1 présentent un certain pourcentage (10 %) de cellules mélanisées. En revanche après 10 passages en culture, on assiste à un noircissement intense des QNR infectées par MH2-CL25. Ces observations sont confirmées par les dosages de mélanine : après 2 semaines de mise en culture, la concentration de mélanine est de 5 µg/mg de protéine ; elle passe à 60 µg/mg de protéine après trois mois de culture et à 98 µg/mg au bout de quatre mois et demi. La mélanine est indétectable dans les cellules exprimant la protéine *v-mil*.

La recherche de l'expression de neurotransmetteurs s'est révélée techniquement difficile. Cependant nous avons pu constater que des cellules contenant de l'acétylcholine étaient présentes dans les QNR non infectées et les QNR infectées par MH2-CL25 et MH2-PA200.

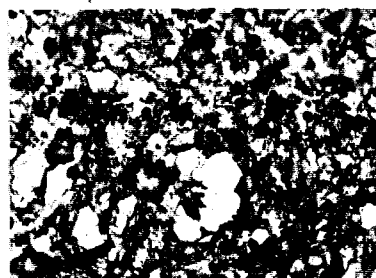
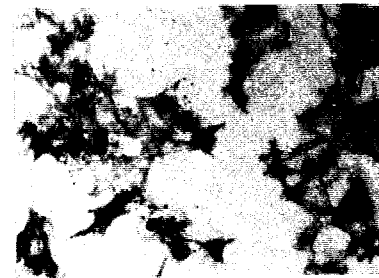
La transdifférenciation cristalliniene a été étudiée morphologiquement par la recherche de corps lenticulaires constitués par l'accumulation de cristallines dans les cellules. Dans tous les types cellulaires des corps lenticulaires ont pu être observés. L'étude immunologique par western blot a permis de constater que toutes les cultures exprimaient les trois cristallines  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\delta$ .

% de cellules	QNR	QNR RAV-1	QNR MH2-CL25 RAV-1	QNR MH2-PA200 RAV-1	QNR MH2 RAV-1
Neurofil.+	12	0	7	23	18
Gln1+	3	0	0	2	0
A2B5+	26	0	20 (<5% après 1mois de culture)	0	15
3A7+	81	100	100	100	97
Neurofil.+ et A2B5+	11	0	1	0	9
Neurofil.+ et 3A7-	15	0	0	0	3
Mélanine	0	10 (après 1mois de culture)	90 (après 1mois de culture)	0	0

+ : marquage      - : pas de marquage



QNR

QNR  
MH2-CL25  
RAV-1QNR  
MH2-PA200  
RAV-1

Aspect des cultures réagissant à l'anticorps  
anti-acétylcholine  
(révélation à la peroxydase)

figure 33 : Répartition des marqueurs de différenciation

### C. DISCUSSION

Dans ce travail, nous avons étudié les effets de *v-mil* et *v-myc* seuls ou ensemble sur le programme de différenciation et de transdifférenciation *in vitro* des cellules de neurorétine de caille embryonnaire de six jours. Nos résultats démontrent que chacun de ces oncogènes est susceptible d'induire une prolifération des cellules neuronales et épithéliales dans les cultures infectées. Ces oncogènes favorisent la prolifération des cellules neuronales, alors que les rares croissances cellulaires induite par le virus auxiliaire RAV-1 se limitent aux cellules épithéliales. La transdifférenciation cristallinienne survient dans l'ensemble des cultures. En revanche, la transdifférenciation pigmentaire n'est jamais retrouvée avec les virus portant l'oncogène *v-mil*. Dans les cultures infectées par *v-myc*, les cellules pigmentaires deviennent prédominantes après une dizaine de passages en culture.

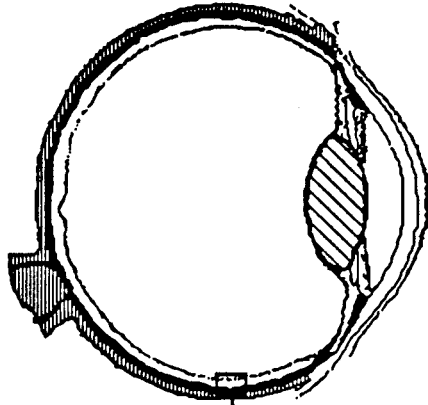
Contrairement à ce qui était classiquement décrit sur les seules données morphologiques (Crisanti-Combes, 1982 ; Béchade et al., 1985), les modifications de la différenciation par les oncogènes *myc* et *mil* sont complexes (figure 34). Un oncogène n'est pas associé à une cellule cible. On observe des prédominances nettes de certains types cellulaires avec certains oncogènes. Les marqueurs de différenciation utilisés permettent de constater que la morphologie neuronale ou gliale est plus hétérogène, certaines cellules étant susceptibles d'exprimer plusieurs marqueurs en même temps comme le montrent les expériences de double marquage. Dans les cultures infectées par *v-myc* et/ou *v-mil*, on observe un certain pourcentage de cellules exprimant des marqueurs neuronaux et gliaux, ces cellules pouvant correspondre aux cellules multipotentes proposées dans le développement de la rétine par Okada et al. (1979).

Globalement dans les cultures infectées par *v-mil* se développent préférentiellement des cellules présentant des caractères de différenciation neuronale. Il est intéressant de remarquer que des cultures transfectées avec un clone moléculaire de MH2 peuvent avec le temps présenter plus de 70% de cellules contenant des neurofilaments.

La transdifférenciation lentoïde est observée avec tous les types de culture, y compris avec MH2 comme le décrivent Simonneau et al. (1986). Cependant lorsqu'on recherche la présence de cristallines dans les cultures de QNR transfectées avec le clone moléculaire de MH2 (il s'agit de cellules dites non productrices ne nécessitant pas l'utilisation d'un virus auxiliaire), on ne détecte pas ces protéines en western blot. Donc l'apparition de ces protéines pourrait être le fait du virus auxiliaire RAV-1 et non de MH2 lui-même.



œil d'embryon de 6 jours de Caille



Neurorétine

Cellules souches multipotentes



Cellules neuronales



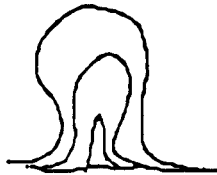
mil myc



PROLIFERATION

Cellules épithéliales

Cellules de cristallin

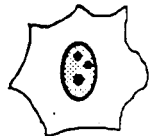


Cellules pigmentaires

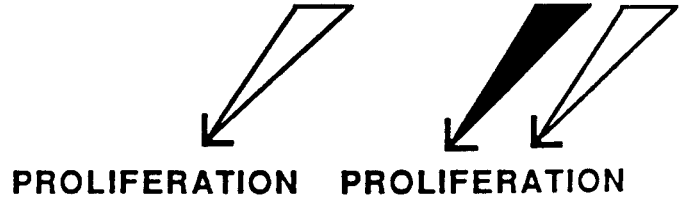


myc

Cellules de Müller



mil myc



PROLIFERATION PROLIFERATION

figure 34 : Influences de mil et myc sur la différenciation des QNR

La transdifférenciation pigmentaire est prédominante après un certain temps de culture avec les virus porteurs de *v-myc*. Ces cellules synthétisent de la mélanine. Une banque d'ADN complémentaire a été réalisée avec ces cellules et hybridée différentiellement avec de la QNR ; deux ARN complémentaires ont ainsi pu être isolés par P.Martin et être rattachés à l'expression d'ARN messagers surexprimés dans les cellules infectées par *v-myc* et non dans les QNR normales. Ces ADN complémentaires sont en cours d'analyse.

D'autres études menées avec les virus MC29 et les mutants de MH2 construits *in vitro* ont permis d'observer les mêmes résultats et de conclure à la faible influence des séquences activatrices LTR des rétrovirus intéressés. Pour compléter cette étude, il serait intéressant de réaliser des cultures clonales de cellules infectées pour confirmer l'existence de cellules multipotentes induites à proliférer par les oncogènes. En conclusion, l'analyse des programmes de différenciation des QNR sous l'influence des oncogènes s'est révélée complexe. Elle a permis de mieux appréhender le système des neurorétines pour envisager des études de transformation incluant d'autres oncogènes que *v-mil* et *v-myc*.

### III. DEUX PROTEINES ONCOGENES NUCLEAIRES, LA P135gag-myb-ets ET LA P61/63myc, COOPERENT POUR INDUIRE LA TRANSFORMATION DES CELLULES DE NEURORETINE DE POULET (ARTICLE III)

#### A. INTRODUCTION

Dans la présentation de ce travail nous avons vu que l'oncogénèse multiétape impliquait un oncogène issu du groupe de complémentation de "myc" associé à un oncogène du groupe de complémentation de "ras". Les rares associations d'oncogènes nucléaires n'ont pas recherché les critères caractéristiques de la transformation et ne peuvent être qualifiées de coopération. Dans la mesure où nous avons un système suffisamment sensible la neurorétine d'embryon de poulet (CNR) pour mettre une coopération d'oncogènes en évidence, nous avons essayé d'associer différents oncogènes. C'est ainsi qu'en testant la protéine oncogène issue du virus E26, nous avons pu constater un effet prolifératif dans ce système alors que ce virus n'est connu que pour son effet sur les lignées hématopoïétiques (Moscovici et al., 1983) et pour son action sur les fibroblastes (Jurdic et al., 1987). Etant donné l'effet transformant de *v-myc* dans le système des CNR, nous avons remplacé la phase d'induction de la prolifération induite par *v-mil* dans la coopération *v-mil/v-myc* par l'induction d'une prolifération par la protéine P135gag-myb-ets.

#### B. OBJECTIF

Notre travail a cherché à démontrer que dans le système de la neurorétine d'embryon de poulet de 7 jours, deux protéines oncogènes à localisation nucléaire pouvaient coopérer pour induire la transformation. Toute une batterie de tests de transformation a été utilisée pour affirmer cette oncogénèse nucléaire multiétape.

#### C. CONSTRUCTION DES VIRUS ET DES CLONES MOLECULAIRES

Les clones moléculaires ont été construits à partir des virus MH2 et E26 (figure 35). Un clone nommé MHE226 a été établi en insérant en lieu et place de l'oncogène *v-mil*, l'oncogène *v-myb-ets*. Un mutant de délétion dans le gène *mil* a été obtenu à partir de MH2 (Coll et al., 1988). Ce mutant noté XSK n'exprime que l'oncogène *v-myc*. Un autre mutant délété dans *v-ets* a également été construit.

Le clone MHE226 exprime la protéine P135gag-myb-ets à partir d'un ARN messager génomique et la protéine p61/63myc à partir d'un ARN messager sous génomique.

Des virus ont été produits à partir de ces clones à l'aide du virus auxiliaire RAV-1 par cotransfection sur des cellules embryonnaires de caille (Béchade et al., 1985). Le virus MC29 a également été utilisé pour ces expériences.

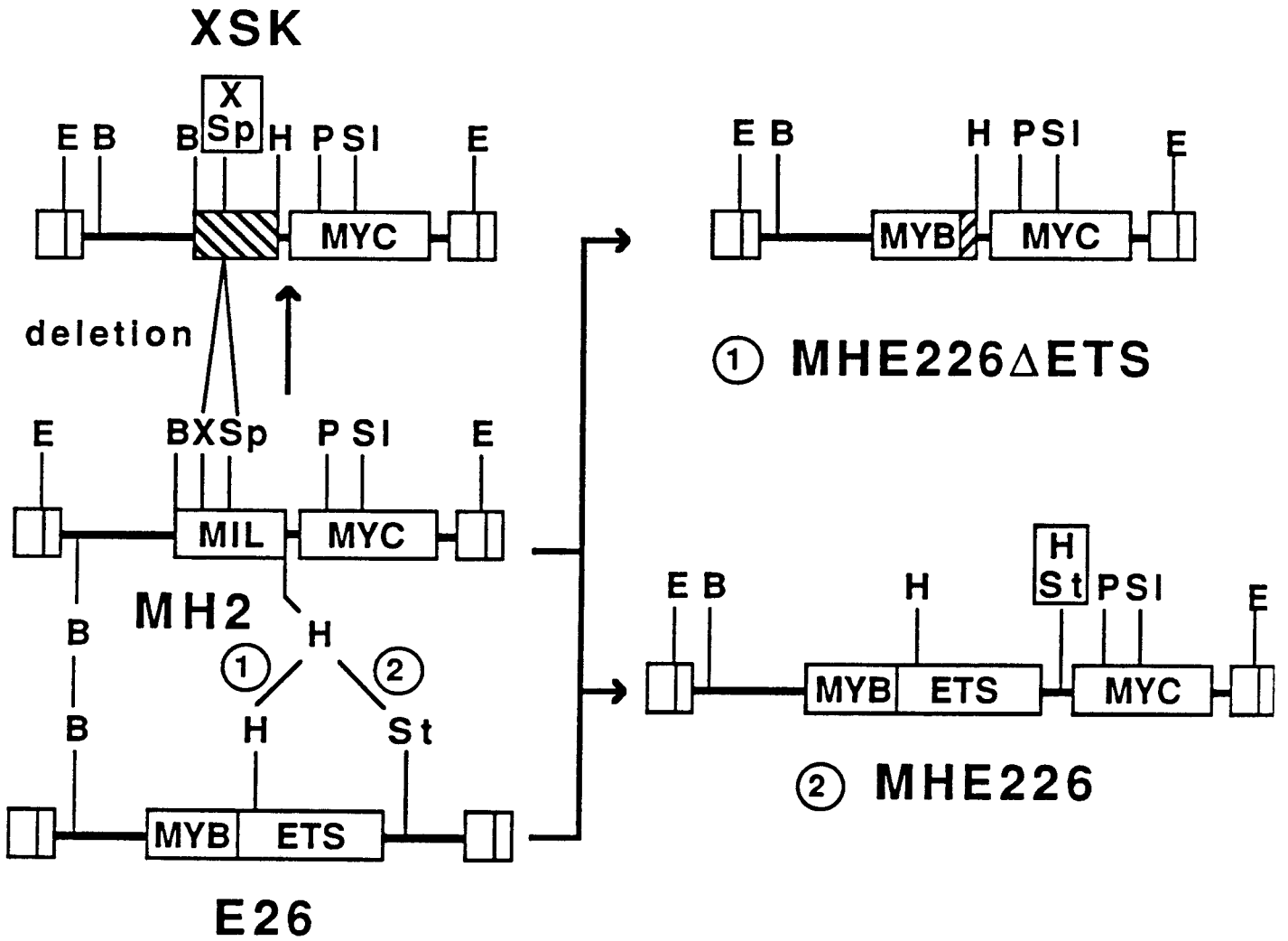


figure 35 : Clones moléculaires

## D. LES CRITERES DE LA TRANSFORMATION

Plusieurs critères ont été analysés pour confirmer la transformation :

- le clonage en milieu semi-solide,
- la tumorigénèse *in vivo* : chez le poussin et sur membrane chorioallantoïde,
- la disparition de la sécrétion de fibronectine,
- la désorganisation des filaments intermédiaires,
- la désorganisation des cables d'actine,
- la croissance en milieu appauvri en sérum.

## E. RESULTATS

L'infection des CNR par les virus XSK, MC29, E26 et MHE226 a conduit à des courbes de croissance très différentes selon les différents virus (figure 36). MHE226 s'est révélé extrêmement proliférant.

La recherche de l'expression des protéines oncogènes a été réalisée par immuno précipitation. Les protéines recherchées étaient bien présentes dans les cellules infectées.

La croissance de clone en milieu semi solide n'a été observée que pour MHE226. E26 est capable d'induire une prolifération importante des CNR, mais ces cellules ne clonent pas en agar.

Il était important de vérifier que les cellules infectées par les virus E26 et MHE226 provenaient bien de la neurorétine. Ces cellules expriment le marqueur spécifique de différenciation A2B5 (Eisenbarth et al., 1979).

Le marquage à la NBD-phalloïdine a permis de montrer la désorganisation des cables d'actine dans toutes les cellules infectées par MHE226.

Un anticorps anti-fibronectine a permis de constater la perte de production de cette protéine de la matrice extracellulaire.

Des expériences de tumorigénèse *in vivo* ont été développées sur des poussins âgés d'un jour (figure 37). L'injection dans le bourgeon de l'aile ou dans la cavité péritonéale de ces animaux a conduit à l'apparition rapide (1 semaine) de tumeurs solides aux points d'injection uniquement par les cellules infectées par les virus MHE226. L'ADN de ces tumeurs analysé par Southern blot a permis de mettre en évidence le provirus MHE226. Pour éliminer des phénomènes possibles de rejet de tumeurs dans le cas des autres cellules, une étude de tumorigénèse a été effectuée sur membrane chorioallantoïde. A nouveau, seules les cellules infectées par MHE226 ont donné des tumeurs.

Pour évaluer la dépendance de ces cellules vis à vis des facteurs de croissance du sérum, les cellules ont été soumises à un milieu contenant 1 % de sérum de veau foetal. Les cellules infectées par E26 et MHE226 pouvaient encore pousser. La P135*gag-myb-*eis** permet donc de réduire les besoins en facteur de croissance des cellules.

Nombre de cellules  
par boîte

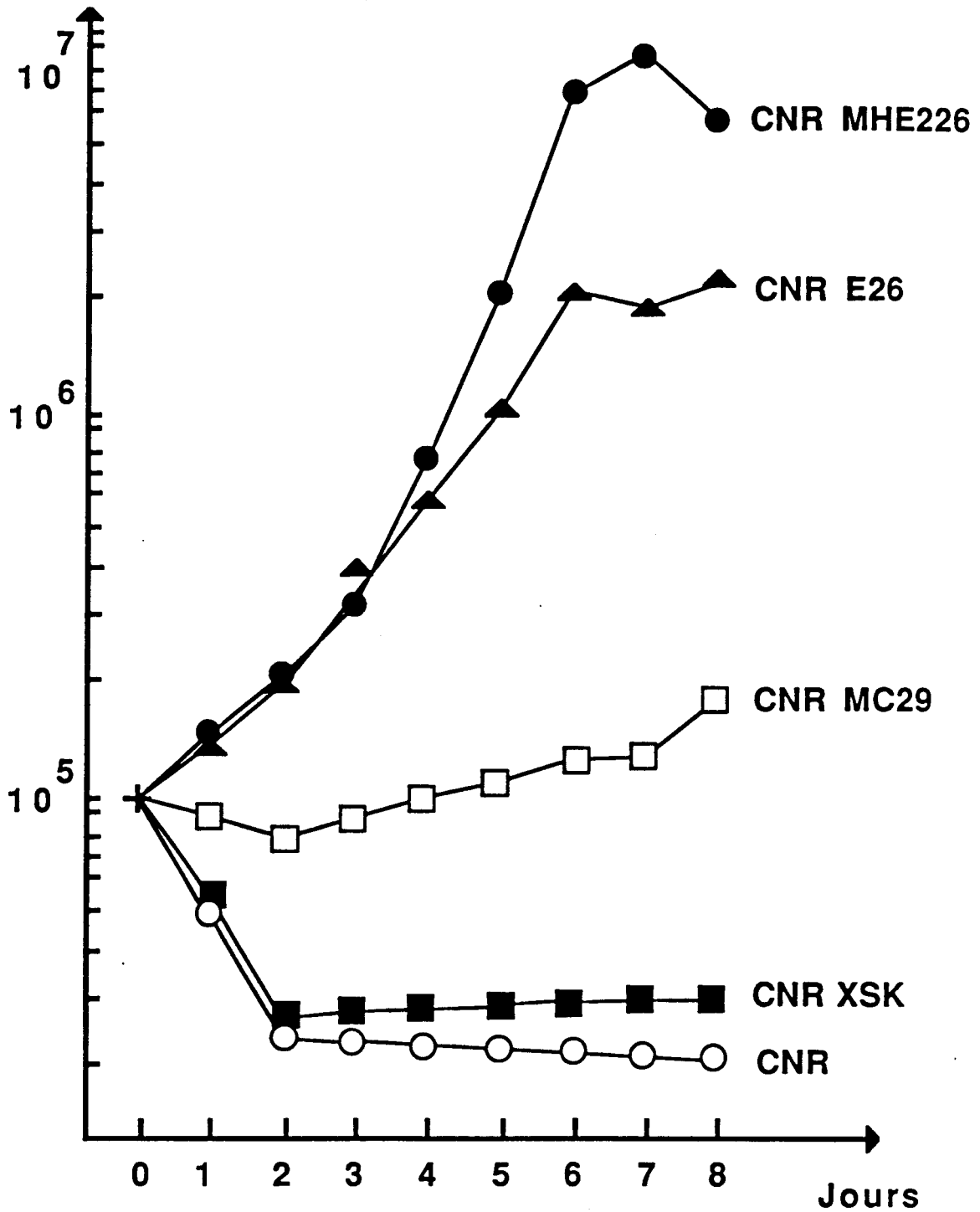


figure 36 : Courbes de croissance

	<b>CNR</b>	<b>CNR MC29</b>	<b>CNR E26</b>	<b>CNR MHE226</b>
<b>induction de la proliferation</b>	<b>—</b>	<b>—</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
<b>formation de colonies en milieu semi-solide medium pour 10<sup>5</sup> cellules</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>3050</b>
<b>Perte du réseau de fibronectine</b>	<b>—</b>	<b>—</b>	<b>—</b>	<b>+</b>
<b>% de cellules sans cable d'actine</b>	<b>0</b>	<b>36</b>	<b>25</b>	<b>100</b>

**figure 37 : Critères de transformation**

Une analyse de la coopération des protéines oncogènes P135*gag-myb-ets* et P100*gag-mil* a été effectuée. Ces deux protéines bien qu'appartenant à des groupes de complémentation différents (la P100*gag-mil* est une protéine cytoplasmique) ne sont pas capables de coopérer dans le système des CNR.

Une analyse des marqueurs de différenciation des cellules de neurorétine a permis de montrer que des cellules d'origine neuronale et gliale proliféraient sous l'action des virus E26 et MHE226. MHE226 exprime l'antigène A2B5 de manière similaire à MC29, E26 ne l'exprime que faiblement. Toutes ces cellules expriment l'antigène 3A7 filament intermédiaire de cellule gliale (Lemmon, 1985). Les cellules infectés par E26 synthétisent de plus grandes quantités d'acétylcholine que les cellules normales, alors que des niveaux très bas sont détectés dans les cellules MHE226.

## F. DISCUSSION

Nous avons démontré dans ce travail que :

- E26 est susceptible d'induire la prolifération des CNR,
- la P135*gag-myb-ets* coopère avec la P61/63*myc* dans la transformation des CNR bien qu'appartenant au même groupe de complémentation des oncogènes nucléaires,
- cette coopération entre oncogènes nucléaires est confirmée par une batterie de tests de transformation.

La protéine P135*gag-myb-ets* est susceptible de réduire les exigences en sérum des CNR ; la protéine P61/63*myc* n'est pas capable de pallier les besoins en facteurs de croissance dans les systèmes des fibroblastes et des cellules myéloïdes (Adkins et al., 1984). Différentes études ont montré que d'autres oncogènes (*v-src*, *v-mil*, oncogènes du groupe des tyrosines kinases) pouvaient compenser cette carence (Adkins et al., 1984 ; Palmieri et Vogel, 1987). Ces résultats suggèrent que la P135*gag-myb-ets* pourrait également jouer ce rôle. Le fait que la P100*gag-mil* ne puisse pas coopérer avec la P135*gag-myb-ets* suggère que ces protéines pourraient agir sur la même voie métabolique pour induire la prolifération des CNR.

Les effets de ces deux protéines nucléaires sur la différenciation ne sont pas clairs. Cependant le maintien de la présence de cellules portant l'antigène A2B5 lors des infections avec MHE226 permet d'éliminer l'hypothèse selon laquelle ce virus (ainsi que le virus E26) pourrait atteindre une cible hématopoïétique perdue au milieu de la neurorétine lors de sa mise en culture.

Ces résultats tendent à démontrer que les CNR constituent un outil puissant pour la détection de gènes pouvant coopérer avec *v-myc* dans la transformation. L'étude de l'importance respective des oncogènes *v-myb* et *v-ets* dans la protéine P135*gag-myb-ets* pourrait être analysée dans ce système cellulaire.



## CONCLUSION

Contrairement à la règle des groupes de complémentation, deux protéines oncogènes nucléaires peuvent coopérer dans la transformation. Un des oncogènes utilisés dans ces expériences, la P135gag-*myb-ets* porte deux oncogènes différents, l'oncogène *myb* et l'oncogène *ets*.

Le virus AMV et les mutants thermosensibles de E26 constituent des outils de choix pour l'analyse fine de l'action de ces deux gènes. L'étude du virus AMV permet de constater que *v-myb* est susceptible d'induire la prolifération des cellules de neurorétine de caille. Ces cellules expriment le marqueur A2B5 caractéristique des neurorétines. Une transdifférenciation très marquée de type cristallinien est observée. *v-myb* induit également une transdifférenciation de type pigmentaire. L'analyse de l'effet de mutants thermosensibles pourrait permettre de mieux comprendre les importances respectives de *v-myb* et *v-ets* dans la coopération.

Connaissant le rôle des facteurs de croissance dans la transformation et la coopération, des études sur l'influence d'un de ces facteurs, le FGF, sur les neurorétines ont été réalisées. La production de facteurs de croissance particuliers par les neurorétines proliférantes (effet de la P100gag-*mil* et de la P135gag-*myb-ets*) est recherchée.

A partir d'un criblage différentiel, deux ARN complémentaires spécifiques des QNR infectés par *v-myc* ont pu être isolés. Leur schéma d'expression a été analysé par B.Vandenbunder et son équipe dans l'embryon. On peut constater une spécificité d'expression dans certaines couches cellulaires du globe oculaire, ainsi que dans l'épiderme. Une analyse fine et un séquençage de ces gènes est en cours.

Des travaux portant sur l'injection précoce de rétrovirus porteurs d'oncogènes dans l'embryon de Poulet et de Caille ont permis de toucher des cibles cellulaires inhabituelles et d'induire des tumeurs cardiaques avec l'oncogène *myc* (Saule et al., 1987). Des travaux réalisés par F.Dieterlen et son équipe sur l'injection du virus MHE226 ont permis de constater également l'apparition de telles tumeurs.

Il serait en outre intéressant d'appréhender les mécanismes moléculaires de cette coopération. *Myc*, *myb* et *ets* sont des oncogènes nucléaires. *myb* et *ets* sont des facteurs de transcription ; le rôle de *myc* n'est pas établi, mais il pourrait faire partie du groupe des adaptateurs.

Plusieurs questions se posent :

- la fusion des protéines *myb* et *ets* dans la P135gag-*myb-ets* est-elle fortuite, ou favorise-t-elle la fixation de cette protéine sur des gènes importants pour la prolifération et la différenciation des neurorétines ?
- les protéines *myb* et *ets* transfectées dans le système des neurorétines sont-elles capables de former des hétérodimères et d'améliorer ainsi leurs propriétés transactivatrices ?

- existe-t-il un site de fixation de *myc* situé sur les promoteurs des deux gènes isolés par criblage différentiel des QNR infectées par MC29, ou *myc* agit-il par l'intermédiaire d'une protéine MYAP, MAX ou autre ?
- existe-t-il des gènes possédant à la fois sur leur promoteur les deux motifs de fixation de *myb* et *ets* parmi les gènes exprimés dans les neurorétines proliférantes ?

Ces résultats expérimentaux et les questions qu'ils suscitent amènent à constater la complexité de la physiopathologie des cancers. L'existence de proto-oncogènes codant pour des facteurs de transcription montre une fois de plus le rôle critique joué par ces gènes dans la vie cellulaire. L'étude des cancers a imprimé un nouvel élan à la biologie cellulaire et moléculaire. Les proto-oncogènes ont permis de cloner directement des gènes que des approches plus systématiques auraient isolés tardivement. Les cancérologues moléculaires se sont éloignés de la thématique cancer. Cet éloignement est apparent, il n'est que le témoin de l'intrication étroite des mécanismes de genèse des cancers et des fonctions les plus élaborées de la vie cellulaire, prolifération et différenciation. Il existe probablement plusieurs cancers, leur compréhension doit passer par une analyse fine des processus de développement du tissu impliqué. Pour pouvoir résoudre le problème des cancers, cause majeure de décès dans le monde occidental, il paraît nécessaire de résoudre le problème de la vie.

## BIBLIOGRAPHIE

- ABRAMS,H.D., L.R.ROHRSCHEIDER and R.N.EISENMAN. (1982). Nuclear location of the putative transforming protein of avian myelocytomatosis virus. *Cell* 29 : 427.
- ADKINS,B., A.LEUTZ and T.GRAF. (1984). Autocrine growth induced by *src*-related oncogenes in transformed chicken myeloid cells. *Cell* 39 : 439.
- AKERBLOM,I.E., E.P.SLATER, M.BEATO, J.D.BAXTER and P.L.MELLON. (1988). Negative regulation by glucocorticoids through interference with a cAMP response enhancer. *Science* 241 : 350.
- ALEXANDER,W.S., J.M.ADAMS and S.CORY. (1989). Oncogene cooperation in lymphocyte transformation : malignant conversion of *eu-myc* transgenic Pre-B cells *in vitro* is enhanced by *v-has-ras* or *v-raf* but not *v-abl*. *Mol. Cell. Biol.* 9 : 67.
- ALITALO,K. and M.SCHWAB. (1986). Oncogene amplification in tumour cells. *Adv. Cancer Res.* 47 : 235.
- ALLISON,L.A., J.K.WRONG, V.D.FITZPATRICK, M.MOYLE and C.J.INGLES. (1988). The C-terminal domain of the largest subunit of RNA polymerase II of *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster* and mammals : a conserved structure with an essential function. *Mol. Cell. Biol.* 8 : 321.
- AMOUYEL,P., A.GEGONNE, A.DELACOURTE, A.DEFOSSEZ and D.STEHELIN. (1988). Expression of *ets* proto-oncogenes in astrocytes in human cortex. *Brain Research* 447 : 149.
- ANTON,I.A. and J.FRAMTON. (1988). Tryptophans in *myb* proteins. *Nature* 336 : 719.
- ARIGA,H., Y.IMAMURA and S.M.M.IGUCHI-ARIGA. (1989). DNA replication origin and transcriptional enhancer in *c-myc* gene share the *c-myc* protein binding sequences. *EMBO J.* 8 : 4273.
- ASSOIAN,R.K., C.A.FROLIK, A.B.ROBERTS, D.M.MILLER and M.B.SPORN. (1984). Transforming growth factor- $\beta$  controls receptor levels for epidermal growth factor in NRK fibroblasts. *Cell* 36 : 35.
- BADING,H. (1988). Determination of the molecular weight of DNA-bound protein(s) responsible for gel electrophoretic mobility shift of linear DNA fragments examplified with purified viral *myb* protein. *Nucleic Acids Res.* 16 : 5241.
- BADING,H., J.HANSEN and K.MOELLING (1987). Selective DNA binding of the human cellular *myb* protein isolated by immunoaffinity chromatography using a monoclonal antibody. *Oncogene* 1 : 395.
- BALMAIN,A., M.RAMSDEN, G.T.BOWDEN and J.SMITH. (1984). Activation of the mouse cellular Harvey *ras* gene in chemically induced benign skin papillomas. *Nature* 307 : 658.
- BALTIMORE,D. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumor viruses. *Nature* 226 : 1209.
- BARBACID,M. (1987). *ras* genes. *Ann. Rev. Biochem.* 56 : 779.
- BARBU,M., C.ZILLER, P.M.RONG and N.M.LEDOUARIN. (1986). Heterogeneity in migrating neural crest cells revealed by a monoclonal antidoby. *J.Neurosci.* 6 : 2215.

- BARTRAM,C.R., A.de KLEIN, A.HAGEMEIJER, T.van AGTHOVEN, A.G. van KESSEL, D.ROOTSMA, G.GROSVELD, M.A.FERGUSON-SMITH, T.DAVIES, M.STONE, N.HEISTERKAMP, J.R.STEPHENSON and J.GROFFEN. (1983). Translocation of *c-abl* oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* **306** : 277.
- BEACHY,P.A., M.A.KRASNOW, E.R.GAVIS and D.S.HOGNESS. (1988). An ultrabithorax protein binds sequences near its own and the Antennapedia P1 promoters. *Cell* **55** : 1069.
- BEARD,J. (1963). Avian virus growths and their etiological agents. *Adv. Cancer Res.* **7** : 1.
- BECHADE,C., G.CALOTHY, B.PESSAC, P.MARTIN, J.COLL, F.DENHEZ, S.SAULE, J.GHYSDAEL and D.STEHELIN. (1985). Induction of proliferation or transformation of neuroretina cells by the *mil* and *myc* viral oncogenes. *Nature* **316** : 559.
- BERG,J.M. (1986). Potential metal-binding domains in nucleic acid binding proteins. *Science* **232** : 485.
- BERG,J. (1988). Proposed structure for the zinc-binding domains from transcription factor IIIA and related proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85** : 99.
- BERK,A.J. (1986). Adenovirus promoters and E1A transactivation. *Ann. Rev. Genet.* **20** : 45.
- BERLINGIERI,M.T., G.PORTELLA, M.GRIECO, M.SANTORO and A.FUSCO. (1988). Cooperation between the polyomavirus middle-T-antigen gene and the human *c-myc* oncogene in a rat thyroid epithelial differentiated cell line : model of *in vitro* progression. *Mol. Cell. Biol.* **8** : 2261.
- 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 non permissive temperature. *Cell* **39** : 579.
- 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.
- BEUG,H., P.BLUNDELL and T.GRAF. (1987). Reversibility of differentiation and proliferative capacity in avian myelomonocytic cells transformed by tsE26 leukemia virus. *Genes. Dev.* **1** : 227.
- 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.
- 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.
- BIKEL,I., X.MONTANO, M.E.AGHA, M.BROWN, M. Mc CORMACK, J.BOLTAX and D.M.LIVINGSTON. (1987). SV40 small t antigen enhances the transformation activity of limiting concentrations of SV40 large T antigen. *Cell* **48** : 321.
- BISHOP,J.M. (1981). Enemies within : the genesis of retrovirus oncogenes. *Cell* **23** : 5.
- BODNER,M., J.L.CASTRILLO, L.E.THEILL, T.DEERINCK, M.ELLISMAN and M.KARIN. (1988). The pituitary specific transcription factor GMF-1 is a homeobox containing protein. *Cell* **55** : 505.

BOHMANN,D., T.J.BOS, A.ADMON, T.NISHIMURA, P.K.VOGT and R.TJIAN. (1987). Human proto-oncogene *c-jun* encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1. *Science* **238** : 1386.

BOSSELUT,R., J.F.DUVALL, A.GEGONNE, M.BAILLY, A.HEMAR, J.BRADY and J.GHYSDAEL. (1990). The product of the *c-ets1* proto-oncogene and the related *Ets2* protein act as transcriptional activators of the long terminal repeat of human T cell leukemia virus HTLV-1. *EMBO J.* **9** : 3137.

BOULUKOS,K., P.POGNONEC, E.SARIBAN, M.BAILLY, C.LAGROU and J.GHYSDAEL. (1990). Rapid and transient expression of *ets2* in mature macrophages following stimulation with cMGF, LPS and PKC activators. *Genes and Development* **4** : 401.

BOULUKOS,K.E., P.POGNONEC, A.BEGUE, F.GALIBERT, J.C.GESQUIERE, D.STEHELIN and J.GHYSDAEL (1988). Identification in chickens of an evolutionarily conserved cellular *ets-2* gene (*c-ets-2*) encoding nuclear proteins related to the products of the *c-ets* proto-oncogene. *EMBO J.* **7** : 697.

BOYLE,W.J. and M.A.BALUDA. (1987). Subnuclear associations of the *v-myb* oncogene product and actin are dependent on ionic strength during nuclear isolation. *Mol. Cell. Biol.* **7** : 3345.

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.

BRADFORD,M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72** : 248.

BRENT,R. and M.PTASHNE. (1985). A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor. *Cell* **43** : 729.

BUNTE,T., I.GREISER-WILKE and K.MOELLING. (1983). The transforming protein of the MC29-related virus CMII is a nuclear DNA-binding protein whereas MH2 codes for a cytoplasmic RNA-DNA binding polyprotein. *EMBO J.* **2** : 1087.

BURATOWSKI,S. S.HAHN, P.A.SHARP and L.GUARENTE. (1988). Function of a yeast TATA element binding protein in a mammalian transcription system. *Nature* **334** : 37.

BURTIS,K.C., C.S.THUMMEL, C.W.WELDON JONES, F.D.KARIM and D.S.HOGNESS. (1990). The *Drosophila* 74EF early puff contains E74, a complex Ecdysone-inducible gene that encodes two *ets*-related proteins. *Cell* **61** : 85.

BUSS,J.E. and B.M.SEFTON. (1985). Myristic acid, a rare fatty acid, is the lipid attached to the transforming protein of Rous sarcoma virus and its cellular homolog. *J. Virol.* **53** : 7.

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

CALOTHY,G. and B.PESSAC. (1976). Growth stimulation of chick embryo neuroretinal cells infected with Rous sarcoma virus : relationship to viral replication and morphological transformation. *Virology* **71** : 336.

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

- CALOTHY,G., F.POIRIER, G.DAMBRINE, P.MIGNATTI, P.COMBES and B.PESSAC. (1980). Expression of viral oncogenes in differentiating chick embryo neuroretinal cells infected with avian tumor viruses. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **44** : 983.
- CASALBORE,P., E.AGOSTINI, S.ALEMA, G.FALCONE and F.TATO. (1987). The *v-myc* oncogene is sufficient to induce growth transformation of chick neuroretina cells. Nature **326** : 188.
- CHEN,J.H. (1980). Expression of endogenous avian myeloblastosis virus information in different chicken cells. J.Virol. **36** : 162.
- CHEN,J.H. (1985). The proto-oncogene *c-ets* is preferentially expressed in lymphoid cells. Mol. Cell. Biol. **5** : 2993.
- 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 interleukine 2 gene of a cell line that constitutively produces interleukin 2. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82** : 7284.
- CHEN,Z.Q., N.C.KAN, L.PRIBYL, J.A.LAUTENBERGER, E.MOUDRIANAKIS and T.S.PAPAS. (1988). Molecular cloning of the *ets* proto-oncogene of the sea urchin and analysis of its developmental expression. Developmental Biology **125** : 432.
- CHIEN,Y.H., M.LAI, T.YSHIH, I.M.VERMA, E.M.SCOLNICK, P.ROY-BURMAN and N.DAVIDSON. (1979). Heteroduplex analysis of the sequence relationships between the genomes of kirsten and harvey sarcoma viruses, their respective parental leukemia viruses, and the rat endogenous 30S RNA. J.Virol. **31** : 752.
- CHIU,R., W.J.BOYLE, J.MEEK, T.SMEAL, T.HUNTER and M.KARIN. (1988). The *c-fos* protein interacts with *c-jun/AP-1* to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. Cell **54** : 541.
- CHO,K.W.Y., J.GOETZ, C.V.E.WRIGHT, A.FRITZ, J.HARDWICKE and E.M.De ROBERTIS. (1988). Differential utilization of the same reading frame a xenopus homeobox gene encodes two related proteins sharing the same DNA-binding specificity. EMBO J. **7** : 2139.
- CLARKSON,B., P.A.MARKS and J.E.TILL eds Differentiation of normal and neoplastic hematopoietic cells (1978) Cold Spring Harbor Laboratory.
- CLERC,R.G., L.M.CORCORAN, M.H.LEBOWITZ, D.BALTIMORE and P.A.SHARP. (1988). The B-cell-specific OCT-2 protein contains POU-box and homeo-box-type domains. Genes Dev. **2** : 1570.
- CLINE,M.J. and D.W.GOLDE. (1979). Cellular interaction in haematopoiesis. Nature **277** : 177.
- COLBY,W.W. and T.SHENK. (1982). Fragments of the simian virus 40 transforming gene facilitate transformation of rat embryo cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79** : 5189.
- COLL,J., C.DOZIER, S.SAULE, C.HENRY, B.QUATANNENS, B.DEBUIRE and D.STEHELIN. (1988). Mapping by *in vitro* constructs of the P100<sup>gag-mil</sup> region, accounting for induction of chicken neuroretina cell proliferation. J.Virol. **62** : 2808.
- COLL,J., M.RIGHI, C. de TAISNE, C.DISSOUS, A.GEGONNE and D.STEHELIN. (1983). Molecular cloning of the avian acute transforming retrovirus MH2 reveals a novel cell-derived sequence *v-mil* in addition to the *v-myc* oncogene. EMBO J. **2** : 2189.

- COMB, M., N. MERMOD, S. E. HYMAN, J. PEARLBERG, M. E. ROSS and H. M. GOODMAN. (1988). Proteins bound at adjacent DNA elements act synergistically to regulate human proenkephalin cAMP inducible transcription. *EMBO J.* **7** : 3793.
- COOPER, J. A., K. L. GOULD, C. A. CARTWRIGHT and T. HUNTER. (1986a). Tyr527 is phosphorylated in pp60<sup>c-src</sup> : implications for regulation. *Science* **231** : 1431.
- 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.
- COUREY, A. and T. TJIAN. (1988). Analysis of Sp1 *in vivo* reveals multiple transcriptional domains, including a novel glutamine-rich activation motif. *Cell* **55** : 887.
- CRISANTI-COMBES, P., A. M. LORINET, A. GIRARD, B. PESSAC, M. WASSEFF and G. CALOTHY. (1982). Expression of neuronal markers in chick and quail embryo neuroretina cultures infected with Rous sarcoma virus. *Cell Differ.* **11** : 45.
- CURRAN, T. and B. R. FRANZA, Jr. (1988). *Fos* and *Jun* : the AP-1 connection. *Cell* **55** : 395.
- DANG, C. V. and W. F. LEE. (1989). Nuclear and nucleolar targeting sequences of *c-erbA*, *c-myb*, *N-Myc*, p53, HSP70 and HIV *tat* proteins. *J. Biol. Chem.* **264** : 18019.
- DANG, C. V., M. Mc GUIRE, M. BUCKMIRE and W. M. F. LEE. (1989). Involvement of the "leucine zipper" region in the oligomerization and transforming activity of human *c-myc* protein. *Nature* **337** : 644.
- 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.
- DESPLAN, C., J. THEIS and P. M. O'FARREL. (1988). The sequence specificity of homeodomain-DNA interaction. *Cell* **54** : 1081.
- DEUEL, T. F., J. S. HUANG, S. S. HUANG, P. STROOBANT and M. D. WATERFIELD. (1983). Expression of a platelet-derived growth factor-like protein in simian sarcoma virus transformed cells. *Science* **221** : 1348.
- DE LARCO, J. E. and G. J. TODARO. (1978). Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75** : 4001.
- 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.
- DISSOUS, C., A. BEGUE, C. LAGROU, T. DUPRESSOIR and D. STEHELIN. (1990). *v-myc* would bind DNA in discrete chromatin regions of Q8 cell nuclei. (soumis).
- DONOGHUE, D. J., C. ANDERSON, T. HUNTER and P. L. KAPLAN. (1984). Transmission of a murine retrovirus. *Nature* **308** : 748.
- DOOLITTLE, R. F., M. W. HUNKAPILLER, L. E. HOOD, S. G. DEVARE, K. C. ROBBINS, S. A. AARONSON and H. N. ANTONIADES. (1983). Simian sarcoma virus *onc* gene, *v-sis*, is derived from the gene (or genes) encoding a platelet-derived growth factor. *Science* **221** : 275.
- DOWNWARD, J., Y. YARDEN, E. MAYES, G. SCRACE, N. TOTTY, P. STOCKWELL, A. ULLRICH, J. S. SCHLESSINGER and M. D. WATERFIELD. (1984). Close similarity of epidermal growth factor receptor and *v-erbB* oncogene protein sequences. *Nature* **307** : 521.

- DOZIER,C., F.DENZEZ, J.COLL, P.AMOUYEL, B.QUATANNENS, A.BEGUE, D.STEHELIN and S.SAULE. (1987). Induction of proliferation of neuroretina cells by long terminal repeat activation of the carboxy-terminal part of *c-mil*. *Mol. Cell Biol.* **7** : 1995.
- DREBIN,J.A., V.C.LINK, D.F.STERN, R.A.WEINBERG and M.I.GREENE. (1985). Down-modulation of an oncogene protein product and reversion of the transformed phenotype by monoclonal antibodies. *Cell* **41** : 695.
- DUESBERG,P.H. and P.K.VOGT. (1970). Differences between the ribonucleic acids of transforming and non transforming avian tumor viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **67** : 1673.
- DULBECCO,R. (1970). Topo inhibitions and serum requirement of transformed and untransformed cells. *Nature* **227** : 802.
- DVORAK,M., P.URBANEK, P.BARTUNEK, V.PACES, J.VLACH, V.PECENKA, L.ARNOLD, M.TRAVNICEK and J.RIMAN. (1989). Transcription of the chicken *myb* proto-oncogene starts within a CpG island. *Nucleic Acids Res.* **17** : 5651.
- EDELMAN,G.M. and I.YAHARA. (1976). Temperature sensitive changes in surface modulating assemblies of fibroblasts transformed by mutants of RSV. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73** : 2047.
- EGUCHI,G. and T.S.OKADA. (1973). Differentiation of lens tissue from the progeny of chick retinal pigment cells cultured *in vitro* : a demonstration of a switch of cell types in clonal culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70** : 1495.
- EINAT,M., D.RESNITZKY and A.KIMCHI. (1985). Close link between reduction of *c-myc* expression by interferon and Go/G1 arrest. *Nature* **313** : 597.
- EISENBARTH,G.S., F.S.WALSH and M.NIRENBERG. (1979). Monoclonal antibody to a plasma membrane antigen of neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76** : 4913.
- EISENMAN,R.N. and C.B.THOMPSON. (1986). Oncogenes with potential nuclear function : *myc*, *myb* and *fos*. *Cancer Surv.* **5** : 309.
- EISENMAN,R.N., C.Y.TACHIBANA, H.D.ABRAMS and S.R.HANN. (1985). *v-myc* and *c-myc* encoded proteins are associated with the nuclear matrix. *Mol. Cell. Biol.* **5** : 114.
- ELIYAHU,D., A.RAZ, P.GRUSS, D.GIVOL and M.OREN. (1984). Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells. *Nature* **312** : 646.
- ELLIS,R.W., D.DE FEO, T.Y.SHIH, M.A.GONDA, H.A.YOUNG, N.TSUCHIDA, D.R.LOWY and E.M.SCOLNICK. (1981). The p21<sup>src</sup> genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses originate from divergent members of a family of normal vertebrate genes. *Nature* **292** : 506.
- EVANS,R.M. and S.M.HOLLENBERG. (1988). Zinc fingers : gilt by association. *Cell* **52** : 1.
- FAINSOD,A., L.D.BOGARAD, T.RUUSALA, M.LUBIN, D.M.CROTHERS and F.M.RUDDLE. (1986). The homeo domain of a murine protein binds 5' to its own homeobox. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83** : 9532.
- FERRE,F. (1986). Pouvoir transformant et régulation de l'oncogène humain *c-myc*. Thèse de Doctorat Option Biologie cellulaire et moléculaire. Université de Lille I.



FERRE, F., P. MARTIN, A. BEGUE, J. GHYSDAEL, S. SAULE and D. STEHELIN. (1986). Préparation et caractérisation d'antisera spécifiques dirigés contre différents domaines polypeptidiques codés par l'oncogène *c-myc* humain pour étudier l'expression de ce gène introduit dans des cellules de caille ou de rat. C.R. Acad. Sci. 303 : 633.

FIGGE, J., T. WEBSTER, T. F. SMITH and E. PAUCHA. (1988). Prediction of similar transforming regions in simian virus 40 large T, adenovirus E1A, and *myc* oncoproteins. J. Virol. 62 : 1814.

FINNEY, M., G. RUVKRUN and H. R. HORVITZ. (1988). The *C. elegans* cell lineage and differentiation gene *Unc-86* encodes a protein with a homeodomain and extended similarity to transcription factors. Cell 55 : 757.

FREEDMAN, L. P., B. F. LUISI, Z. R. KORSZUN, R. BASAVAPPA, P. B. SIGLER and K. R. YAMAMOTO. (1988). The function and structure of the metal coordination sites within the glucocorticoid receptor DNA binding domain. Nature 334 : 543.

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.

FUJITA, T., J. SAKAKIBARA, Y. SUDO, M. MIYAMOTO, Y. KIMURA and T. TANIGUCHI. (1988). Evidence for a nuclear factor(s), IRF-1, mediating induction and silencing properties to human IFN- $\beta$  gene regulatory elements. EMBO J. 7 : 3397.

FUJIWARA, S., R. J. FISHER, N. K. BHAT, S. M. DIAZ de la ESPINA and T. S. PAPAS. (1988). A short-lived nuclear phosphoprotein encoded by the human *ets-2* proto-oncogene is stabilized by activation of protein kinase C. Mol. Cell. Biol. 8 : 4700.

GASSER, S. M. and U. K. LAEMMLI. (1986). Cohabitation of scaffold binding regions with upstream/enhancer elements of three developmentally regulated genes of *D. melanogaster*. Cell 46 : 521.

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

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.

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.

GIL, G., J. R. SMITH, J. L. GOLDSTEIN, C. A. SLAUGHTER, K. ORTH, M. S. BROWN and T. F. OSBORNE. (1988). Multiple genes encode nuclear factor NFI-like proteins that bind to the promoter for 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85 : 8963.

GILBERT, W., A. M. MAXAM, A. MIRZABEKOV. (1976). In control and ribosome synthesis, N. C. Kjeldgaard and O. Maaloe, Eds. (Munksgaard, Copenhagen pp 139.

GILLESPIE, D. A. F. and R. N. EISENMAN. (1989). Detection of a *myc*-associated protein by chemical cross-linking. Mol. Cell. Biol. 9 : 865.

- GILMAN,A.G. (1984). G proteins and dual control of adenylate cyclase. *Cell* **36** : 577.
- 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.
- GLASS,K.C., J.M.HOLLOWAY, O.V.DEVARY and M.G.ROSENFELD. (1988). The thyroid hormone receptor binds with opposite transcriptional effects to a common sequence motif in thyroid hormone and estrogen response elements. *Cell* **54** : 313.
- GOEBL,M.G. (1990). The PU-1 transcription factor is the product of the putative oncogene *Spi-1*. *Cell* **61** : 1165.
- 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.
- 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.
- GONZALES,G.A., K.Y.YAMAMOTO, W.H.FISCHER, D.KARR, P.MENZEL, W.BIGGS III, W.W.VALE and M.R.MONTMINY. (1989). A cluster of phosphorylation sites an the cyclic AMP-regulated nuclear factor CREB predicted by its sequence. *Nature* **337** : 749.
- GOOTWINE,E., C.G.WEBB and L.SACH (1982). Participation of myeloid leukaemic cells infected into embryos in haematopoietic differentiation in adult mice. *Nature* **299** : 63.
- GORMAN,C.M., L.F.MOFFAT and B.H.HOWARD. (1982). Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **2** : 1044.
- GRAF,T. and H.BEUG. (1978). Avian leukemia viruses interaction with their target cells *in vivo* and *in vitro*. *Biochim. Biophys. Acta* **516** : 269.
- 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.
- GRAF,T., H.BEUG and M.J.HAYMAN (1980). Target cell specificity of defective avian leukemia viruses : Hematopoietic target cells for a given virus type can be infected but not transformed by strains of a different type. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77** : 389.
- GREEN,J.M., Z.LARIN, I.C.A.TAYLOR, H.PRENTICE, K.A.GWINN and R.E.KINGSTON. (1987). Multiple basal elements of a human Hsp70 promoter function differently in human and rodent cell lines. *Mol. Cell. Biol.* **7** : 3643.
- GREEN,M., P.M.LOEWENSTEIN, R.PUSZTAI and J.S.SYMINGTON. (1988). An adenovirus E1a protein domain activates transcription *in vivo* and *in vitro* in the absence of protein synthesis. *Cell* **53** : 921.
- GROSS,D.S. and W.T.GARRARD. (1988). Nuclease hypersensitive sites in chromatin. *Annu. Rev. Biochem.* **57** : 159.
- GROUDINE,M. and H.WEINTRAUB. (1980). Activation of cellular genes by avian RNA tumor viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77** : 5351.
- GUARENTE,L. (1988). UASs and enhancers : common mechanism of transcriptional activation in yeast and mammals. *Cell* **52** : 303.

- GUNTHER, C.V., J.A. NYE, R.S. BRYNER and B.J. GRAVES. (1990). Sequence-specific DNA binding of the proto-oncoprotein *ets-1* defines a transcriptional activator sequence within the long terminal repeat of the Moloney murine sarcoma virus. *Genes and Development* **4** : 667.
- HALAZONETIS, T.D., K. GEORGOPOULOS, M.E. GREENBERG and P. LEDER. (1988). *c-jun* dimerizes with itself and with *c-fos* forming complexes of different DNA binding affinities. *Cell* **55** : 917.
- HAN, K., M. LEVINE and J.L. MANLEY. (1989). Synergistic activation and repression of transcription by drosophila homeobox proteins. *Cell* **56** : 573.
- HANAFUSA, H. (1977). Cell transformation by RNA tumor viruses, p 401-483. In H. Fraenkel-Conrat and R. Wagner (ed.), *Comprehensive virology*, vol 10. Plenum Publishing Corp. New York.
- 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.
- HANN, S.R., C.B. THOMPSON and R.N. EISENMAN. (1985). *c-myc* oncogene protein synthesis is independent of the cell cycle in human and avian cells. *Nature* **314** : 366.
- HANN, S.R., H.D. ABRAMS, L.R. ROHRSCHEIDER and R.N. EISENMAN. (1983). Proteins encoded by the *v-myc* and *c-myc* oncogenes : identification and localization in acute leukemia virus transformants and bursal lymphoma cell line. *Cell* **34** : 789.
- HANNINK, M. and D.J. DONOGHUE. (1985). Lysine residue 121 in the proposed ATP-binding site of the *v-mos* protein is required for transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82** : 7894.
- HATANAKA, M. (1974). Transport of sugars in tumor cell membranes. *Biochem. Biophys. Acta.* **355** : 77.
- HAYMAN, M.J., G. KITCHENER and T. GRAF. (1979). Cells transformed by avian myelocytomatosis virus strain CMII contain a 90K gag-related protein. *Virology* **98** : 191.
- HAYWARD, W.S., B.G. NEEL and S.M. ASTRIN. (1981). Activation of a cellular oncogene by promoter insertion in ALV induced lymphoid leukemia. *Nature* **290** : 475.
- 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.
- HEN, R., E. BORRELLI and P. CHAMBON. (1985). Repression of the immunoglobulin heavy chain enhancer by the adenovirus-2 E1A products. *Science* **230** : 1391.
- 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.
- HINDS, P., C. FINLAY and A.J. LEVINE. (1989). Mutation is required to activate the p53 gene for cooperation with the *ras* oncogene and transformation. *J. Virol.* **63** : 739.
- HIRAI, S.I., R.P. RYSECK, F. MECHTA, R. BRAVO and M. YANIV. (1989). Characterization of *jun D* : a new member of the *jun* proto-oncogene family. *EMBO J.* **8** : 1433.
- HOEFFLER, J.P., T.E. MEYER, Y. YUN, J.L. JAMESON and Z.F. HABENER. (1988). Cyclic AMP-responsive DNA-binding protein : structure based on a cloned placental cDNA. *Science* **242** : 1430.

- HOEFFLER, W.K. and R.G.ROEDER. (1985). Enhancement of RNA polymerase III transcription by the E1A gene product of adenovirus. *Cell* **41** : 955.
- HOEY, T. and M.LEVINE. (1988). Divergent homeo box proteins recognize similar DNA sequences in *Drosophila*. *Nature* **332** : 858.
- HOLLENBERG, S.M. and R.M.EVANS. (1988). Multiple and cooperative trans activation domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* **55** : 899.
- HOLLENBERG, S.M., V.G.GIGUERE, P.SEGUI and R.M.EVANS. (1987). Colocalization of DNA-binding and transcriptional activation functions in the human glucocorticoid receptor. *Cell* **49** : 39.
- HONEGGER, A.M., T.J.DULL, S.FELDER, E.van OBBERGHEN, F.BEILLOT, D.SZAPARY, A.SCHMIDT, A.ULLRICH and J.SCHLESSINGER. (1987). Point mutation at the ATP binding site of EGF receptor abolishes protein-tyrosine kinase activity and alters cellular routing. *Cell* **51** : 199.
- HOPE, I.A. and K.STRUHL. (1986). Functional dissection of a eukaryotic transcriptional activator protein, GCN4 of yeast. *Cell* **46** : 885.
- HOPE, I.A. and K.STRUHL. (1987). GCN4, a eukaryotic transcriptional activator protein, binds as a dimer to target DNA. *EMBO J.* **6** : 2781.
- HOPE, I.A., S.MAHADEVAN and K.STRUHL. (1988). Structural and functional characterization of the short acidic transcriptional activation region of yeast GCN4 protein. *Nature* **333** : 635.
- HORIKOSHI, M., M.F.CAREY, M.KAKIDANI and R.G.ROEDER. (1988a). Mechanism of action of a yeast activator : direct effect of GAL4 derivatives on mammalian TFIID-promoter interactions. *Cell* **54** : 665.
- HORIKOSHI, M., T.HAI, Y.S.LIN, M.R.GREEN and R.G.ROEDER. (1988b). Transcription factor ATF interacts with the TATA factor to facilitate establishment of a preinitiation complex. *Cell* **54** : 1033.
- HOSOI, J., E.ABE, T.SUDA and T.KUROKI. (1985). Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid1. *Cancer Research* **45** : 1474.
- HOUWELING, A., P.J.Van den ELSEN and A.J.Van der EB. (1980). Partial transformation of primary rat cells by the leftmost 4.5 % fragment of adenovirus 5 DNA. *Virology* **105** : 537.
- HOWE, K.M., C.F.L.REAKES and R.J.WATSON. (1990). Characterization of the sequence-specific interaction of mouse *c-myb* protein with DNA. *EMBO J.* **9** : 161.
- HU, S.S.F., C.MOSCOVICI and P.K.VOGT. (1978). The defectiveness of Mill-Hill 2, a carcinoma-inducing avian oncovirus. *Virology* **89** : 191.
- IBA, H., F.R.CROSS, E.A.GARBER and H.HANAFUSA. (1985a). Low level of cellular protein phosphorylation by nontransforming overproduced p60<sup>c-src</sup>. *Mol. Cell. Biol.* **5** : 1058.
- IBA, H., R.JOVE and H.HANAFUSA. (1985b). Lack of induction of neuroretinal cell proliferation by Rous sarcoma virus variants that carry the *c-src* gene. *Mol. Cell. Biol.* **5** : 2856.
- IBA, H., Y.SHINDO, H.NISHINA and T.YOSHIDA. (1988). Transforming potential and growth stimulating activity of the *v-fos* and *c-fos* genes carried by avian retrovirus vectors. *Oncogene Research* **2** : 121-133.

- IBANEZ,C.E., A.GARCIA, U.STOBER-GRÄSSER and J.S.LIPSICK. (1988). DNA-binding activity associated with the *v-myb* oncogene product is not sufficient for transformation. *J.Virol.* **62** : 4398.
- 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.
- IBANEZ,C.E. and J.S.LIPSICK. (1990). trans activation of gene expression by *v-myb*. *Mol. Cell. Biol.* **10** : 2285.
- IGUCHI-ARIGA,S.M.M., T.ITANI, Y.KIJI and H.ARIGA. (1987). Possible function of the *c-myc* product : promotion of cellular DNA replication. *EMBO J.* **6** : 2365.
- IGUCHI-ARIGA,S.M.M., T.OKAZAKI, T.ITANI, M.OGATA, Y.SATO and H.ARIGA. (1988). An initiation site of DNA replication with transcriptional enhancer activity present upstream of the *c-myc* gene. *EMBO J.* **7** : 3135.
- IMAGAWA,M., R.CHIU and M.KARIN. (1987). Transcription factor AP-2 mediates induction by two different signal-transduction pathways : protein kinase C and cAMP. *Cell* **51** : 251.
- INGRAHAM,H.A., R.CHEN, H.J.MANGALAM, H.P.ELSMOLTZ, S.E.FLYNN, C.R.LIN, D.M.SIMMONS, L.SWANSON and M.G.ROSENFELD. (1988). A tissue-specific transcription factor containing a homeodomain specifies a pituitary phenotypes. *Cell* **55** : 519.
- ITOH,H., T.KOZASA, S.NAGATA, S.NAKAMURA, T.KATADA, M.UI, S.IWAI, E.OHTSUKA, H.KAWASAKI, K.SUZUKI and Y.KAZIRO. (1986). Molecular cloning and sequence determination of cDNAs for a subunits of the guanine nucleotide-binding proteins G<sub>s</sub>, G<sub>i</sub>, and G<sub>o</sub> from rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83** : 3776.
- IVASHKIV,L.B., H.C.LIOU, C.J.KARA, W.W.LAMPH, I.M.VERMA and L.H.GLIMCHER. (1990). mXBP/CRE-BP2 and *c-jun* form a complex which binds to the cyclic AMP, but not to the 12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate, response element. *Mol. Cell. Biol.* **10** : 1609.
- JACKSON,S.P. and R.TJIAN. (1988). O-glycosylation of eukaryotic transcription factors : implications for mechanisms of transcriptional regulation. *Cell* **55** : 125.
- JANSEN,H.W., B.BRUCKERT, R.LURZ and K.BISTER. (1983). Two unrelated cell-derived sequences in the genome of avian leukemia and carcinoma inducing retrovirus MH2. *EMBO J.* **2** : 1969.
- JAT,P.S., C.L.CEPKO, R.C.MULLIGAN and P.A.SHARP. (1986). Recombinant retroviruses encoding simian virus 40 large T antigen and polyomavirus large and middle T antigens. *Mol. Cell. Biol.* **4** : 1204.
- JENKINS,J.R., K.RUDGE and G.A.CURRIE. (1984). Cellular immortalization by a cDNA clone encoding the transformation-associated phosphoprotein p53. *Nature* **312** : 651.
- JENUWEIN,T., D.MULLER, T.CURRAN and R.MULLER. (1985). Extended life span and tumorigenicity of nonestablished mouse connective tissue cells transformed by the *fos* oncogene of FBR-MuSV. *Cell* **41** : 629.
- JONES,N.C., P.W.J.RIGBY and E.B.ZIFF. (1988a). Transacting protein factors and the regulation of eukaryotic transcription : lessons from studies on DNA tumor viruses. *Genes Dev.* **2** : 267.

JONES,R.H., S.MORENO, P.NURSE and N.C.JONES. (1988b). Expression of the SV40 promoter in fission yeast : identification and characterization of an AP-1 like factor. *Cell* **53** : 659.

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.

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

KADDURAH-DAOUK,R., M.J.GREE, S.A.BALDIVIN and E.R.KINGSTON. (1987). Activation and repression of mammalian gene expression by the *c-myc* protein. *Genes Dev.* **1** : 347.

KADONAGA,J.T., A.J.COUREY, J.LADIKA and R.TJIAN. (1988). Distinct regions of SpI modulate DNA binding and transcriptional activation. *Science* **242** : 1566.

KADONAGA,J.T. and R.TJIAN. (1986). Down-regulation of glucocorticoid receptor mRNA by glucocorticoid hormones and recognition by the receptor of a specific binding sequence within a receptor cDNA clone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83** : 5889.

KADONAGA,J.T., K.R.CARNER, F.R.MASIARZ and R.TJIAN. (1987). Isolation of cDNA encoding transcription factor SpI and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell* **51** : 1079.

KAHN,P. and S.SHIN.(1979). Cellular tumorigenicity in nude mice : test of associations among loss of cell surface fibronectin, anchorage independence, and tumor-forming ability. *J.Cell.Biol.* **82** : 1.

KAHN,P., K.NAKAMURA, S.SHIN, R.E.SMITH and J.WEBER. (1982). Tumorigenicity of partial transformation mutants of Rous sarcoma virus. *J.Virol.* **42** : 602.

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.

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

KAN,N.C., C.S.FLORELLIS, C.F.GARON, P.H.DUESBERG and T.S.PAPAS. (1983). Avian carcinoma virus MH2 contains a transformation-specific sequence, *mht*, and shares the *myc* sequence with MC29, CMII and OK10 viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80** : 6566.

KARIM,F.D., L.D.URNESS, C.S.THUMMEL, M.J.KLEMSZ, S.R.Mc KERCHER, A.CELADA, C. van BEVEREN, R.A.MAKI, C.V.GUNTHER, J.A.NYE and B.J.GRAVES. The *ets*-domain : a new DNA-binding motif that recognizes a purine-rich core DNA sequence. *Genes and Development* **4** : 1451.

KEATING,M.T. and L.T.WILLIAMS. (1988). Autocrine stimulation of intracellular PDGF receptors in *v-sis*-transformed cells. *Science* **239** : 914.

KELEKAR,A. and M.D.COLE. (1987). Immortalization by *c-myc*, *H-ras*, and E1a oncogenes induces differential cellular gene expression and growth factor responses. *Mol. Cell. Biol.* **7** : 3899.

KHOURY,G. and P.GRUSS. (1983). Enhancer elements. *Cell* **33** : 313.

- KIMURA,G. and A.ITAGAKI. (1975). Initiation and maintenance of cell transformation by simian virus 40 : a viral genetic property. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **72** : 673.
- KINGSTON,R.E., A.S.BALDWINJr and P.A.SHARP. (1985). Transcription control by oncogenes. Cell **41** : 3.
- KLEIN,G. (1983). Specific chromosomal translocations and the genesis of B-cell-derived tumors in mice and men. Cell **32** : 311.
- KLEMPNAUER,K.H., A.HANNELORE and H.BIEDENKAPP. (1989). Activation of transcription by *v-myb* : evidence for two different mechanisms. Genes and Development **3** : 1582.
- 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.
- 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.
- 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.
- KLEMSZ,M.J., S.R. McKERCHER, A. CELADA, C. Van BEVEREN and R.A. MAKI. (1990). The macrophage and B cell-specific transcription factor PU.1 is related to the *ets* oncogene. Cell **61** : 113.
- KLINKEN,S.P., N.A.NICOLA and G.R.JOHNSON. (1988). *In vitro*-derived leukemic erythroid cell lines induced by a *raf*- and *myc*-containing retrovirus differentiate in response to erythropoietin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85** : 8506.
- KLOETZER,W.S., S.A.MAXWELL and R.B.ARLINGHAUS. (1983). P85*ag-mos* encoded by ts110 moloney murine sarcoma virus has an associated protein kinase activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80** : 412.
- KMIECIK,T.E. and D.SHALLOWAY. (1987). Activation and suppression of pp60<sup>c-src</sup> transforming ability by mutation of its primary sites of tyrosine phosphorylation. Cell **49** : 65-73.
- KO,H.S., P.FAST, W. Mc BRIDE and L.M.STAUDT. (1988). A human protein specific for the immunoglobulin octamer DNA motif contains a functional homeobox domain. Cell **55** : 135.
- KOUZARIDES,R. and E.ZIFF. (1988). The role of the leucine zipper in the *fos-jun* interaction. Nature **336** : 646.
- KOVESDI,I., R.REICHEL and J.R.NEVINS. (1987). Role of an adenovirus E2 promoter binding factor in E1A-mediated coordinate gene control. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84** : 2180.
- KRANTZ,S.B. and E.GOLDWASSER. (1984). Specific binding of erythropoietin to spleen cells infected with the anemia strain of Friend virus. Proc. Natl. Acad. Sci. **81** : 7574.
- KRIS,R.M., I.LAX, W.GULLICK, M.D.WATERFIELD, A.ULLRICH, M.FRIDKIN and J.SCHLESSINGER. (1985). Antibodies against a synthetic peptide as a probe for the kinase activity of the avian EGF receptor and *v-erbB* protein. Cell **40** : 619.

- KUHL,D., J. de la FUENTE, M.CHATURNEDI, S.PARIMOO, J.RYALS, F.MEYER and C.WEISSMANN. (1987). Reversible silencing of enhancers by sequences derived from the human IFN- $\alpha$  promoter. *Cell* **50** : 1057.
- KURTH,R and H.BAUER. (1975). Avian RNA Tumor Viruses. A model for studying tumor associated cell surface alterations. *Biochem. Biophys. Acta.* **417** : 1.
- LAIMINS,L., M.HOLMGREN-KÖNIG and G.KHOURY. (1986). Transcriptional "silencer" element in rat repetitive sequences associated with the rat insulin 1 gene locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83** : 3151.
- LAND,H., A.C.CHEN, J.P.MORGENSTERN, L.F.PARADA and R.A.WEINBERG. (1986). Behavior of *myc* and *ras* oncogenes in transformation of rat embryo fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* **6** : 1917.
- LAND,H., L.F.PARADA and R.A.WEINBERG. (1983). Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* **304** : 596.
- LANDSCHULZ,W.H., P.F.JOHNSON, A.Y.ADASHI, B.J.GRAVES and S.L. Mc KNIGHT. (1988a). Isolation of a recombinant copy of the gene encoding C/EBP. *Genes Dev.* **2** : 786.
- LANDSCHULZ,W.H., P.F.JOHNSON and S.L.Mc KNIGHT. (1988b). The leucine zipper : a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* **240** : 1759.
- LANDSCHULZ,W.H., P.F.JOHNSON and S.L.Mc KNIGHT. (1989). The DNA binding domain of the rat liver nuclear protein C/EBP is bipartite. *Science* **243** : 1681.
- LANE,T., C.IBANEZ, A.GARCIA, T.GRAF and J.LIPSICK. (1990). Transformation by *v-myb* correlates with trans-activation of gene expression. *Mol. Cell. Biol.* **10** : 2591.
- LEAL,F., L.T.WILLIAMS, K.C.ROBBINS and S.A.AARONSON. (1985). Evidence that the *v-sis* gene product transforms by interaction with the receptor for platelet-derived growth factor. *Science* **230** : 327.
- LECH,K., K.ANDERSON and R.BRENT. (1988). DNA-bound *fos* proteins activate transcription in yeast. *Cell* **52** : 179.
- LEDER,A., P.K.PATTENGAL, A.KUO, T.A.STEWART and P.LEDER. (1986). Consequences of widespread deregulation of the *c-myc* gene in transgenic mice : multiple neoplasms and normal development. *Cell* **45** : 485.
- LEE,K.A.W. and M.R.GREEN. (1987). A cellular transcription factor E4F1 interacts with an E1A-inducible enhancer and mediates constitutive enhancer function *in vitro*. *EMBO J.* **6** : 1345.
- LEE,W., P.MITCHELL and R.TJIAN. (1987). Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. *Cell* **49** : 741.
- LEMMON,V. (1985). Monoclonal antibodies specific for glia in the chick nervous system. *Dev. Brain Res.* **23** : 111.
- LEONG,K., L.BRUNET and A.J.BERK. (1988). Factors responsible for the higher transcriptional activity of extracts of adenovirus-infected cells fractionate with the TATA box transcription factor. *Mol. Cell. Biol.* **8** : 1765.
- LEPRINCE,D., A.GEGONNE, J.COLL, C.de TAISNE, A.SCHNEEBERGER, C.LAGROU and D.STEHELIN. (1983). A putative second cell-derived oncogene of the avian leukaemia retrovirus E26. *Nature* **306** : 395.



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.

LEVINE, M. and T. HOEY. (1988). Homeobox proteins as sequence-specific transcription factors. *Cell* **55** : 537.

LEVINSON, A. D., H. OPPERMAN, L. LEVINTOW, H. E. VARMUS and J. M. BISHOP. (1978). Evidence that the transforming gene of avian sarcoma virus encodes a protein kinase associated with a phosphoprotein. *Cell* **15** : 561.

LEWIN, B. (1990). Commitment and activation at PolII promoters : a tail of protein-protein interactions. *Cell* **61** : 1161.

LI, R. M., M. DUTERQUE-COQUILLAUD, C. LAGROU, B. DEBUIRE, T. GRAF, D. STEHELIN and D. LEPRINCE. (1989). A single amino acid substitution in the DNA-binding domain of the *myb* oncogene confers a thermolabile phenotype to E26 transformed myeloid cells. *Oncogene Research* **5** : 137.

LILLIE, J. W., M. GREEN and M. R. GREEN. (1986). An adenovirus E1A protein region required for transformation and transcriptional repressions. *Cell* **46** : 1043.

LINIAL, M. (1982). Two retroviruses with similar transforming genes exhibit differences in transforming potential. *Virology* **119** : 382.

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.

LUGO, T. G. and O. N. WITTE. (1989). The BCR-ABL oncogene transforms *rat-1* cells and cooperate with *v-myc*. *Mol. Cell. Biol.* **9** : 1263.

LÜSCHER, B. and R. N. EISENMAN. (1988). *c-myc* and *c-myb* protein degradation : effect of metabolic inhibitors and heat shock. *Mol. Cell. Biol.* **8** : 2504.

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.

LÜSCHER, B., E. CHRISTENSON, D. W. LITCHFIELD, E. G. KREBS and R. N. EISENMAN. (1990). *Myb* DNA binding inhibited by phosphorylation at a site deleted during oncogenic activation. *Nature* **344** : 517.

MA, J. and M. PTASHNE. (1987). A new class of yeast transcriptional activators. *Cell* **51** : 113.

MacAULEY, A. and T. PAWSON. (1988). Cooperative transforming activities of *ras*, *myc*, and *src* viral oncogenes in nonestablished rat adrenocortical cells. *J. Virol.* **62** : 4712.

MADER, S., V. KUMAR, M. de VERNEUIL and P. CHAMBON. (1989). Three amino acids of the oestrogen receptor are essential to its ability to distinguish an oestrogen from a glucocorticoid response element. *Nature* **338** : 271.

MANIATIS, T., S. GOODBOURN and J. A. FISCHER. (1987). Regulation of inducible and tissue specific gene expression. *Science* **236** : 1237.

MARTIN, G. S. (1970). Rous sarcoma virus : a function required for the maintenance of the transformed state. *Nature* **227** : 1021.

- MARTIN,P. (1986). Coopération des gènes activés *mil* et *myc* dans la transformation cellulaire. Thèse de Doctorat Option Biologie cellulaire et moléculaire. Université de Lille I.
- MARTIN,P., C.HENRY, F.DENHEZ, P.AMOUYEL, C.BECHADE, G.CALOTHY, B.DEBUIRE, D.STEHELIN and S.SAULE. (1986b). Characterization of a MH2 mutant lacking the *v-myc* oncogene. *Virology* **153** : 272.
- MARTIN,P., C.HENRY, F.FERRE, C.BECHADE, A.BEGUE, C.CALOTHY, B.DEBUIRE, D.STEHELIN and S.SAULE. (1986a). Characterization of a *myc*-containing retrovirus generated by propagation of the MH2 viral subgenomic RNA. *J. Virol.* **57** : 1191.
- MARX,J. (1990). Partner found for the *myc* protein. *Science* **249** : 1503.
- MARX,M., A.EYCHENE, D.LAUGIER, C.BECHADE, P.CRISANTI, P.DEZELEE, B.PESSAC and G.CALOTHY. (1988a). A novel oncogene related to *c-mil* is transduced in chicken neuroretina cells induced to proliferate by infection with an avian lymphomatosis virus. *EMBO J.* **7** : 3369.
- MARX,M., P.CRISANTI, A.EYCHENE, C.BECHADE, D.LAUGIER, J.GHYSDAEL, B.PESSAC and G.CALOTHY. (1988b). Activation and transduction of *c-mil* sequences in chicken neuroretina cells induced to proliferate by infection with avian lymphomatosis virus. *J.Virol.* **62** : 4627.
- MAYER,B.J., M.HAMAGUCHI and H.HANAFUSA. (1988). A novel viral oncogene with structural similarity to phospholipase C. *Nature* **332** : 272.
- McKAY, R.D.G. (1981). Binding of a simian virus 40 T antigen-related protein to DNA. *J. Mol. Biol.* **145** : 471.
- McKNIGHT,S. and R.TJIAN. (1986). Transcriptional selectivity of viral genes in mammalian cells. *Cell* **46** : 795.
- METCALF,D. (1985). The Granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. *Science* **229** : 16.
- MILLER,J., A.D.Mc LACHLAN and A.KLUG. (1985). Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor III A from xenopus oocytes. *EMBO J.* **4** : 1609.
- MINTZ,B. and K.ILLMENSEE. (1975). Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells. *Proc. Acad. Natl. Sci. USA* **72** : 3585.
- MITCHELL,J.P. and R.TJIAN. (1989). Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* **245** : 371.
- MITCHELL,P.J., C.WANG and R.TJIAN. (1987). Positive and negative regulation of transcription *in vitro* : enhancer-binding protein AP-2 is inhibited by SV40 T antigen. *Cell* **50** : 847.
- 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.
- MOELLING,K.A., B.HEIMANN, P.BEIMLING, U.R.RAPP and T.SANDER. (1984). Serine and threonine specific protein kinase activities of purified *gag-mil* and *gag-raf* proteins. *Nature* **312** : 558.
- MONTMINY,M.R. and L.M.BILEZIKJIAN. (1987). Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene. *Nature* **328** : 175.

- MOREAU-GACHELIN, F., A. TAVITIAN and P. TAMBOURIN. (1988). *Spi-1* is a putative oncogene in virally induced murine erythroleukaemias. *Nature* **331** : 277.
- MOREAU-GACHELIN, F., D. RAY, P. TAMBOURIN, A. TAVITIAN, M. J. KLEMSZ, S. R. Mc KERCHER, A. CELADA, C. VAN BEVEREN and R. A. MAKI. (1990). The PU-1 transcription factor is the product of the putative oncogene *Spi-1*. *Cell* **61** : 1166.
- MOSCOVICI, C. and L. GAZZOLO. (1982). Transformation of hemopoietic cells with avian leukemia viruses. In "Advances in Viral Oncology" (G. Klein, ed), Vol **1** : 83 Raven Press, New York.
- 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.
- 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.
- MÜLLER, M. M., S. RUPPERT, W. SCHAFFNER and P. MATTHIAS. (1988). A cloned octamer transcription factor stimulates transcription from lymphoid specific promoters in non-B cells. *Nature* **336** : 544.
- MULLER, R., R. BRAVO, J. BURCKHARDT and T. CURRAN. (1984). Induction of *c-fos* gene and protein by growth factors precedes activation of *c-myc*. *Nature* **312** : 716.
- MURRAY, M. J., J. M. CUNNINGHAM, L. F. PARADA, F. DAUTRY, P. LEBOWITZ and R. A. WEINBERG. (1983). The HL-60 transforming sequence : a *ras* oncogene coexisting with altered *myc* genes in hematopoietic tumors. *Cell* **33** : 749.
- MURRE, C., P. S. McCAW and D. BALTIMORE. (1989a). A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin, enhancer binding, daughterless, *MyoD*, and *myc* proteins. *Cell* **56** : 777.
- MURRE, C., P. S. McCAW, H. VAESSIN, M. CAUDY, L. Y. JAN, Y. JAN, C. V. CABRERA, J. N. BUSKIN, S. D. HAUSCHKA, A. B. LASSAR, H. WEINTRAUB and D. BALTIMORE. (1989b). Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* **58** : 537.
- NAKABEPPPO, Y., K. RYDER and D. NATHANS. (1988). DNA binding activities of three murine *jun* proteins : stimulation by *fos*. *Cell* **55** : 907.
- NEEL, B. G., W. S. HAYNARD, 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.
- NEIL, J. C. (1983). Defective avian sarcoma viruses. *Curr. Topics. Microbiol. Immunol* **103** : 51.
- NESS, S. A., A. MARKNELL and T. GRAF. (1989). The *v-myb* oncogene product binds to and activates the promyelocyte-specific *mim-1* gene. *Cell* **59** : 1115.
- NEWBOLD, R. F. and W. OVERELL. (1983). Fibroblast immortality is a prerequisite for transformation by EJ *c-Ha-ras* oncogene. *Nature* **304** : 648.
- NEWBOLD, R. F., R. W. OVERELL and J. R. CONNELL. (1982). Induction of immortality is an early event in malignant transformation of mammalian cells by carcinogens. *Nature* **299** : 633.

- NISHINA, Y., H. NAKAGOSHI, F. IMAMOTO, T. J. GONDA and S. ISHII. (1989). Trans-activation by the *c-myb* proto-oncogene. *Nucleic Acids Res.* **17** : 107.
- NOMURA, N., M. TAKAHASHI, M. MATSUI, S. ISHII, T. DATE, S. SASAMOTO and R. ISHIZAKI. (1988). Isolation of human cDNA clones of *myb*-related genes, *A-myb* and *B-myb*. *Nucleic Acids Res.* **16** : 11075.
- NORMAN, C., M. RUNSWICK, R. POLLOCK and R. TREISMAN. (1988). Isolation and properties of cDNA clones encoding SRF, a transcription factor that binds to the *c-fos* serum response element. *Cell* **55** : 989.
- 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.
- O'DONNELL, P. V., E. FLEISSNER, H. LONIAL, C. F. KOEHNE and A. REICIN. (1985). Early clonality and High-frequency proviral integration into the *c-myc* locus in AKR leukemias. *J. Virol.* **55** : 500.
- O'SHEA, E. K., R. RUTKOWSKI and P. S. KIM. (1988). Evidence that the leucine zipper is a coiled coil. *Science* **243** : 568.
- OKADA, T. S. (1983). Recent progress in studies of the transdifferentiation of eye tissue *in vitro*. *Cell Differentiation* **13** : 177.
- OKADA, T. S., K. YASUDA and K. NOMURA. (1979). The presence of multipotential progenitor cells in embryonic neural retina as revealed by clonal cell culture. *Cell Lineage, Stem Cells and Cell Determination INSERM Symposium N°10* Editor N. Le Douarin pp 335.
- OLDEN, K. and K. M. YAMADA. (1977). Mechanism of the decrease in the major cell surface protein of chick embryo fibroblasts after transformation. *Cell* **11** : 957.
- ONCLERCQ, R., P. GILARDI, A. LAVENU and C. CREMISI. (1988). *c-myc* products trans-activate the adenovirus E4 promoter in EC stem cells by using the same target sequence as E1A products. *J. Virol.* **62** : 4533.
- ONDEK, B., A. SHEPARD and W. HERR. (1987). Discrete elements within the SV40 enhancer region display different cell-specific enhancer activities. *EMBO J.* **6** : 1017.
- OPPERMANN, H., A. D. LEVINSON, H. E. VARMUS, L. LEVINTOW and J. M. BISHOP. (1979). Uninfected vertebrate cells contain a protein that is closely related to the product of the avian sarcoma virus transforming gene (*src*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76** : 1804.
- OSHIMURA, M., T. M. GILMER and J. C. BARRETT. (1985). Nonrandom loss of chromosome 15 in syrian hamster tumours induced by *v-Ha-ras* plus *v-myc* oncogenes. *Nature* **316** : 636.
- OWEN, A. J., P. PANTAZIS and H. N. ANTONIADES. (1984). Simian sarcoma virus-transformed cells secrete a mitogen identical to platelet-derived growth factor. *Science* **225** : 54.
- PACHL, C., B. BIEGALKE and M. LINIAL. (1983). RNA and protein encoded by MH2 virus : evidence for subgenomic expression of *v-myc*. *J. Virol.* **45** : 133.
- PALMIERI, S. and M. L. VOGEL. (1987). Fibroblast transformation parameters induced by the avian *v-mil* oncogene. *J. Virol.* **61** : 1717.
- PAONESSA, G., F. GOUNARI, R. FRANK and R. CORTESE. (1988). Purification of a NF-1-like DNA-binding protein from rat liver and cloning of the corresponding cDNA. *EMBO J.* **7** : 3115.

- PARADA,L.F., H.LAND, R.A.WEINBERG, D.WOLF and V.ROTTER. (1984). Cooperation between gene encoding p53 tumour antigen and *ras* in cellular transformation. *Nature* **312** : 649.
- PARRAGA,G., S.J.HORVATH, A.EISEN, W.E.TAYLOR, L.HOOD, E.T.YOUNG and R.E.KLEVIT. (1988). Zinc dependent structure of a single-finger domain of yeast ADR 1. *Science* **241** : 1489.
- 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.
- PAZ-ARES,J., D.GHOSAL, U.WIENAND, P.A.PETERSON and H.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.
- PERKINS,K.K., G.DAILEY and R.TJIAN. (1988). Novel *jun*- and *fos*- related proteins in *Drosophila* are functionally homologous to enhancer factor AP-1. *EMBO J.* **7** : 4265.
- PESSAC,B. and G.CALOTHY. (1974). Transformation of chick embryo neuroretinal cells by Rous sarcoma virus *in vitro* : induction of cell proliferation. *Science* **185** : 709.
- PFEIFER,A.M.A., G.E.MARKIII, L.MALAN-SHIBLEY, S.GRAZIANO, P.AMSTAD and C.C.HARRIS. (1989). Cooperation of *c-raf-1* and *c-myc* protooncogenes in the neoplastic transformation of simian virus 40 large tumor antigen-immortalized human bronchial epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86** : 10075.
- PICARD,D. and K.R.YAMAMOTO. (1987). Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *EMBO J.* **6** : 3333.
- PICARD,D., S.J.SALSER and K.R.YAMAMOTO. (1988). A movable and regulable inactivation function within the steroid binding domain of the glucocorticoid receptor. *Cell* **54** : 1073.
- PIRCHER,R., D.A.LAWRENCE, A.M.LORINET and L.SIMONNEAU. (1987). Transdifferentiated embryonic neuroretina cells : an *in vitro* system to study crystallin aggregation processes. *Exp. Eye Res.* **45** : 947.
- PIWNICA-WORMS,H., K.B.SAUNDERS, T.M.ROBERTS, A.E.SMITH and S.H.CHENG. (1987). Tyrosine-phosphorylation regulates the biochemical and biological properties of pp60<sup>c-src</sup>. *Cell* **49** : 75.
- POGNONEC,P., K.E.BOULUKOS and J.GHYSDAEL. (1989). The *c-ets-1* protein is chromatin associated and binds to DNA *in vitro*. *Oncogene* **4** : 691.
- 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.
- POGNONEC,P., K.E.BOULUKOS, R.BOSSELUT, C.BOYER, A.M.SCHMITT-VERHLULST and J.GHYSDAEL. (1990). Identification of a *Ets1* variant protein unaffected in its chromatin and *in vitro* DNA binding capacities by T cell antigen receptor triggering and intracellular calcium rises. *Oncogene* **5** : 603.
- POIRIER,F., D.LAUGIER, M.MARX, G.DAMBRINE, E.A.GARBER, P.GENVRIN, T.DAVID-PFEUTY and G.CALOTHY. (1987). Rous sarcoma virus mutant dlPA105 induces different transformed phenotypes in quail embryonic fibroblasts and neuroretina cells. *J. Virol.* **61** : 2530.

- PRENDERGAST,G.C. and M.D.COLE. (1989). Post-transcriptional regulation of cellular gene expression by the *c-myc* oncogene. *Mol. Cell. Biol.* **9** : 124.
- PRIBYL,L.J., D.K.WATSON, M.J.McWILLIAMS, R.ASCIONE and T.S.PAPAS. (1988). The *Drosophila ets-2* gene : molecular structure, chromosomal localization, and developmental expression. *Developmental Biology* **127** : 45.
- PRIVALSKY,M.L., L.SEALY, J.M.BISHOP, J.P.Mc GRATH and A.D.LEVINSON. (1983). The product of the avian erythroblastosis virus *erbB* locus is a glycoprotein. *Cell* **32** : 1257.
- PTASHNE,M. (1986). Gene regulation by proteins acting nearby and at a distance. *Nature* **322** : 697.
- PTASHNE,M. (1988). How eukaryotic transcription activators work. *Nature* **335** : 683.
- QUADE,K., S.SAULE, D.STEHELIN, G.KITCHENER and M.J.HAYMAN. (1981). Revertants of rat cells transformed by avian erythroblastosis virus. *Virology* **115** : 322.
- RADKE,K., H.BEUG, S.KORNEFELD 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.
- 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.
- RAMSAY,G., G.I.EVAN and J.M.BISHOP. (1984). The protein encoded by the human proto-oncogene *c-myc*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81** : 7742.
- 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.
- RAO,V.N., T.S.PAPAS and E.S.P.REDDY. (1987). *erg*, a human *ets*-related gene on chromosome 21 : alternative splicing, polyadenylation, and translation. *Science* **237** : 635.
- RAPP,U.R., M.D.GOLDSBOROUGH, G.E.MARK, T.I.BONNER, J.GROFFEN, F.H.REYNOLDS,Jr and J.R.STEPHENSON. (1983). Structure and biological activity of *v-raf*, a unique oncogene transduced by a retrovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80** : 4218.
- RASSOULZADEGAN,M., A.COWIE, A.CARR, N.GLAICHENHAUS, R.KAMEN and F.CUZIN. (1982). The roles of individual polyoma virus early proteins in oncogenic transformation. *Nature* **300** : 713.
- REDDY,A.L. and P.J.FIALKOW. (1983). Papillomas induced by initiation-promotion differ from those induced by carcinogen alone. *Nature* **304** : 69.
- REDDY,E.S.P., V.N.RAO and T.S.PAPAS. (1987). The *erg* gene : a human gene related to the *ets* oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84** : 6131.
- REICH,E. (1976). Plasminogens activator : secretion by neoplastic cells and macrophages in proteases and biological controls (E.Reich, D.B.Rifkins and E.Shaw, eds). Cold Spring Harbor Laboratory. New York pp : 333.
- RIDLEY,A.J., H.F.PATERSON, M. NOBLE and H.LAND. (1988). *ras*-mediated cell cycle arrest is altered by nuclear oncogenes to induce schwann cell transformation. *EMBO J.* **7** : 1635.

- RIO,D., A.ROBBINS, R.MYERS and T.TJIAN. (1980). Regulation of simian virus 40 early transcription *in vitro* by a purified tumor antigen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77 : 5706.
- ROBERTS,A.B., C.A.FROLIK, M.A.ANZANO and M.B.SPORN. (1983). Transforming growth factors from neoplastic and non neoplastic tissues. Fed. Proc. 42 : 2621.
- ROBERTS,A.B., M.A.ANZANO, L.M.WAKEFIELD, N.S.ROCHE, D.F.STERN and M.B.SPORN. (1985). Type  $\beta$  transforming growth factor : a bifunctional regulator of cellular growth. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 : 119.
- ROBERTSON,M. (1988). Homeoboxes, POU proteins and the limits of promiscuity. Nature 336 : 522.
- ROUS,P. (1911). A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. J. Exp. Med. 13 : 397.
- 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.
- RULEY,H.E. (1983). Adenovirus early region 1A enables viral and cellular transforming genes to transform primary cells in culture. Nature 304 : 602.
- SAKURA,H., C.KANEI-ISHII, T.NAGASE, H.NAKAGOSHI, T.J.GONDA and S.ISHII. (1989). Delineation of three functional domains of the transcriptional activator encoded by the *c-myb* protooncogene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 : 5758.
- SANTORO,C., N.MERMOD, P.C.ANDREWS and R.TJIAN. (1988). A family of human CCAAT-box-binding proteins active in transcription and DNA replication : cloning and expression of multiple cDNAs. Nature 334 : 218.
- 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.
- SANTOS,M. and J.S.BUTEL. (1985). Surface T-antigen expression in simian virus 40-transformed mouse cells : correlation with cell growth rate. Mol. Cell. Biol. 5 : 1051.
- SAP,J., A.MUNOZ, K.DAMM, Y.GOLDBERG, J.GHYSDAEL, A.LEUTZ, H.BEUG and B.VENNSTROM. (1986). The *c-erbA* protein is a high-affinity receptor for thyroid hormone. Nature 324 : 635.
- SASSONE-CORSI,P., W.W.LAMPH, M.KAMPS and I.M.VERMA. (1988). Fos-associated cellular p39 is related to nuclear transcription factor AP-1. Cell 54 : 553.
- SAULE,S. (1987). Les oncogènes des virus des leucémies aiguës aviaires et leurs homologues cellulaires : structure et fonction. Thèse de Doctorat Option Biologie cellulaire et moléculaire. Université de Lille I.
- SAULE,S., J.COLL, M.RIGHI, C.LAGROU, M.B.RAES and D.STEHELIN. (1983). Two different types of transcription for the myelocytomatosis viruses MH2 and CMII. EMBO J. 2 : 805.
- SAULE,S., J.P.MERIGAUD, A.E.A.MOUSTAFA, F.FERRE, P.M.RONG, P.AMOUYEL, B.QUATANNENS, D.STEHELIN and F.DIETERLEN-LIEVRE. (1987). Heart tumors specifically induced in young avian embryos by the *v-myc* oncogene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 : 7982.

- SCHAFFNER, W. (1989). How do different transcription factors binding the same DNA sequence sort out their jobs ? Trends Genet. 5 : 37.
- SCHEIDEREIT, C., J.A.CROMLISH, T.GERSTER, K.KAWAKAMI, C.G.BALMACEDA, R.A.CURRIE and G.ROEDER. (1988). A human lymphoid-specific transcription factor that activates immunoglobulin gene is a homeobox protein. Nature 336 : 551.
- SCHIMIZU, K., Y.NAKATSU, M.SEKIGUCHI, K.HOKAMURA, K.TANAKA, M.TERADA and T.SUGIMURA. (1985). Molecular cloning of an activated human oncogene, homologous to *v-raf*, from primary stomach cancer. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 : 5641.
- SCHUERMANN, M., M.NEUBERG, J.B.HUNTER, T.JENUWEIN, R.P.PRYSECK, R.BRAVO and R.Müller. (1989). The leucine repeat motif in *fos* protein mediates complex formation with *jun/AP-1* and is required for transformation. Cell 56 : 507.
- SCHÜLE, R., M.MÜLLER, C.KALTSCHMIDT and R.RENKAWITZ. (1988). Many transcription factors interact synergistically with steroid receptors. Science 242 : 1418.
- SCHWAB, M., H.E.VARMUS and J.M.BISHOP. (1985). Human *N-myc* gene contributes to neoplastic transformation of mammalian cells in culture. Nature 316 : 160.
- SCHWARZ-SOMMER, Z., N.SHEPHERD, E.TACKE, A.GIERL, W.ROHDE, L.LECLERCQ, M.MATTES, R.BERNDTGEN, P.A.PETERSON and H.SAEDLER. (1987). Influence of transposable elements on the structure and function of the A1 gene of *Zea mays*. EMBO J. 6 : 287.
- SEFTON, B.M., I.S.TROWBRIDGE and J.A.COOPER. (1982). The transforming proteins of Rous sarcoma virus, Harvey sarcoma virus and Abelson virus contain tightly bound lipid. Cell 31 : 465.
- SELTEN, G., H.T.CUYPERS and A.BERNS. (1985). Proviral activation of the putative oncogene *pim-1* in MuLV-induced T-cell lymphomas. EMBO J. 4 : 1793.
- SEN, R. and D.BALTIMORE. (1986). Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. Cell 46 : 705.
- SEVERNE, Y., S.WIELAND, W.SCHAFFNER and S.RUSCONI. (1988). Metal binding finger structures in the glucocorticoid receptor defined by site-diverted mutagenesis. EMBO J. 7 : 2503.
- SHEN-ONG G.L.C., H.C.MORSE III, M.POTTER and J.F.MUSHINSKI. (1986). Two modes of *c-myb* activation in virus-induced mouse myeloid tumors. Mol. Cell. Biol. 6 : 380.
- SHIMIZU, K., D.BIRNBAUM, M.A.RULEY, O.FASANO., Y.SUARD, L.EDLUND, E.TAPAROWSKY, M.GOLDFARB and M.WIGLE. (1983b). Structure of the *Ki-ras* gene of the human lung carcinoma cell line Calu-1. Nature 304 : 497.
- SHIMIZU, K., M.GOLDFARB, M.PERUCHO and M.WIGLER. (1983a). Isolation and preliminary characterization of the transforming gene of a human neuroblastoma cell line. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 : 383.
- SHIMIZU, K., M.GOLDFARB, Y.SUARD, M.PERUCHO, Y.LI, T.KAMATA, J.FERAMISCO, E.STAVNEZER, J.FOGH and M.H.WIGLER. (1983c). Three human transforming genes are related to the viral *ras* oncogenes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 : 2112.



- SHIRAYOSHI, Y., J.I.MIYAZAKI, P.A.BURKE, K.HAMADA, E.APPELLA and K.OZATO. (1987). Binding of multiple nuclear factor to the 5' upstream regulatory element of the murine major histocompatibility class I gene. *Mol. Cell. Biol.* **7** : 4542.
- SIGLER, P.B. (1988). Acid blobs and negative noodles. *Nature* **333** : 210.
- SIMEONE, A., M.PANNESE, D.ACAMPORA, M.D'ESPOSITO, E.BONCINELLI. (1988). At least three human homeoboxes on chromosome 12 belong to the same transcription unit. *Nucleic Acids Res.* **16** : 5379.
- SIMON, M.C., T.M.FISCH, B.I.BENECKE, J.R.NEVINS and N.HEINTZ. (1988). Definition of multiple, functionally distinct TATA elements, one of which is a target in the hsp70 promoter for E1A regulation. *Cell* **52** : 723.
- SIMONNEAU, L., P.CRISANTI, A.M.LORINET, F.ALLIOT, Y.COURTOIS, G.CALOTHY and B.PESSAC. (1986). Crystallin gene expression and lentoid body formation in quail embryo neuroretina cultures transformed by the oncogenic retrovirus Mill Hill 2 or Rous sarcoma virus. *Mol. Cell. Biol.* **6** : 3704.
- SINGER, V.L., C.R.WOBBE and K.STRUHL. (1990). A wide variety of DNA sequences can functionally replace a yeast TATA element for transcriptional activation. *Genes and Development* **4** : 636.
- SINGH, M., J.H.LEBOWITZ, A.S.BALDWIN Jr. and P.A.SHARP. (1988). Molecular cloning of an enhancer binding protein : isolation by screening of an expression library with a recognition site DNA. *Cell* **52** : 415.
- SINN, E., W.MULLER, P.PATTENGAL, I.TEPLER, R.WALLACE and P.LEDER. (1987). Coexpression of MMTV/*v-Ha-ras* and MMTV/*c-myc* genes in transgenic mice : synergistic action of oncogenes *in vivo*. *Cell* **49** : 465.
- SMITH, M.J., D.C.CHARRON-PROCHOWNIK and E.V.PROCHOWNIK. (1990). The leucine zipper of *c-myc* is required for full inhibition of erythroleukemia differentiation. *Mol. Cell. Biol.* **10** : 5333.
- SNYDER, D.S., M.BARBU and B.G.UZMAN. (1990). Expression of Gln1 immunoreactive glycoproteins during development and regeneration in avian peripheral nerve. *Dev. Neurosci.* **12** : 172.
- SORGER, P.K. and M.R.B.PELHAM. (1988). Yeast heat shock factor is an essential DNA-binding protein that exhibits temperature-dependent phosphorylation. *Cell* **54** : 855.
- SORGER, P.K., M.J.LEWIS and H.R.B.PELHAM. (1987). Heat shock factor is regulated differently in yeast and HeLa cells. *Nature* **329** : 81.
- SPORN, M.B. and A.B.ROBERTS. (1985). Autocrine growth factors and Cancer. *Nature* **313** : 745.
- SPORN, M.B. and G.J.TODARO. (1980). Autocrine secretion and malignant transformation of cells. *N. Engl. J. Med.* **303** : 878.
- STAHL, M.L., C.R.FERENZ, K.L.KELLEHER, R.W.KRIZ and J.L.KNOFF. (1988). Sequence similarity of phospholipase C with the non-catalytic region of *src*. *Nature* **332** : 269.
- STANTON, V.P., Jr and G.M.COOPER. (1987). Activation of human *raf* transforming genes by deletion of normal amino-terminal coding sequences. *Mol. Cell. Biol.* **7** : 1171.

- STEHELIN,D., H.E.VARMUS, J.M.BISHOP and P.K.VOGT (1976b). DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma virus is present in normal avian DNA. *Nature* **260** : 170.
- STEHELIN,D., R.V.GUNTAKA, H.E. VARMUS and J.M.BISHOP. (1976a). Purification of DNA complementary to nucleotide sequences required for neoplastic transformation of fibroblasts by avian sarcoma viruses. *J.Mol. Biol.* **101** : 349.
- STERN,D.F., A.B.ROBERTS, N.ROCHE, M.B.SPORN and R.A.WEINBERG. (1986). Differential responsiveness of *myc*- and *ras*-transfected cells to growth factors : selective stimulation of *myc*-transfected cells by epidermal growth factor. *Mol. Cell. Biol.* **6** : 870.
- STOKER,M.C., C.O'NEILL, S.BERRYMAN and V.WAXAM. (1968). Anchorage and growth relation in normal and virus transformed cells. *Int. J. Cancer* **3** : 683.
- STONE,J., T. de LANGE, G.RAMSAY, E.JAKOBOVITS, J.M.BISHOP, H.VARMUS and W.LEE. (1987). Definition of regions in human *c-myc* that are involved in transformation and nuclear localization. *Mol. Cell. Biol.* **7** : 1697.
- STRUHL,K. (1988). The JUN oncoprotein, a vertebrate transcription factor, activates transcription in yeast. *Nature* **332** : 649.
- STURM,R., G.DAS and W.HERR. (1988). The ubiquitous octamer binding protein Oct-1 contains a POU domain with a homeobox subdomain. *Genes Dev.* **2** : 1582.
- SUAREZ,H.G., P.C.NARDEUX, Y.ANDEOL and A.SARASIN. (1987). Multiple activated oncogenes in human tumors. *Oncogene Research* **1** : 201.
- TAMBOURIN,P., F.WENDLING and F.MOREAU-GACHELIN. (1981). Friend leukemia as a multiple-step disease blood. *Cell* **7** : 133.
- TAPAROWSKY,E., K.SHIMIZU, M.GOLDFARB and M.WIGLER. (1983). Structure and activation of the human *N-ras* gene. *Cell* **34** : 581.
- TAYA,Y. K.HOSOGAI, S.HIROHASHI, Y.SHIMOSATO, T.TSUCHIYA, N.TSUCHIDA, M.FUSHIMI, T.SEKIYA and S.NISHIMURA. (1984). A novel combination of *K-ras* and *myc* amplification accompanied by point mutational activation of *k-ras* in a human lung cancer. *EMBO J.* **3** : 2943.
- TEMIN,H.M. and S.MIZUTAMI. (1970). RNA directed RNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* **226** : 1211.
- THOMPSON,T.C., J.SOUTHGATE, G.KITCHENER and H.LAND. (1989). Multistage carcinogenesis induced by *ras* and *myc* oncogenes in a reconstituted organ. *Cell* **56** : 917.
- TICE-BALDWIN,K., G.R.FINK, K.T.ARNDT. (1989). BAS1 has a *myb* motif and activates *HIS4* transcription only in combination with BAS2. *Science* **246** : 931.
- TJIAN,R. (1981). T antigen binding and the control of SV40 gene expression. *Cell* **26** : 1.
- TURNER,R. and T.TJIAN. (1989). Leucine repeats and an adjacent DNA binding domain mediate the formation of functional *c-fos/c-jun* heterodimers. *Science* **243** : 1689.
- URNESSE,L.D. and C.S.THUMMEL. (1990). Molecular interactions within the ecdysone regulatory hierarchy : DNA binding properties of the drosophila ecdysone-inducible E74A protein. *Cell* **63** : 47.

Van den ELSEN,P., S. de PATER, A.HOUWELING, J. Van der VEER and A. van der EB. (1982). The relationship between region E1a and E1b of human adenovirus in cell transformation. *Gene* **18** : 175.

Van LOHUIZEN,M., S.VERBEEK, P.KRIMPENFORT, J.DOMEN, C.SARIS, T.RADASZKIEWICZ and A.BERNS. (1989). Predisposition to lymphomagenesis in *pim-1* transgenic mice : cooperation with *c-myc* and *N-myc* in murine leukemia virus-induced tumors. *Cell* **56** : 673.

VARMUS,H.E. (1987). Oncogenes and transcriptional control. *Science* **238** : 1337.

WASYLYK,B., C.WASYLYK, P.FLORES, A.BEGUE, D.LEPRINCE and D.STEHELIN. (1990). The *c-ets* proto-oncogenes encode transcription factors that cooperate with *c-fos* and *c-jun* for transcriptional activation. *Nature* **346** : 191.

WASYLYK,C., P.FLORES, A.GUTMAN and B.WASYLYK. (1989). PEA3 is a nuclear target for transcription activation by non-nuclear oncogenes. *EMBO J.* **8** : 3371-3378.

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

WATSON,D.K., M.J.McWILLIAMS, P.LAPIS, J.A.LAUTENBERGER, C.W.SCHWEINFEST and T.S.PAPAS. (1988). Mammalian *ets-1* and *ets-2* genes encode highly conserved proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **85** : 7862.

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.

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

WEINBERG,R.A. (1985). The action of oncogenes in the cytoplasm and nucleus. *Science* **230** : 770.

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

WESTAWAY,D., J.PAPKOFF, C.MOSCOVICI and H.E.VARMUS. (1986). Identification of a provirally activated *c-Ha-ras* oncogene in an avian nephroblastoma via a novel procedure cDNA cloning of a chimaeric viral-host transcript. *EMBO J.* **5** : 301.

WESTON,K. and J.M.BISHOP. (1989). Transcriptional activation by the *v-myb* oncogene and its cellular progenitor, *c-myb*. *Cell* **58** : 85.

WHETTON,A.D. and T.M.DEXTER. (1986). Haemopoietic growth factors. *TIBS* **11** : 207.

WILLINGHAM,M.C., I.PASTAN, T.YSHIH and E.M.SCOLNICK. (1980). Localization of the src gene product of the Harvey strain of MSV to plasma membrane of transformed cells by electron microscopic immunocytochemistry. *Cell* **19** : 1005.

WILLUMSEN,B.M., A.CHRISTENSEN, N.L.HUBBERT, A.G.PAPAGEORGE and D.R.LOWY. (1984a). The p21<sup>ras</sup> c-terminus is required for transformation and membrane association. *Nature* **310** : 583.

WILLUMSEN, B.M., K.NORRIS, A.G.PAPAGEORGE, N.L.HUBBERT and D.R.LOWY. (1984b). Harvey murine sarcoma virus p21<sup>ras</sup> protein : biological and biochemical significance of the cysteine nearest the carboxy terminus. *EMBO J.* **3** : 2581.

WOLFE, A.P. and D.D.BROWN. (1988). Developmental regulation of two 5S ribosomal RNA genes. *Science* **241** : 1626.

WORKMAN, J.L., S.M.ABMAYR, W.A.CROMLISH and R.G.ROEDER. (1988). Transcriptional regulation by the immediate early protein of pseudorabies virus during *in vitro* nucleosome assembly. *Cell* **55** : 211.

WU, C., S.WILSON, B.WALKER, I.DAWID, T.PAISLEY, V.ZIMARINO and H.UEDA. (1987a). Purification and properties of Drosophila heat shock activator protein. *Science* **238** : 1247.

WU, L., D.S.E.ROSSER, M.C.SCHMIDT and A.BERK. (1987b). A TATA box implicated in E1A transcriptional activation of a simple adenovirus 2 promoter. *Nature* **326** : 512.

YAMAMOTO, K.K., G.A.GONZALEZ, W.H.BIGGS III and M.R.MONTMINY. (1988). Phosphorylation-induced binding and transcriptional efficacy of nuclear factor CREB. *Nature* **334** : 494.

YANCOPOULOS, G.D., P.D.NISEN, A.TESFAYE, N.E.KOHL, M.P.GOLDFARB and F.W.ALT. (1985). *N-myc* can cooperate with *ras* to transform normal cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82** : 5455.

YMER, S., W.Q.J.TUCKER, C.J.SANDERSON, A.J.HAPEL, H.D.CAMPBELL and J.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.

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

ZERLER, B., B.MORAN, K.MARUYAMA, J.MOOMAW, T.GRODZICKER and H.E.RULEY. (1986). Adenovirus E1A coding sequences that enable *ras* and *pmt* oncogenes to transform cultured primary cells. *Mol. Cell. Biol.* **6** : 887.

ZIMARINO, V. and C.WU. (1987). Induction of sequence-specific binding of Drosophila heat shock activation protein without protein synthesis. *Nature* **327** : 727.

VIROLOGY 153, 272-279 (1986)

## Characterization of a MH2 Mutant Lacking the *v-myc* Oncogene

P. MARTIN, C. HENRY,\* F. DENHEZ, P. AMOUYEL, C. BECHADE,†  
G. CALOTHY,† B. DEBUIRE,\* D. STEHELIN, AND S. SAULE<sup>1</sup>

INSERM Unité 186, Institut Pasteur, 1 Rue Calmette, 59019 Lille Cedex; \*IRCL INSERM Unité 124,  
Place de Verdun, 59045 Lille Cedex; and †Institut Curie-Biologie, Bat. 110, 91105 Orsay, France

Received February 12, 1986; accepted May 13, 1986

We have previously reported that a virus, MH2-PA200, lacking the ability to transform quail embryo cells, could be isolated from wild type (wt) MH2 stocks passaged on chicken neuroretina cells. We report here the molecular cloning and extensive characterization of this MH2-PA200 provirus. Molecularly cloned MH2-PA200 DNA was found to stimulate the growth of neuroretina cells by transfection assays and our results indicate that this recombinant virus was derived from the RAV-1 helper virus, in which *v-mil* and a small part of *v-myc* of MH2 were acquired at the expense of helper ( $\Delta gag-pol-\Delta env$ ) sequences. In order to assess the precise boundary between the *myc* and *env* genes we determined the nucleotide sequence of the junction fragment and showed that 11 of 13 nucleotides of the *env* gene were identical to the *myc* sequence at the recombination point. The nucleotide sequence of the *myc-env* junction fragment of another similar and independently generated MH2 mutant showed similarly 9 nucleotides of homology between the *env* and *myc* sequences at the recombination point that took place at another site, suggesting that a homologous recombination occurred between MH2 and RAV-1 viruses to generate MH2-PA200 and similar mutants. © 1986 Academic Press, Inc.

### INTRODUCTION

The avian retrovirus Mill-Hill No. 2 (MH2) is a replication defective retrovirus that induces carcinomas in fowl and transforms several cell types in culture (Graf and Beug, 1978). The MH2 genome contains the *v-myc* oncogene also found in three other retroviruses (MC29, CMII, OK10) and a second cell-derived oncogene *v-mil* (Coll *et al.*, 1983; Jansen *et al.*, 1983) related to the *src* gene of RSV (Galibert *et al.*, 1984; Kan *et al.*, 1984). In MH2 transformed cells, *v-mil* is expressed as a 100-kDa polyprotein (Hu *et al.*, 1978) resulting from the fusion of *gag* and *mil* sequences (Bechade *et al.*, 1985). This cytoplasmic protein exhibits an *in vitro* phosphothreonine/phosphoserine kinase activity (Moelling *et al.*, 1984). *v-myc* is expressed as a 61/63-kDa protein doublet encoded by a 2.8-kb subgenomic mRNA (Hann *et al.*, 1983; Martin *et al.*, 1986). We recently distinguished some biological

properties of the *mil* and *myc* oncogenes by studying the properties of virus-infected avian fibroblasts and embryo neuroretina cells (NR cells). wt-MH2, MC29, CMII, and OK10 which contain *v-myc* are able to transform avian fibroblasts whereas wt-MH2 which contains both *v-mil* and *v-myc* has in addition the ability to induce the proliferation of avian embryo NR cells (Bechade *et al.*, 1985). From MH2 producing chicken NR cells we isolated MH2 mutants which are unable to morphologically transform avian embryo cells and do not contain the functional *v-myc* oncogene. In order to define the genetic organization of such *v-myc* defective mutants, we molecularly cloned a *v-mil* containing provirus from MH2-PA200 proliferating quail NR cells (Bechade *et al.*, 1985). Our results suggest that MH2-PA200 was generated by homologous recombination between the RAV-1 helper virus and MH2, resulting in the replacement of most of the helper *gag-pol-env* sequences by *v-mil* and part of *v-myc* of MH2.

<sup>1</sup> To whom requests for reprints should be addressed.

## MATERIALS AND METHODS

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

**Transfection procedure.** Seven-day-old quail embryo neuroretina (QNR) cells were transfected with phage DNA according to the calcium method developed by Graham and van der Eb (1973). Precipitated DNA (35  $\mu$ g) was added in 1 ml volume to 100-mm dishes containing  $10^7$  cells. After 1 hr incubation, cells were fed with 10 ml of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS). Ten days later, proliferating cells were observed and were grown up in DMEM 10% FCS.

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

**Cloned DNA probes.** DNA fragments for the preparation of  $^{32}$ P probes were obtained from suitable recombinant plasmids by endonuclease digestions and agarose gel purification.

The LTR probe was from the RSV-SRA genome and represented the 0.36-kbp *EcoRI* fragment containing the LTR sequences. The *gag* probe (*SacI-EcoRI*), the *pol* probe (*EcoRI-KpnI*), the 5' *env* probe (*KpnI-EcoRI*), and the 3' *env* probe (*EcoRI-SacI*) were derived from Pr-RSV-A and previously described (Saule *et al.*, 1983). *myc* probes included a 5' *v-myc* probe (*HpaI-PstI*) derived from pMHX-Hd (Coll *et al.*, 1983) and a 3' *c-myc* probe corresponding to the 3' half of chicken exon 3 (Saule *et al.*, 1984). The *v-mi* probe was obtained from the 1.1-kb *BamHI-HpaI* fragment of plasmid pMH2BS (Coll *et al.*, 1983). The purified fragments were labeled through nick-translation reaction (Amersham nick-translation kit) in the presence of [ $^{32}$ P]dCTP according to the supplier's instructions.

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

**Protein labeling and immunoprecipitation.** Labeling was performed on semiconfluent cultures seeded in 100-mm petri dishes by incubation in 3 ml of modified Eagle's medium lacking methionine (Met) followed by the addition of 0.25 mCi [ $^{35}$ S]methionine for 60 min. Cells were lysed in 3 ml of 0.1% SDS, 1% Triton, 0.5% deoxycholate, and 1% trasytol, Tris-HCl 10 mM, pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM buffer (RIPA), and clarified at 100,000 *g* for 1 hr. Supernatant (0.25 ml) was then incubated for 3 hr at  $4^\circ$  with 3  $\mu$ l rabbit antiserum prepared with a bacterially expressed protein corresponding to the carboxy terminal part of P100<sup>ras-mu</sup> (F. Denhez and J. Ghysdael, in preparation). Protein A-Sepharose beads (10 mg) were added to each sample for 3 hr at  $4^\circ$ . Beads were

washed in RIPA buffer, then in a buffer containing Tris-HCl 10 mM, pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM. Radioactivity was recovered by elution from beads by 5 min boiling in electrophoresis loading buffer (1% SDS, 5% mercaptoethanol, 10% glycerol, 50 mM Tris-HCl, pH 6.8) and loaded onto 10% acrylamide gels, followed by fluorography of the dried gels (Bechade *et al.*, 1985).

*Preparation of the env-myc fragment and nucleotide sequencing.* Subcloning of the *EcoRI*  $\Delta$ *gag mil* $\Delta$ *myc* $\Delta$ *env* fragment of the MH2-PA200 provirus was performed in the *EcoRI* site of pKH47 (Hayashi, 1980). Subcloning of the *Bam*HI-*Eco*RI *mil*- $\Delta$ *myc*- $\Delta$ *env* fragment of MH2-PA201 was performed similarly in *Bam*HI-*Eco*RI sites of pKH 47. MH2-PA200 plasmid DNA was digested with *Hinc*II, digests were loaded onto a 1% agarose gel and electrophoresed overnight. The 0.4-kbp  $\Delta$ *mil*- $\Delta$ *myc*- $\Delta$ *env* fragment from MH2-PA200 was then recovered and digested with *Hae*III. For MH2-PA201, plasmid DNA was digested with *Hpa*I-*Xba*I and the 0.4-kb  $\Delta$ *mil*- $\Delta$ *myc*- $\Delta$ *env* fragment was recovered from a 1% agarose gel and subjected to *Hae*III enzymatic digestion. Nucleotide sequencing was performed by the Maxam and Gilbert procedure (1980). The fragments were dephosphorylated and labeled with [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP and polynucleotide kinase as described (Herisse *et al.*, 1980). To separate the two labeled strands, fragments were denatured at 92° in 30% dimethylsulfoxide and fractionated in a polyacrylamide gel. 5' labeled single stranded fragments were recovered from the gel and subjected to chemical degradation with reagents specific for G, AG, CT, C, and AC.

## RESULTS

### *Molecular Cloning of MH2-PA200 Provirus*

QNR cells were infected with biologically cloned MH2-PA200 (RAV-1) pseudotype virus. DNA from these cells was used as a source of DNA for the preparation of a gene library. High molecular weight DNA was partially cut with *Eco*RI restriction

endonuclease, ligated with purified  $\lambda$  Charon 4A arms, packaged and amplified. One  $\lambda$  phage which hybridized with the *v-mil* and 3' *env* probes was isolated, then purified and amplified. Phage DNA was prepared and digested with different restriction enzymes. Fragments were run on agarose gels, transferred to nitrocellulose and hybridized with different  $^{32}$ P-nick translated probes. A detailed restriction map of the provirus is shown in Fig. 1.

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

### *MH2-PA200-like Mutants Are Revealed by Neuroretina Cells*

The use of a specific biological assay (NR cell proliferation) reveals rapidly and efficiently MH2-PA200-like mutants. This was illustrated by analyzing proviral DNA from NR cells freshly infected with virus produced from QEC transfected with pMH2-Hd and pRAV-1 DNAs; this wt-MH2 (RAV-1) virus was passaged only once on quail embryo cells (QEC) after transfection. Chicken NR cells were passaged twice 20 days after infection with cloned wt-MH2 (RAV-1) virus in order to select proliferating cells before proviral DNA analysis. Southern blots of DNAs cleaved with *Eco*RI or other endonucleases allow-

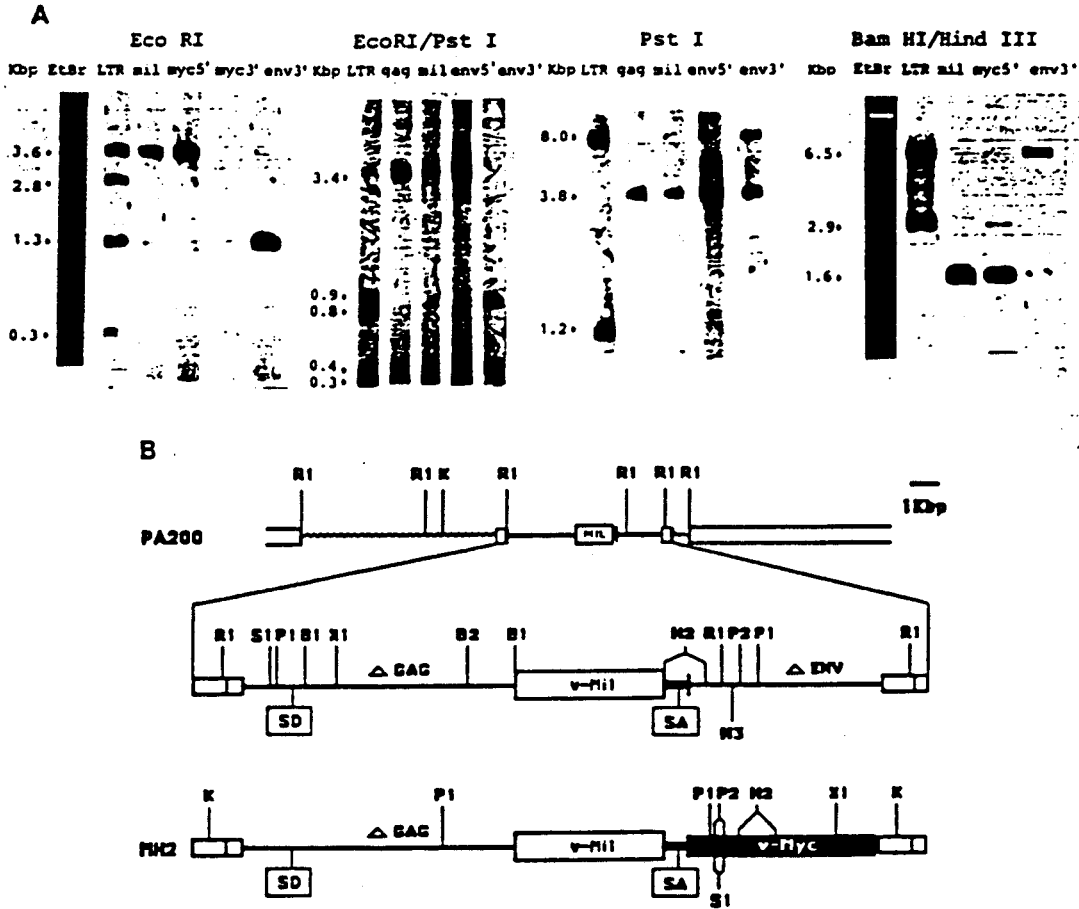


FIG. 1. Characterization of cloned MH2-PA200 proviral DNA. (A)  $\lambda$  MH2-PA200 phage DNA was digested with *EcoRI*, *EcoRI-PstI*, *PstI*, *BamHI-HindIII* restriction enzymes. Digests (1  $\mu$ g/lane) were separated on 1% agarose gels, transferred onto nitrocellulose, and hybridized with the nick-translated probes listed across the top of the figure. Sizes of significant hybridization positive MH2-PA200 bands are indicated (arrowheads). (B) Organization of MH2-PA200 DNA: a restriction map of the recombinant virus can be compared with that of the cloned MH2-Hd (lane 3). Restriction endonucleases used were R1, *EcoRI*; K, *KpnI*; S1, *SstI*; P1, *PstI*; B1, *BamHI*; X1, *XhoI*; B2, *BglII*; H2, *HincII*; P2, *PvuII*; H3, *HindIII*. Only the restriction sites different from those of MH2-PA200 have been indicated on wt-MH2 provirus restriction map. The first *HincII* site present in MH2-PA200 was also a *HpaI* site. SD, splice donor site; SA, splice acceptor site.  $\lambda$  arm DNA,  $\square$ ; cellular DNA,  $\text{---}$ ; LTR,  $\square$ .

ing to distinguish between parental and mutant viruses were hybridized to a *v-mil* probe (Fig. 2). For example, *EcoRI* endonuclease which cuts in the LTRs of wt-MH2 DNA revealed a provirus-sized band of 5.5 kbp in QEC transformed by wt-MH2 (first lane). No band corresponding to recombinant mutants (expected around 3.5 to 4.0 kbp if the internal *EcoRI* site in the helper

*env* gene were acquired) was detected, indicating that such mutants, if present, represented a minor fraction of the proviruses. A similar experiment performed on chicken NR cells (Fig. 2, third lane) readily revealed a strong 4.0-kbp band corresponding to recombinant molecules, in addition to a faint 5.5-kbp wt-MH2 proviral band. The mutant molecules at 4.0 kbp dif-



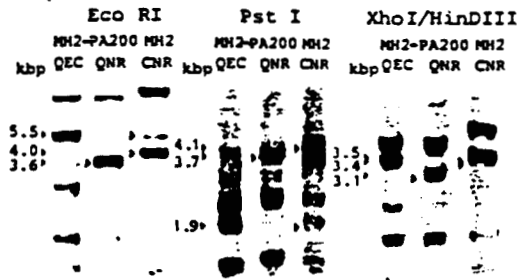


FIG. 2. Southern blot analysis of integrated proviruses from wt-MH2 and mutant infected cells. High molecular weight DNA from infected cells was digested with *EcoRI*, *PstI*, and *XhoI-HindIII* endonucleases. Size separated cellular DNA fragments were transferred to nitrocellulose and hybridized with the *BamHI-HpaI v-mil* probe. Cell types and viruses are listed across the top of the figure. Arrowheads indicate *v-mil* containing DNA fragments.

ferred in size from the *EcoRI* fragment of 3.6 kbp seen with MH2-PA200 mitogenized (quail) NR cells (Fig. 2 lane 2) suggesting that distinct recombination events had occurred in these two separate experiments. These results were confirmed by using other restriction endonucleases like *PstI* or *XhoI + HindIII* (Fig. 2) or other probes like *gag* or 5' *myc* (data not shown). Bands without arrows in Fig. 2 represent fragments of the cellular *mil* DNA. We thus conclude that molecularly cloned wt-MH2 can rapidly recombine with the RAV-1 helper to yield mutants lacking most of *v-myc* that appear to bear a selective advantage on chicken NR cells.

Next, we examined the transcription patterns of the MH2 mutants detected in Fig. 2 lanes 2 and 3. Polyadenylated mRNAs extracted from MH2-PA200 QNR and MH2 CNR cells were hybridized on Northern blots with *v-mil* and other probes. Results in Fig. 3 show that the MH2-PA200 virus exhibited a 5.6-kb genomic RNA which also hybridized with the LTR, 5' *myc* and 3' *env* probes. In addition, the LTR and 3' *env* probes detected a 8.4- and a 3.2-kb viral RNA encoded by helper RAV-1 as well as a 2.4-kb band which also hybridized to the 5' *myc* probe but not to the *v-mil* or 3' *myc* probes. These results suggest that the

splice acceptor site of the *myc* gene is conserved in this provirus and leads to the expression of a small subgenomic *myc-env* RNA. When analyzing MH2 CNR cells, a 6.0-kb MH2-RAV-1 recombinant genomic RNA was detected with a 3' *env* probe in addition to the 8.4- and 3.2-kb helper mRNAs, confirming that this was a recombinant distinct from MH2-PA200. The existence of a putative subgenomic mRNA could not be demonstrated for this recombinant since its expected size was close to that of the RAV-1 helper *env* mRNA at 3.2 kb (Fig. 3 last lane).

#### Nucleotide Sequence of the *myc-env* Junction in the Recombinants

For further analysis of recombination, we molecularly cloned the above-described recombinant. A *Sau3A* DNA library from MH2 CNR cells in  $\lambda$  EMBL4 was screened with *mil* and *env* probes and a recombinant  $\lambda$  phage (MH2-PA201) containing a DNA insert which hybridized to both probes was isolated. The precise boundary between *myc* and *env* sequences was then determined in MH2-PA200 as well as MH2-PA201.

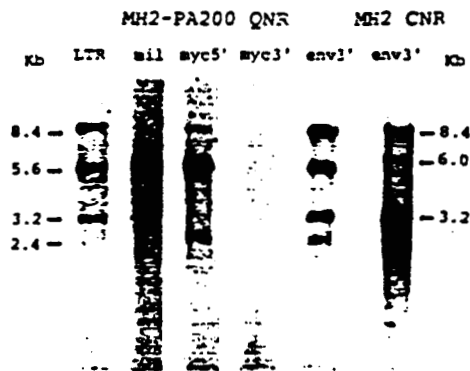


FIG. 3. Size of viral transcripts in proliferating NR cells. Poly A<sup>+</sup> containing RNA was denatured, separated on 1% agarose gel, and transferred to nitrocellulose. Blots were hybridized with the probes listed across the top. The size of the viral transcripts is indicated in the left- and right-hand columns of the figure. Bands at 8.4 and 3.2 kb with the 5' *myc* probe were unexpected and probably due to a small contamination of the *myc* fragment by other MH2 related sequences.

The 0.4-kbp *Hinc*II fragment from MH2-PA200 provirus and the 0.4-kbp *Hpa*I-*Xba*I fragment from MH2-PA201 provirus were purified on agarose gels, cleaved with *Hae*III endonuclease and subjected to nucleotide sequence determination by the Maxam and Gilbert procedure. In Fig. 4 we compare the relevant nucleotide sequences to the wt-MH2 *myc* and SRA *env* sequences. In these two mutants it appeared that the recombination points were different but exhibited several similarities. In MH2-PA200, 11 homologous nucleotides divided into two stretches of five and six nucleotides were found between the *env* and *myc* sequences, whereas nine homologous nucleotides divided into two stretches of four and five nucleotides, were observed in MH2-PA201. This suggested a

similar mechanism of recombination for these two viruses.

#### *The mil Gene of the Molecularly Cloned MH2-PA200 Is Biologically Active*

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

#### DISCUSSION

We reported previously that defined biological systems allowed to reveal distinct activities for the two oncogenes *v-mil* and *v-myc* of wt-MH2 (Bechade *et al.*, 1985) and to isolate mutants expressing only one or the other oncogene product. We have described mutants expressing the p61/63<sup>myc</sup> protein that transform QEC but do not induce NR cells proliferation (Martin *et al.*, 1986). We now report the characterization of mutants expressing the P100<sup>mil</sup> gene product that induce the proliferation of NR cells, but not transformation of QEC. Two such mutants MH2-PA200 and MH2-PA201 were molecularly cloned and the 3' recombination points were sequenced. The mutants appear to have arisen through homologous recombination between wt-MH2 and the RAV-1 helper virus used. The mutants consist of RAV-1 molecules hav-

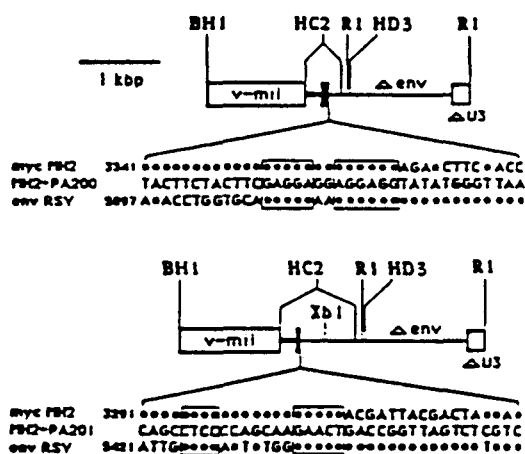


FIG. 4. Nucleotide sequence of the *myc-env* junction fragment. The determined nucleotide sequences of MH2-PA200 and MH2-PA201 (shown in Fig. 2 in MH2 CNR lanes) *myc-env* junction were compared to the *myc* sequence of wt-MH2 (Galibert *et al.*, 1984) and *env* sequence of RSV (Schwartz *et al.*, 1983). For both recombinants, we have indicated the structure of the *Bam*HI-*Eco*RI fragment used to determine the sequence. For MH2-PA200 the nucleotide sequence was determined by the Maxam and Gilbert procedure (1980) on both strands, whereas one strand was sequenced for MH2-PA201. ■ represents *myc*; asterisks represent nucleotides of *myc*-MH2 (upper line) and/or *env*-RSV (lower line) homologous to the nucleotides of *myc-env* junction of the mutants. Stretches of nucleotides common in the three sequences are boxed.

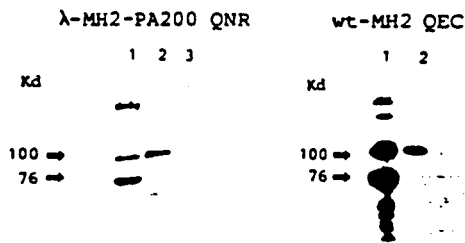


FIG. 5. Immunoprecipitation of P100<sup>myc-mil</sup> protein in QNR cells transfected with lambda MH2-PA200 DNA. Growing cells were labeled for 1 hr with [<sup>35</sup>S]-methionine, lysed, and incubated with rabbit anti-gag serum prepared with the bacterially expressed *XhoI-BamHI* fragment of the *gag* gene (F. Ferre, unpublished data) (lane 1); rabbit anti-mil serum (lane 2); and the same serum preincubated with the corresponding polypeptide (lane 3). Cell types used are indicated on top of the figure.

ing acquired *v-mil* and 200-300 nucleotides of *v-myc* from wt-MH2 at the expense of  $\Delta gag-pol-\Delta env$  helper sequences. In both cases, the 3' recombination points occurred between *myc* and *env* sequences, but at distinct location in both genes. Little information was obtained concerning the precise 5' recombination points that occurred probably within the *gag* sequences between the *PstI* restriction site in wt-MH2 at nucleotide 1542 (Galibert *et al.*, 1984) and the beginning of *mil* since this *PstI* site is present in wt-MH2, absent in RAV-1 and also absent in both recombinants. Finally, both mutants are expected to still produce a subgenomic mRNA (i.e., 2.4 kb for MH2-PA200 in Fig. 3). The smallest deduced protein (for MH2-PA201) would include 6 amino acids of *gag* joined to 16 amino acids of *myc*. Although unlikely, we cannot formally exclude a participation of such a product to mitogenicity. Recombinant viruses may have occurred through reverse transcription of viral RNA, as proposed by Coffin (1979). The quite high frequency with which mutants seem to segregate in wt-MH2 transformed CNR cells could relate to two factors. First, CNR cells induced to proliferate by MH2-PA200-like viruses remain attached to cell-culture plates whereas wt-MH2 infected cells are transformed and easily released into the culture

medium. They could have lost N-CAM-mediated adhesion as shown for CNR cells transformed by Rous sarcoma virus (Brackenbury *et al.*, 1984). Second, recombinant mutants appear to propagate much more efficiently than wt-MH2, since titers were found to be over  $10^6$  mitogenic units for MH2-PA200 (RAV-1) as compared to only  $10^3$  focus forming units for wt-MH2 (RAV-1). These two factors concur, separately or together to favor the selection of MH2-PA200-like mutants in infected CNR cells. Such a selection does not occur in chicken fibroblasts which may explain why this type of mutant was not observed previously.

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

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank C. Lagrou, A. Begue, and M. Benaissa for excellent technical assistance, B. Vandebunder and K. Boulukos for helpful discussion, N. Devassine for patient typing, and M. B. Raes for help in the manuscript preparation. This work was supported by funds from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Centre National de la Recherche Scientifique, Institut Pasteur de Lille, and Association pour la Recherche sur le Cancer. C.H. is a fellow of Ligue Nationale Française contre le Cancer.

#### REFERENCES

- BECHADE, C., CALOTHY, G., PESSAC, B., MARTIN, M., COLL, J., DENHEZ, F., SAULE, S., GHYSDAEL, J., and STEHELIN, D. (1985). Induction of proliferation or transformation of neuroretina cells by the *mil* and *myc* viral oncogenes. *Nature (London)* 316, 559-562.
- BRACKENBURY, R., GREENBERG, M. E., and EDELMAN, M. (1984). Phenotypic changes and loss of N-CAM mediated adhesion in transformed embryonic chicken retinal cells. *J. Cell Biol.* 99, 1944-1954.
- COFFIN, J. M. (1979). Structure, replication, and recombination of retrovirus genomes: Some unifying hypotheses. *J. Gen. Virol.* 42, 1-26.
- COLL, J., RIGHI, M., DE TAISNE, C., DISSOÛS, C., GEGONNE, A., and STEHELIN, D. (1983). Molecular cloning of the avian acute transforming retrovirus MH2

- reveals a novel cell-derived sequence (*v-mil*) in addition to the *myc* oncogene. *EMBO J.* 2, 2189-2194.
- GALIBERT, F., DUPONT DE DINECHIN, S., RIGHI, M., and STEHELN, D. (1984). The second oncogene *mil* of avian retrovirus MH2 is related to the *src* gene family. *EMBO J.* 3, 1333-1338.
- GRAF, T., and BEUG, H. (1978). Avian leukemia viruses: Interaction with their target cells *in vivo* and *in vitro*. *Biochim. Biophys. Acta* 516, 269-299.
- GRAHAM, F. L., and VANDER EB, J. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52, 456-461.
- HANN, S. R., ABRAMS, H. D., ROHRSCHEIDER, L. R., and EISENMAN, R. N. (1983). Proteins encoded by *v-myc* and *c-myc* oncogenes: Identification and localization in acute leukemia virus transformants and bursal lymphoma cell lines. *Cell* 34, 789-798.
- HAYASHI, K. (1980). A cloning vehicle suitable for strand separation. *Gene* 11, 109-115.
- HERISSE, J., COURTOIS, G., and GALIBERT, F. (1980). Nucleotide sequence of the EcoRI D fragment of adenovirus 2 genome. *Nucleic Acids Res.* 8, 2173-2191.
- HU, S. S. F., MOSCOVICI, C., and VOGT, P. K. (1978). The defectiveness of Mill Hill 2, a carcinoma-inducing avian oncovirus. *Virology* 89, 162-178.
- JANSEN, H. W., LURZ, R., BISTER, K., BONNER, T. I., MARK, G. E., and RAPP, U. R. (1984). Homologous cell-derived oncogenes in avian carcinoma virus MH2 and murine sarcoma virus 3611. *Nature (London)* 307, 281-284.
- JANSEN, H. W., RUCKERT, B., LURZ, R., and BISTER, K. (1983). Two unrelated cell-derived sequences in the genome of avian leukemia and carcinoma inducing retrovirus MH2. *EMBO J.* 2, 1969-1975.
- KAN, N. C., FLORDELLIS, C. S., MARK, G. E., DUESBERG, P. H., and PAPAS, T. S. (1984). Nucleotide sequence of avian carcinoma virus MH2: Two potential oncogenes, one related to avian virus MC29 and the other related to murine sarcoma virus 3611. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 3000-3004.
- MARTIN, P., HENRY, C., FERRE, F., BECHADE, C., BEGUE, A., CALOTHY, C., DEBUTRE, B., STEHELN, D., and SAULE, S. (1986). Characterization of a *myc* containing retrovirus generated by propagation of the MH2 subgenomic RNA. *J. Virol.* 57, 1191-1194.
- MAXAM, A. M., and GILBERT, W. (1980). Sequencing end labeled DNA with base specific chemical cleavages. In "Methods in Enzymology" (L. Grossman and K. Moldave, eds.), Vol. 65, pp. 499-560. Academic Press, Orlando, Fla.
- MOELLING, K., HEIMANN, B., BERMLING, P., RAPP, U. R., and SANDER, T. (1984). Serine and threonine-specific protein kinase activities of purified *gag-mil* and *gag-raf* proteins. *Nature (London)* 312, 558-561.
- SAULE, S., COLL, J., RIGHI, M., LAGROU, C., RAES, M. B., and STEHELN, D. (1983). Two different types of transcription for the myelocytomatosis viruses MH2 and CMII. *EMBO J.* 2, 805-809.
- SAULE, S., MARTIN, P., GEGONNE, A., BEGUE, A., LAGROU, C., and STEHELN, D. (1984). Increased transcription of the *c-myc* oncogene in two methylcholanthrene-induced quail fibroblastic cell lines. *Exp. Cell Res.* 153, 496-506.
- SCHWARTZ, D. E., TIZARD, R., and GILBERT, W. (1983). Nucleotide sequence of Rous sarcoma virus. *Cell* 32, 853-869.
- SOUTHERN, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-517.

Induction of Proliferation of Neuroretina Cells by Long Terminal Repeat Activation of the Carboxy-Terminal Part of *c-mil*C. DOZIER, F. DENHEZ, J. COLL, P. AMOUYEL, B. QUATANNENS, A. BEGUE, D. STEHELIN,  
AND S. SAULE\*U 186 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Centre National de la Recherche Scientifique 04 1160,  
Institut Pasteur, 59019 Lille Cedex, France

Received 24 November 1986/Accepted 12 February 1987

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

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

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

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

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

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

Neuroretinas were dissected from 7-day-old quail or chicken embryos, and cells were dissociated and suspended in Eagle basal medium supplemented with 10% fetal calf serum. NR cells at a density of ca. 10<sup>6</sup> per 60-mm dish were transfected with pRAV1 DNA (10 µg) and supercoiled plasmid DNA of either pSmXH *c-mil* or pSpHc *mil-RAF1*, with pPVS as a positive control. Transfection experiments were performed by the calcium method developed by Graham and van der Eb (13). Precipitated DNA (35 µg) was added in a 1-ml volume to the 60-mm dishes. After 1 h of incubation, cells were fed with 5 ml of Eagle basal

\* Corresponding author.

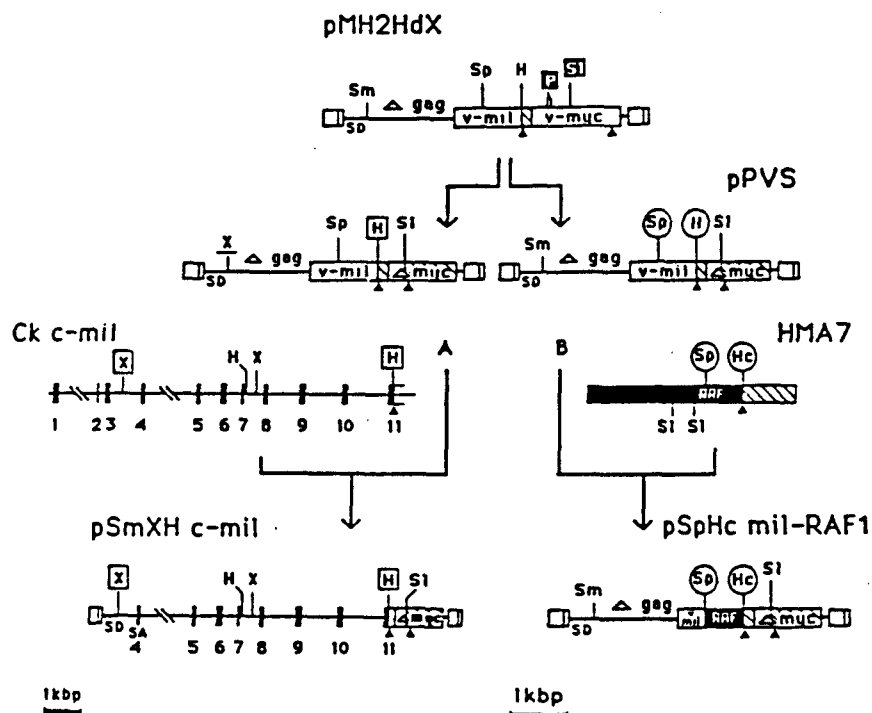


FIG. 1. Construction of recombinant proviruses containing avian *mil* and human *raf-1* (*RAF1*) sequences. On the left, construction of pSmXH *c-mil* which contains chicken *c-mil* sequences is shown; ■, exon; —, intron. On the right, construction of pSpHc *mil-RAF1* which contains a *gag-v-mil-RAF1*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

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

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

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

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

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

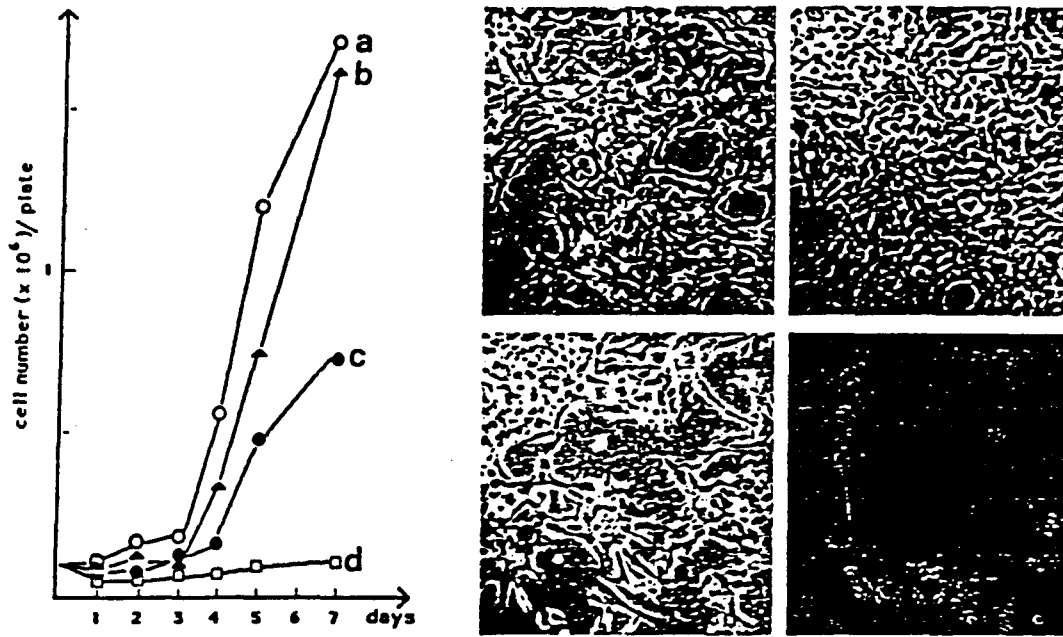


FIG. 2. Growth kinetics and morphology of transfected quail NR cells. At 10 to 15 days after transfection, NR cells were passaged once in 100-mm dishes until they reached confluency and then were subcultured into several 60-mm dishes at low cell density. Medium was renewed daily, and cells from two dishes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

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

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

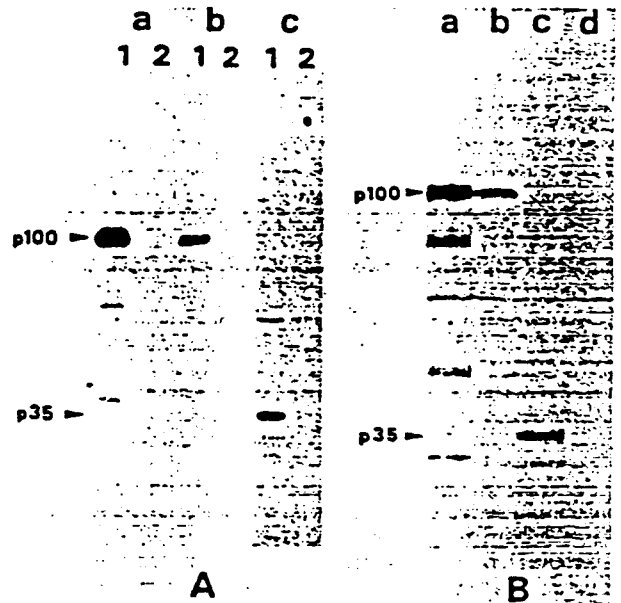


FIG. 3. Immunoprecipitated proteins. (A) NR cells transfected with pPVS (lanes a), pSpHc *mil*-RAF1 (lanes b), and pSmXH *c-mil* (lanes c) were labeled for 1 h with [<sup>35</sup>S]methionine, lysed, and incubated with rabbit anti-*v-mil* antiserum prepared with a bacterially expressed polypeptide (lanes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

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

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

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

#### LITERATURE CITED

- Bargmann, C. I., M. Hung, and R. A. Weinberg. 1986. Multiple independent activations of the *neu* oncogene by a point mutation altering the transmembrane domain of p185. *Cell* 45:649-657.
- Bechade, C., G. Calothy, B. Pessac, P. Martin, J. Coll, F. Denhez, S. Saule, J. Ghysdael, and D. Stehelin. 1985. Induction of proliferation or transformation of neuroretina cells by the *mil* and *myc* viral oncogenes. *Nature (London)* 316:559-562.
- Bonner, T. I., S. B. Kerby, P. Suttrave, M. A. Gunnell, G. Mark, and U. R. Rapp. 1985. Structure and biological activity of human homologs of the *raf-mil* oncogene. *Mol. Cell. Biol.* 5:1400-1407.
- Bunte, T., I. Greiser-Wülke, and K. Moelling. 1983. The transforming protein of the MC29-related virus CMII is a nuclear DNA-binding protein whereas MH2 codes for a cytoplasmic RNA-DNA binding polypeptide. *EMBO J.* 2:1087-1092.
- Calothy, G., F. Poirier, G. Dambine, P. Mignatti, P. Combes, and B. Pessac. 1980. Expression of viral oncogenes in differentiating chick embryo neuroretinal cells infected with avian tumor viruses. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 44:983-990.
- Coll, J., M. Righi, C. de Taisne, C. Dissous, A. Gégonne, and D. Stehelin. 1983. Molecular cloning of the avian acute transforming retrovirus MH2 reveals a novel cell-derived sequence (*v-mil*) in addition to the *myc* oncogene. *EMBO J.* 2:2189-2194.
- Flordellis, C. S., N. C. Kan, J. A. Lautenberger, K. P. Samuel, C. F. Garon, and T. S. Papas. 1985. Analysis of the cellular proto-oncogene *mht-raf*: relationship to the 5' sequences of *v-mht* in avian carcinoma virus MH2 and *v-raf* in murine sarcoma virus 3611. *Virology* 141:267-274.
- Foster, D. A., and H. Hanafusa. 1983. A *fps* gene without *gag* gene sequences transforms cells in culture and induces tumors in chickens. *J. Virol.* 48:744-751.
- Foster, D. A., M. Shibuya, and H. Hanafusa. 1985. Activation of the transformation potential of the cellular *fps* gene. *Cell* 42:105-115.
- Fukui, M., T. Yamamoto, S. Kawai, K. Maruo, and K. Toyoshima. 1985. Detection of a *raf*-related and two other transforming DNA sequences in human tumors maintained in nude mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:5954-5958.
- Galibert, F., S. Dupont de Dinechin, M. Righi, and D. Stehelin. 1984. The second oncogene *mil* of avian retrovirus MH2 is related to the *src* gene family. *EMBO J.* 3:1333-1338.
- Gazin, C., M. Rigolet, J. P. Briand, M. H. V. Van Regenmortel, and F. Galibert. 1986. Immunochemical detection of proteins related to the human *c-myc* exon 1. *EMBO J.* 5:2241-2250.
- Graham, F. L., and J. van der Eb. 1973. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52:456-461.
- Hu, S. S. F., C. Moscovici, and P. K. Vogt. 1978. The defectiveness of Mill-Hill-2, a carcinoma-inducing avian oncovirus. *Virology* 89:162-178.
- Iba, H., R. Jove, and H. Hanafusa. 1985. Lack of induction of neuroretinal cell proliferation by Rous sarcoma virus variants that carry the *c-src* gene. *Mol. Cell. Biol.* 5:2856-2859.
- Jansen, H. W., and K. Bister. 1985. Nucleotide sequence analysis of the chicken gene *c-mil*, the progenitor of the retroviral oncogene *v-mil*. *Virology* 143:359-367.
- Jansen, H. W., C. Trachmann, and K. Bister. 1984. Structural relationship between the chicken proto-oncogene *c-mil* and the retroviral oncogene *v-mil*. *Virology* 137:217-224.
- Kan, N. C., C. S. Flordellis, G. E. Mark, P. H. Duesberg, and T. S. Papas. 1984. A common *onc* gene sequence transduced by avian carcinoma virus MH2 and by murine sarcoma virus 3611. *Science* 223:813-816.
- Levy, J. B., H. Iba, and H. Hanafusa. 1986. Activation of the transforming potential of p60<sup>c-src</sup> by a single amino acid change. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:4228-4232.
- Moelling, K., B. Heimann, P. Beimling, U. R. Rapp, and T. Sander. 1984. Serine- and threonine-specific protein kinase activities of purified *gag-mil* and *gag-raf* proteins. *Nature (London)* 312:558-561.
- Mölders, H., J. Defesche, D. Müller, T. I. Bonner, U. R. Rapp, and R. Müller. 1985. Integration of transfected LTR sequences into the *c-raf* proto-oncogene: activation by promoter insertion. *EMBO J.* 4:693-698.
- Ng, M., and M. L. Privalsky. 1986. Structural domains of the avian erythroblastosis virus *erbB* protein required for fibroblast transformation: dissection by in-frame insertional mutagenesis. *J. Virol.* 58:542-553.
- Pessac, B., and G. Calothy. 1974. Transformation of chick embryo neuroretinal cells by Rous sarcoma virus *in vitro*: induction of cell proliferation. *Science* 175:898-900.
- Prywes, R., J. G. Foulkes, and D. Baltimore. 1985. The minimum transforming region of *v-abl* is the segment encoding protein-tyrosine kinase. *J. Virol.* 54:114-122.
- Prywes, R., J. G. Foulkes, N. Rosenberg, and D. Baltimore. 1983. Sequences of the A-MuLV protein needed for fibroblast and lymphoid cell transformation. *Cell* 34:569-579.
- Rapp, U. R., M. D. Goldsborough, G. E. Mark, T. I. Bonner, J. Groffen, F. H. Reynolds, Jr., and J. R. Stephenson. 1983. Structure and biological activity of *v-raf*, a unique oncogene transduced by a retrovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:4218-4222.
- Schimizu, K., Y. Nakatsu, M. Sekiguchi, K. Hokamura, K. Tanaka, M. Terada, and T. Sugimura. 1985. Molecular cloning of an activated human oncogene, homologous to *v-raf*, from primary stomach cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:5641-5645.
- Shaw, J., M. J. Hayman, and P. J. Enrietto. 1985. Analysis of a deleted MC29 provirus: *gag* sequences are not required for fibroblast transformation. *J. Virol.* 56:943-950.
- Sodroski, J. G., W. C. Goh, and W. A. Haseltine. 1984. Transforming potential of a human proto-oncogene (*c-fps/fes*) locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3039-3043.
- Stone, J. C., T. Atkinson, M. Smith, and T. Pawson. 1984. Identification of functional regions in the transforming protein of Fujinami sarcoma virus by in-phase insertion mutagenesis. *Cell* 37:549-558.
- Suttrave, P., T. I. Bonner, U. R. Rapp, H. W. Jansen, T. Patschinsky, and K. Bister. 1984. Nucleotide sequence of avian retrovirus oncogene *v-mil*: homologue of murine retroviral oncogene *v-raf*. *Nature (London)* 309:85-88.
- Wheeler, E. F., M. F. Roussel, A. Hampe, M. H. Walker, V. A. Fried, A. T. Look, C. W. Rettenmier, and C. J. Scherr. 1986. The amino-terminal domain of the *v-fms* oncogene product includes a functional signal peptide that directs synthesis of a transforming glycoprotein in the absence of feline leukemia virus *gag* sequences. *J. Virol.* 59:224-233.



## Two Nuclear Oncogenic Proteins, P135<sup>gag-myb-ets</sup> and p61/63<sup>myc</sup>, Cooperate To Induce Transformation of Chicken Neuroretina Cells

PHILIPPE AMOUYEL,\* VINCENT LAUDET, PATRICK MARTIN,† RUOPING LI, BRIGITTE QUATANNENS, DOMINIQUE STÉHELIN, AND SIMON SAULE‡

*Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U 186, Centre National de la Recherche Scientifique, URA 0156, Institut Pasteur de Lille, 1, rue A. Calmette, 59019 Lille Cedex, France*

Received 23 February 1989/Accepted 20 April 1989

Several studies have shown that full transformation of primary rodent fibroblasts can be achieved *in vitro* through the cooperation of two oncogenes (usually one nuclear and one cytoplasmic) classified on the basis of different complementation groups. We have shown previously that cooperation between *v-mil* (cytoplasmic, serine-threonine kinase product), and *v-myc* (nuclear, DNA-binding product) is required to transform 7-day-old chicken neuroretina cells, which in usual culture medium do not rapidly proliferate. *v-mil* induces sustained growth of chicken neuroretina cells without transformation; *v-myc* fails to stimulate the proliferation of chicken neuroretina cells but is required to achieve transformation of the proliferating cells. Here, we present results indicating that the P135<sup>gag-myb-ets</sup> nuclear protein of avian erythroblastosis virus E26 is able to induce proliferation but not transformation of chicken neuroretina cells. *v-myc* is required in addition to P135<sup>gag-myb-ets</sup> to achieve chicken neuroretina cell transformation. In contrast, we found that the P135<sup>gag-myb-ets</sup> and P100<sup>gag-mil</sup> proteins are not able to cooperate in this system.

Several lines of evidence suggest that cell proliferation and differentiation are controlled by an intricate network of biochemical pathways extending from the cell membrane to the nucleus (4). Oncogene products control key positions along these pathways; they are able to act as growth factors, growth factor receptors, transducing agents, or nuclear products. Nuclear oncogene products may have the power to substantially increase the replication potential of infected cells *in vitro* (3, 34).

The E26 retrovirus contains the *v-myb-ets* sequence fused in the same reading frame with the residual *gag* sequence (19, 26). A unique 5.7-kilobase genomic RNA encodes a 135-kilodalton *gag-myb-ets* protein located in the nucleus (17). After infection with E26, chickens develop mixed leukemias involving both myeloid and erythroid lineages (23, 30). *In vitro*, this virus may transform bipotent uncommitted hematopoietic cells, as well as myeloid and erythroid progenitor cells (24, 30). E26 also increases the life span of infected chicken fibroblasts but is unable to transform these cells (16).

The *v-myc* oncogene is the major transforming gene found in MH2. This viral oncogene is encoded by a subgenomic RNA as a nuclear protein (6). *v-myc* is also found in three other independent virus isolates (MC29, OK10, and CMII) (32). These four viruses transform macrophages and fibroblasts in culture (15). The other cell-derived sequence contained in the MH2 virus, *v-mil*, is responsible for an increase of the oncogenic potential of MH2 when compared with that of MC29. *v-mil* also induces the proliferation of chicken neuroretina (CNR) cells (2, 21). The protein encoded by *v-mil* from a genomic size RNA contains an associated serine-threonine kinase activity and is located in the cytoplasm (22).

We have constructed a recombinant virus, MHE226, expressing the E26 P135<sup>gag-myb-ets</sup> nuclear protein from a genomic RNA and the MH2 *v-myc*-encoded nuclear protein (p61/63<sup>myc</sup>) from a subgenomic RNA. In this study, we present evidence that after infection with E26, CNR cells are induced to proliferate but are not transformed. Following infection with MHE226, CNR cells proliferate and become tumorigenic in young chickens. In addition, we demonstrate that the P135<sup>gag-myb-ets</sup> and the P100<sup>gag-mil</sup> proteins are not able to cooperate in CNR cell transformation.

### MATERIALS AND METHODS

**Viruses and molecular clones.** The XSK provirus results from a *XhoII-SphI* deletion leading to the inactivation of the *mil* oncogene in the MH2 provirus (8, 9). MHE226 results from the substitution of the *BamHI-HpaI gag-mil* fragment of the pMH2-Hd DNA by the *BamHI-StuI gag-myb-ets* fragment from the  $\lambda$ E26 Q1 provirus (19). This virus should express P135<sup>gag-myb-ets</sup> through a genomic mRNA and p61/63<sup>myc</sup> from a subgenomic spliced mRNA. MHE226 $\Delta$ ETS results from the substitution of the *BamHI-HpaI gag-mil* fragment of the pMH2-Hd DNA by the *BamHI-HpaI gag-myb-ets* fragment from the  $\lambda$ E26 Q1 provirus.

The viruses used were obtained by cotransfection of DNA from the molecular clones depicted in Fig. 1 with Rous-associated virus type 1 (RAV-1) DNA into quail embryo cells, as previously reported (2), for MHE226, XSK, and MC29. E26 pseudotyped with E26AV was a gift from P. Jurdic.

**Cell culture, growth assay, and soft-agar cloning.** Neuroretinas were dissected from 7-day-old chicken embryos (2). Dishes (diameter, 60 mm) containing  $5 \times 10^6$  dissociated cells were infected with various viruses in Eagle basal medium supplemented with 10% fetal calf serum at 37°C. The infected and uninfected cells were passaged four times to allow virus spreading. Cells were then seeded on collagen-coated dishes. CNR E26 cells were superinfected by MH2-PA200 (ring-necked pheasant virus) after 15 passages. These

\* Corresponding author.

† Present address: Laboratory of Cellular Oncology, National Cancer Institute, Bethesda, MD 20892.

‡ Present address: School of Medicine CRI M-1282, University of California, San Francisco, CA 94143.

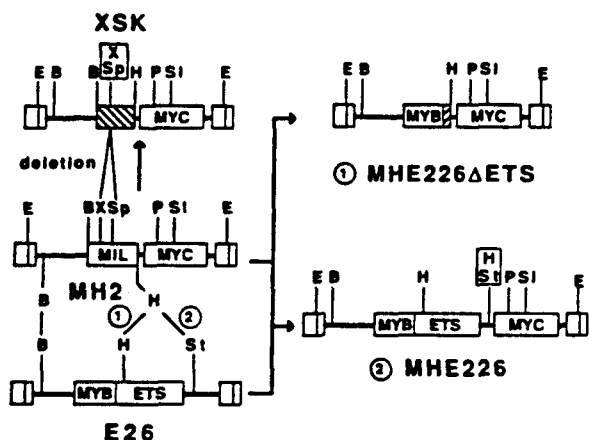


FIG. 1. Molecular clones used. B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; H, *Hpa*I; P, *Pvu*II; S, *Sal*I; Sp, *Sph*I; St, *Stu*I; X, *Xho*I. □, Long terminal repeat; ▤, functional proviral oncogenes; □, nonfunctional oncogenes.

cells were then passaged three times more to allow virus spreading.

Some cells grown without collagen were fixed and stained with Giemsa blue, and representative areas were photographed at a magnification of  $\times 40$ .

To study the growth kinetics of virus-infected CNR cells,  $1 \times 10^5$  cells were seeded in 35-mm-diameter collagen-coated dishes in 10% fetal calf serum and  $2 \times 10^5$  cells were seeded in medium containing 1% fetal calf serum. Medium was renewed daily, and cells from two dishes were counted. Then,  $10^5$  cells of each type were seeded in 4 ml of soft-agar-containing medium (Eagle basal medium, 10% fetal calf serum, 0.7% agar). Colonies were observed 14 days later and were only found in MHE226-infected cells.

**In vivo tumorigenicity assay.** Infected cells were suspended at the desired concentration in 100  $\mu$ l of complete medium and injected in the wing webs of 1-day-old outbred chickens (Barrez Poultry). In some cases, chickens were similarly injected intraperitoneally.

For the chorioallantoid membrane (CAM) assay, eggs were prepared by the method of Poste and Flood (29). Briefly, after the host eggs had been incubated for 10 days, the blunt end was pierced and a small window was opened in the shell overlaying the CAM; removing the air from the air chamber created a pseudo-chamber, and  $10^6$  cells were layered in 100  $\mu$ l of complete medium onto the surface of the CAM. The window was sealed with Micropore tape, and the eggs were horizontally incubated for an additional week. At that time, the shell was opened and the CAM was removed and rinsed in phosphate-buffered saline (PBS). Tumors were detected by macroscopic examination, and samples were dissected out, fixed with 3.7% paraformaldehyde in PBS, and processed for histological examination.

**Cell labeling and immunoprecipitation analyses.** Infected CNR cells were incubated for 45 min in the presence of 30  $\mu$ Ci of [ $^{35}$ S]methionine (specific activity, 1,000 Ci/mmol) per ml., lysed, and immunoprecipitated as described previously (2). Sera used included preimmune rabbit serum, rabbit anti-*ets* serum (14), rabbit anti-*myc* serum (13), and rabbit anti-*gag* serum. Immunoprecipitated proteins were analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis followed by fluorography.

**Immunofluorescence study.** Uninfected or virus-infected CNR cells cultured on collagen-coated 12-mm microscope

cover slips were fixed for 20 min with 3.7% paraformaldehyde in PBS and then treated 20 min at 4°C with 150 mM ethanolamine (pH 7.5), rinsed, and permeabilized with 0.15% Triton X-100 in PHEM (60 mM piperazine diethylsulfonic acid, 25 mM hydroxyethylpiperazine-*N*-1,2-ethanesulfonic acid, 10 mM EGTA [ethylene glycol-bis( $\beta$ -aminoethyl ether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid], 2 mM  $MgCl_2$  [pH 6.9]) for 1 min. To stain actin cables, cells were incubated with methanol-reconstituted nitrobenzoxadiazole-labeled phalloidin (Molecular Probes, Inc.) (1/20) in PBS for 30 min and then washed in PBS. With 3A7 (1/200), anti-vimentin (1/200), or anti-*mil* (1/100) antibodies (2), cells were incubated for 1 h, washed in PBS, and stained for 30 min with fluorescein isothiocyanate-labeled second antibody. The same procedure was used with undiluted supernatant of monoclonal A2B5 (hybridoma cell line from the American Type Culture Collection) or anti-fibronectin antibodies (1/100) (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, Md.) but without Triton X-100 treatment of the cells.

Fluorescein isothiocyanate-labeled antibodies (Biosys) were as follows: fluorescein-labeled sheep anti-mouse antibodies were used with 3A7 and A2B5 antibodies; goat anti-rabbit antibody was used with anti-vimentin anti-fibronectin and anti-*mil* antibodies. After washing in PBS, cells were mounted in glycerol and examined with a Zeiss IM 35 fluorescence microscope at  $\times 416$  magnification.

## RESULTS

Dissociated CNR cells from 7-day-old chicken embryos contain neuroepithelial cells from glial and neuronal lineages, as well as postmitotic neurons (10, 18). CNR cells were plated in Eagle basal medium containing 10% fetal calf serum and were infected with retroviruses produced from molecular clones (Fig. 1 and MC29) pseudotyped with RAV-1 helper virus or with E26 pseudotyped with its natural helper E26AV. We have also used the supernatant from myeloid cells infected with the virus produced from a molecular clone of E26 with similar results. Infection of CNR with E26 resulted in the appearance of actively dividing elongated cells (doubling time of ca. 26 h) after four passages (within 20 days). The infected cells could be subcultured for at least 20 generations (Fig. 2A, panel d, and Fig. 2B). These cells were morphologically normal and did not display anchorage-independent growth properties (Table 1). When CNR cells were infected with XSK (MH2 mutant deleted in the *mil* gene; Fig. 1) or MC29 viruses and cultured by using similar conditions, numerous dense foci of epithelium-like cells were observed. These foci were isolated in the culture dish and were clearly distinct from normal cells (Fig. 2A, panels b and c). The cells of the foci displayed no proliferating properties or cloning capacity when tested in soft agar (Table 1). These cells could not be propagated through more than five passages, even on collagen-coated dishes.

Striking results were obtained when CNR cells were infected with MHE226 virus which contains the *myc* oncogene of MH2 in addition to the *gag-myb-ets* oncogene of E26 (Fig. 1). Infected cultures displayed foci of morphologically transformed cells (Fig. 2A, panel e) after only two passages. These cells exhibited a strong proliferative capacity (Fig. 2B: doubling time of ca. 13 h) and induced numerous large colonies in soft agar (more than 200 cells per colony; Fig. 2A, panel f, and Table 1). In addition, MHE226 CNR cells showed marked morphological changes; they were much smaller and markedly less adherent than E26-, XSK-, or

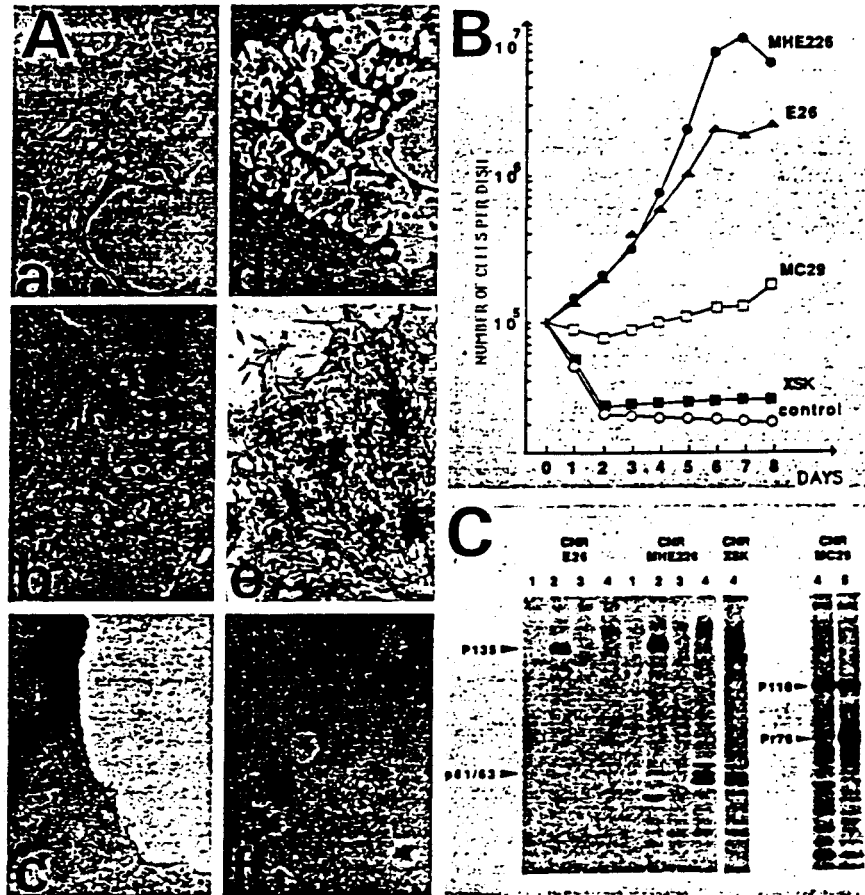


FIG. 2. (A) Microphotographs of virus-infected neuroretina cells after four passages: normal CNR cells (a); XSK- (b), MC29- (c), E26- (d), and MHE226- (e) infected CNR cells; and soft-agar colonies induced by MHE226-infected CNR (f). Magnification,  $\times 40$ . (B) Growth kinetics of virus-infected CNR cells. Results for XSK- and MC29-infected and control (uninfected) cells are after 4 passages, and results for E26- and MHE226-infected cells are after 11 passages. (C) Analysis of viral proteins in CNR cells. Sera used were as follows: lanes 1, *ets* preimmune rabbit serum; lanes 2, rabbit anti-*ets* serum (14); lanes 3, *myc* preimmune rabbit serum; lanes 4, rabbit anti-*myc* serum; lane 5, rabbit anti-*gag* serum (13). Cell types used are listed across the top.

MC29-infected cells. After four passages, MHE226 CNR cells were cultured on collagen-coated dishes. Only in these conditions could MHE226 CNR cells be subcultured for more than 20 generations.

To determine whether the P135<sup>*gag-myb-ets*</sup> product was expressed in proliferating CNR cells infected with E26 or MHE226, cells were labeled with [<sup>35</sup>S]methionine and immunoprecipitated with anti-*v-ets* antibodies (Fig. 2C, lanes 2) (14). These lysates, as well as lysates of CNR cells infected with XSK or MC29 viruses, were immunoprecipitated with anti-*v-myc* antibodies (Fig. 2C, lanes 4) (13). The

levels of P135<sup>*gag-myb-ets*</sup> (Fig. 2C) expressed by E26 and MHE226 CNR cells were comparable to those of E26-transformed hematopoietic cells and much higher than those of E26-infected fibroblasts (16). The amounts of p61/63<sup>*myc*</sup> and P110<sup>*gag-myc*</sup> present in XSK- and MC29-infected CNR cells were comparable to the amount present in infected fibroblasts. In addition, we localized p61/63<sup>*myc*</sup> and P135<sup>*gag-myb-ets*</sup> in MHE226-infected cells by immunofluorescence experiments and subcellular fractionation (data not shown). Antisera against *v-myc* proteins stained nuclei. The p61/63<sup>*myc*</sup> proteins were also found in the nuclear compartment by using immunoprecipitation techniques. P135<sup>*gag-myb-ets*</sup> could not be detected by immunofluorescence with our anti-*v-ets* antibodies, but this protein was immunoprecipitated by subcellular fractionation in the nucleus of MHE226 CNR cells (data not shown).

Since only MHE226 CNR cells appeared transformed, we tested MHE226-, E26-, and MC29-infected CNR cells for several transformation parameters. The alterations in cell morphology and in potential for cell proliferation correlate with changes in the extracellular matrix and cytoskeletal proteins. A loss of ordered actin-containing microfilaments and a reduction in the amount of cell surface fibronectin are frequently observed in virus-transformed cells (11, 27).

TABLE 1. Transformation-related changes in CNR cells

Cell treatment	Induction of cell proliferation <sup>a</sup>	Colony formation in semi-solid medium for 10 <sup>5</sup> cells	Loss of fibronectin network <sup>b</sup>	% of cells without actin cables
None	-	0	-	0
MC29	-	0	-	36
E26	+	0	-	25
MHE226	+	3,050	+	100

<sup>a</sup> -, No induction; +, induction.

<sup>b</sup> +, Network was lost; -, network remained intact.

Actin, vimentin, and glial intermediate filaments are found in neuroretina cells (18). Immunocytochemical techniques were used to determine whether changes in cytoskeletal proteins occur in E26-, MHE226-, and MC29-infected CNR cells. Cultures infected with E26 (Fig. 3g) or MC29 (Fig. 3d) contained few cells without actin cables (25 and 36%, respectively) relative to normal cells (Table 1); however, MHE226 cultures exhibited no staining with actin antibodies (data not shown) or with NBD-labeled phalloidin (Fig. 3j). Furthermore, MHE226-transformed CNR cells completely lacked the fibronectin network (Fig. 3k) yet exhibited an almost normal pattern of vimentin and glial intermediate filaments (Fig. 3o and p). Thus, MHE226-infected CNR cells exhibited a transformed phenotype while CNR cells infected with E26 or MC29 appeared closer to normal.

To test whether MHE226-infected cells could be tumorigenic in chickens, we transfected MHE226 without RAV-1 DNA into CNR cells. Nonproducing transformed cells were propagated for 18 passages and then injected ( $1.8 \times 10^7$  cells) in the wing web or in the peritoneal cavity of 1-day-old chickens. After 1 week, tumors were found at the injection site, and animals were sacrificed 1 week later. Four out of five animals injected in the wing web developed large tumors, and three out of five injected intraperitoneally developed tumors. MHE226 provirus was found by Southern blot analysis in the DNA of the three different tumors tested (data not shown). No tumor was found outside of the injection areas, and the liver, lungs, and kidneys were found normal by macroscopic examination. Additional experiments were also performed with CNR cells infected with E26 RAV-1, MHE226 RAV-1, and MHE226 $\Delta$ ETS RAV-1, an in vitro deletion mutant lacking most of the *ets* sequences. This last virus is able to induce CNR cell proliferation and direct the synthesis of the expected P90<sup>gag-myb- $\Delta$ ets</sup> fusion protein in transfected or infected cells (Fig. 4A). All 12 animals injected with  $3 \times 10^6$  MHE226 RAV-1 CNR cells produced tumors at the injection site within 15 days. All birds injected with the same amount of E26 CNR cells developed leukemias without solid tumors in 1 month or longer. In addition, no bird injected with MHE226 $\Delta$ ETS developed solid tumors. Since immunological rejection could occur in animals, we performed additional experiments to compare the ability of these infected CNR cells to induce tumors in the chorioallantoic membrane from 11-day-old chicken embryos. Again, only MHE226 CNR cells (productive or nonproductive cells) were found able to induce tumors in this assay (Fig. 4B and C).

Since E26 CNR cells proliferate, we analyzed whether the E26 nuclear product, P135<sup>gag-myb-ets</sup>, could at least in part overcome growth factor dependence (Fig. 5). E26 CNR cells, seeded in low-serum medium containing 1% fetal calf serum, exhibited active proliferation with a doubling time similar to that observed when a medium containing 10% fetal calf serum was used. MHE226-transformed cells plated in low-serum medium adhered to collagen-coated dishes and grew efficiently but with a doubling time of ca. 26 h compared with ca. 13 h in medium containing 10% fetal calf serum. Thus, P135<sup>gag-myb-ets</sup> can lower the requirement for growth factors in rapidly dividing MHE226 CNR cells. MC29 CNR cells died a few hours after seeding in low-serum medium.

Because seemingly normal CNR cells could be induced to proliferate by the *v-mil* oncogene, it was of particular interest to know whether the P100<sup>gag-mil</sup> and P135<sup>gag-myb-ets</sup> could cooperate in CNR cell transformation. Superinfection of E26 CNR cells with MH2-PA200 (21), pseudotyped with

RPV, induced slight changes in cell morphology after three passages; cells appeared more fusiform than E26 CNR cells or E26 CNR cells superinfected with RPV alone. However, the growth rate and the inability to grow in soft agar were not modified whereas most, if not all, of the superinfected cells exhibited significant amounts of P100<sup>gag-mil</sup>, as shown by immunoprecipitation and immunofluorescence experiments using anti *v-mil* antibodies (Fig. 5A through D). To exclude the possibility that E26 CNR cells were selected from cells insensitive to P100<sup>gag-mil</sup>, we reversed the infection superinfection protocol: superinfection of MH2-PA200 CNR cells (RAV-1) with E26 pseudotyped with RPV induced the same slight changes in cell morphology (data not shown). In all these experiments, effective infection was controlled by immunoprecipitation assay. Thus, these two oncogene products, each able to induce CNR cell proliferation and located in different subcellular compartments, were not able at least in these cells to achieve CNR cell transformation together.

We partially characterized the lineage of E26 and MHE226 CNR cells. Cells from 7-day-old chicken embryos can give rise to neuronal, glial, and progenitor cells of both lineages (10, 18). Virus-infected cells were characterized for the expression of tissue-specific antigens, including a tetrasialoganglioside present on neural cells recognized by monoclonal A2B5 antibodies (12), intermediate filament of glial cells recognized by monoclonal 3A7 antibodies (18), and synthesis of acetylcholine (33). CNR cells transformed with MHE226 expressed A2B5 antigen similarly to MC29-infected CNR cells (Fig. 3l and f). E26-infected CNR cells expressed this antigen only faintly; 1% of the cells reacted strongly with this monoclonal antibody (Fig. 3i). However, normal CNR cells expressed this marker only faintly after four passages (Fig. 3c), suggesting that A2B5-positive cells were maintained in the culture by the viral oncogene product. All infected or normal CNR cells expressed 3A7 glial intermediate filaments (Fig. 3n and p and data not shown). E26-infected CNR cells synthesized greater amounts of acetylcholine than normal cells, but only low levels were detected in MHE226 CNR cells (M. Fauquet, unpublished data). These observations suggest that cells of both neuronal and glial lineages were induced to proliferate after infection with these viruses.

## DISCUSSION

In the study presented here, we investigated the effect of E26 P135<sup>gag-myb-ets</sup> nuclear protein in CNR cells, alone or together with the p61/63<sup>myc</sup> product from MH2. As reported for chicken embryo fibroblasts (16), E26 does not induce the expression of the usual features associated with transformation (Table 1). E26-infected cells did not show anchorage-independent growth, disorganized actin microfilaments, or loss of fibronectin network. However, in contrast to normal or control RAV-1-infected CNR cells, E26 CNR cells were able to grow both for at least 20 generations in culture and at low cell density in low-serum medium. Similar results have been obtained in chicken embryo fibroblasts infected with E26, which exhibited increased proliferation in vitro and maintained long-term growth in low-serum medium (16). In contrast, in other cell systems, chicken myeloid cells transformed by E26 are still dependent on chicken myelomonocytic growth factor (20) to proliferate. Thus, the effect of P135<sup>gag-myb-ets</sup> on growth factor dependence is probably governed by genetic differences between the cell systems used.

MC29-transformed chicken fibroblasts have been shown to lack the ability to proliferate when cultured in medium

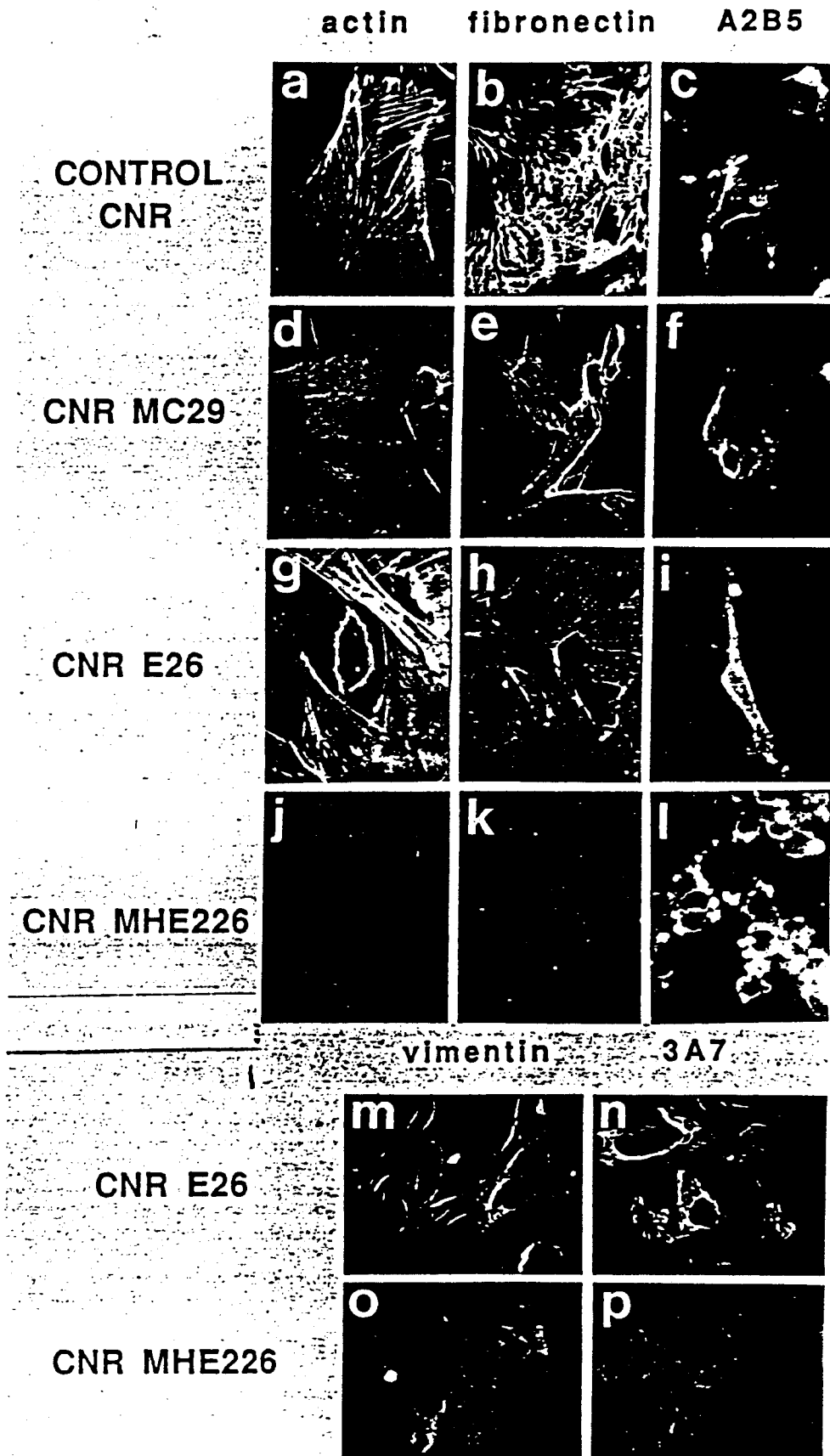


FIG. 3. Immunofluorescent visualization of actin, fibronectin, neural antigen A2B5, vimentin, and 3A7 glial intermediate fragments in normal and virus-infected CNR cells. Cells were stained after 4 (a through f) or 15 (g through p) passages. Staining was done with NBD-labeled phalloidin (actin), with an anti-fibronectin antibody (fibronectin), with a monoclonal A2B5 antibody (A2B5), with a polyclonal anti-vimentin antibody (vimentin), or with a monoclonal 3A7 antibody (3A7). Magnification,  $\times 416$ .

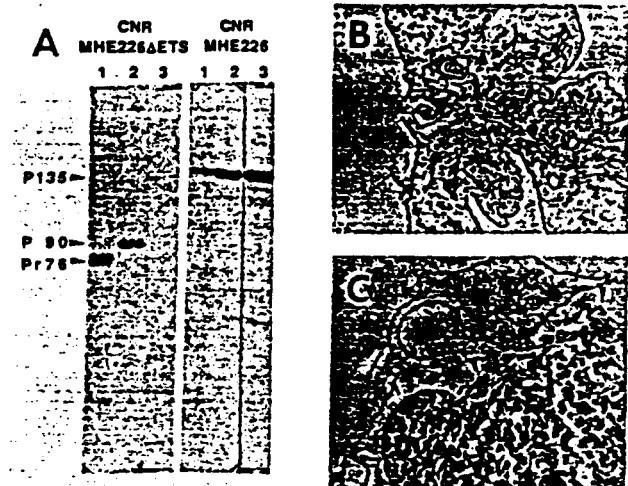


FIG. 4. Histological analysis of tumors developed on CAM. (A) Analysis of viral proteins in MHE226 $\Delta$ ETS and CNR MHE226NP. Sera used were as follows: lanes 1, rabbit anti-*gag* serum; lanes 2, rabbit anti-*myb* serum (5); lanes 3, rabbit anti-*ets* serum. (B and C) Inoculation of CAM with CNR cells infected with MHE226 $\Delta$ ETS RAV-1 (panel B) and CNR cells transfected with MHE226 (panel C). Arrowheads in panel C delineate the tumor found. The slides were stained with May Grünwald-Giemsa (RAL 555 kit). Magnification,  $\times 40$ .

containing a low concentration of serum (31). Chicken myeloid cells transformed by *v-myc* require growth factors to proliferate (1). The dependence of *v-myc*-infected myeloid cells could be abolished by several oncogene products, such as *v-src*-related tyrosine kinases and *v-mil* (but neither *v-myb* nor the *v-gag-myb-ets*) (1). However, the effect of oncogenes on growth factor dependence varies with the cell systems used, since chicken embryo fibroblasts infected by MH2 decrease in number and die in medium containing 1% serum, whereas *v-mil* containing MH2-PA200-infected fibroblasts are able to grow in such culture conditions (28). These results suggest that *v-myc*-infected chicken cells are dependent on serum factors for survival and that in MHE226 CNR cells, P135<sup>*gag-myb-ets*</sup> overcomes this requirement.

Jurdic et al. (16) proposed that E26 P135<sup>*gag-myb-ets*</sup> could induce either cell growth activation or cell transformation, according to its level of expression. Our results are not in agreement with this proposal, since high levels of P135<sup>*gag-myb-ets*</sup> only induced CNR cell proliferation, not transformation. Transformation was achieved by addition of the *v-myc* oncogene. Therefore, cooperation of two retrovirus-encoded oncogenic proteins, both located in the nucleus, was found to operate in CNR cells, in contrast to the previously reported systems (3, 34). Since the *v-myc* oncogene alone was found able to induce CNR cell proliferation and transformation in complex culture conditions (7), P135<sup>*gag-myb-ets*</sup> could mimic such culture conditions, allowing transformation through *v-myc*.

The P100<sup>*gag-mil*</sup> product induces CNR cell proliferation. However, the P135<sup>*gag-myb-ets*</sup> and P100<sup>*gag-mil*</sup> proteins do not cooperate in CNR cell transformation. This could suggest that *gag-myb-ets* and *mil* oncogene products may act on the same cellular pathway to induce CNR cell proliferation.

Although the mechanisms through which the nuclear p61/63<sup>*myc*</sup> and P135<sup>*gag-myb-ets*</sup> proteins operate are unknown, the observation that these two proteins are able to cooperate in the conversion of CNR cells into tumorigenic cells sug-

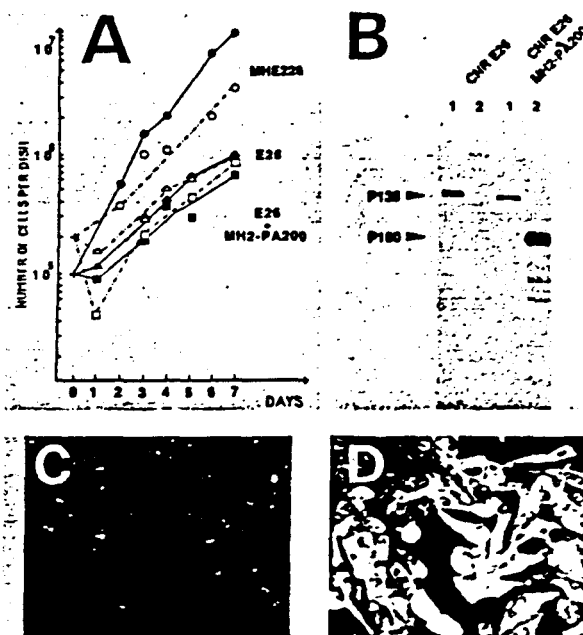


FIG. 5. (A) Growth kinetics of virus-infected CNR cells in medium containing 10% (closed symbols) or 1% (open symbols) fetal calf serum.  $\bullet$ ,  $\circ$ , MHE226;  $\blacktriangle$ ,  $\triangle$ , E26;  $\blacksquare$ ,  $\square$ , E26+MH2-PA200. (B) Analysis of viral proteins in CNR E26RAV-1 superinfected by MH2-PA200RPV virus. Lane 1, rabbit-anti *ets* serum (14); lane 2, rabbit-anti *mil* serum (2). (C and D) Analysis of viral proteins in CNR E26 RAV-1 superinfected by MH2-PA200 RPV virus by immunofluorescence studies. Panel C, CNR E26 RAV-1; panel D, CNR E26 superinfected by MH2-PA200 RPV; cells were stained with anti-*mil* antibodies as described in Materials and Methods. Magnification,  $\times 150$ .

gests that the proteins work through different mechanisms. This was also suggested from experiments conducted with E26 and MC29 in the hematopoietic system (25) which suggested a *v-myb* dominance over *v-myc* in doubly transformed chick myelomonocytic cells. A portion of P135<sup>*gag-myb-ets*</sup> encoded by the *ets* oncogene is essential to allow the cooperation between this oncogenic protein and the *myc* product, since MHE226 deleted in most of the *ets* sequences, MHE226 $\Delta$ ETS, is not able to transform CNR cells. However, this virus is still able to induce both CNR cell proliferation in vitro and hematopoietic disorders in infected birds. Results obtained on the cooperation between *myc* and several mutants of P135<sup>*gag-myb-ets*</sup> will be presented elsewhere.

The effect of the two nuclear proteins on CNR cell differentiation is not clear; A2B5 antigen, which quickly disappears from cultured normal CNR cells, is maintained in MC29- and MHE226-infected cells. Only 1% of the E26-infected cells retained the A2B5 antigen. Thus, the *myc* gene product could block the maturation of neuroretinal cells expressing A2B5 antigen. Alternatively, the *myc* gene product could induce the survival of a cell type which is not maintained in the culture conditions; such a cell type would be induced to proliferate in MHE226-transformed cells by the addition of the P135<sup>*gag-myb-ets*</sup> protein.

These, and previous, results demonstrate that CNR cells constitute a powerful system to detect *v-myc* cotransforming genes. This biological system could also reveal previously unexpected targets for oncogenes. In addition, CNR cells should be useful to define the relative importance of *myb* and

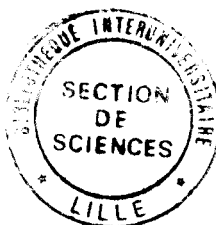
*ets* domains of P135<sup>gag-myb-ets</sup> in growth properties and in cooperation with *v-myc* to induce transformation.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank V. Lemmon for 3A7 monoclonal antibodies. A. Delacourte for anti-vimentin antibodies, J. Lipsick for anti-*myb* antibodies, J. Ghysdael for anti-*mil* antibodies, and R. Globus, M. Fauquet, J. Coll, and B. Vandebunder for critical reading of the manuscript. This work was supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Centre National de la Recherche Scientifique, Institut Pasteur de Lille, and Association pour la Recherche sur le Cancer.

#### LITERATURE CITED

- Adkins, B., A. Leutz, and T. Graf. 1984. Autocrine growth induced by *src*-related oncogenes in transformed chicken myeloid cells. *Cell* 39:439-445.
- Bechade, C., G. Calothy, B. Pessac, P. Martin, J. Coll, F. Denhez, S. Saule, J. Ghysdael, and D. Stéhelin. 1985. Induction of proliferation or transformation of neuroretina cells by the *mil* and *myc* oncogenes. *Nature (London)* 316:559-562.
- Bishop, J. M. 1985. Viral oncogenes. *Cell* 42:23-38.
- Bishop, J. M. 1987. The molecular genetics of cancer. *Science* 235:305-311.
- Boyle, W. J., J. S. Lipsick, E. P. Reddy, and A. M. 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.
- Bunte, T., P. Donner, E. Pfaff, B. Reis, I. Greiser-Wilke, H. Schaller, and K. Moelling. 1984. Inhibition of DNA binding of purified p55<sup>v-myc</sup> *in vitro* by antibodies against bacterially expressed *myc* protein and a synthetic peptide. *EMBO J.* 3:1919-1924.
- Casalbore, P., E. Agostini, S. Alema, G. Falcone, and F. Tato. 1987. The *v-myc* oncogene is sufficient to induce growth transformation of chick neuroretina cells. *Nature (London)* 326:188-190.
- Coll, J., C. Dozier, S. Saule, C. Henry, B. Quatannens, B. Debuire, and D. Stéhelin. 1988. Mapping by *in vitro* constructs of the P100<sup>gag-mil</sup> region, accounting for induction of chicken neuroretina cell proliferation. *J. Virol.* 62:2808-2816.
- Coll, J., M. Righi, C. de Taisne, C. Dissous, A. Gégonne, and D. Stéhelin. 1983. Molecular cloning of the avian acute transforming retrovirus MH2 reveals a novel cell-derived sequence (*v-mil*) in addition to the *myc* oncogene. *EMBO J.* 2:2189-2194.
- Crisanti-Combes, P., A. M. Lorinet, A. Girard, B. Pessac, M. Wasseff, and G. Calothy. 1982. Expression of neuronal markers in chick and quail embryo neuroretina cultures infected with Rous sarcoma virus. *Cell Differ.* 11:45-54.
- Edelman, G. M., and I. Yahara. 1976. Temperature sensitive changes in surface modulating assemblies of fibroblasts transformed by mutants of RSV. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73:2047-2051.
- Eisenbarth, G. S., F. S. Walsh, and M. Nirenberg. 1979. Monoclonal antibody to a plasma membrane antigen of neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:4913-4917.
- Ferré, F., P. Martin, A. Bègue, J. Ghysdael, S. Saule, and D. Stéhelin. 1986. Préparation et caractérisation d'antisera spécifiques dirigés contre différents domaines polypeptidiques codés par l'oncogène *c-myc* humain pour étudier l'expression de ce gène introduit dans des cellules de caille ou de rat. *C. R. Acad. Sci.* 303:633-636.
- Gégonne, A., D. Leprince, P. Pognonec, D. Dernis, M. B. Raes, D. Stéhelin, 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.
- 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.
- Jurdic, P., M. Benchaïbi, 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.
- Klemmner, 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-myc* gene. *Cell* 37:537-547.
- Lemmon, V. 1985. Monoclonal antibodies specific for glia in the chick nervous system. *Dev. Brain Res.* 23:111-120.
- Leprince, D., A. Gégonne, J. Coll, C. de Taisne, A. Schneberger, C. Lagrou, and D. Stéhelin. 1983. A putative second cell-derived oncogene of the avian leukemia retrovirus E26. *Nature (London)* 306:395-397.
- Leutz, A., H. Beug, and T. Graf. 1984. Purification and characterization of cMGF, a novel chicken myelomonocytic growth factor. *EMBO J.* 3:3191-3197.
- Martin, P., C. Henry, F. Denhez, P. Amouyel, C. Bechade, G. Calothy, B. Debuire, D. Stéhelin, and S. Saule. 1986. Characterization of a MH2 mutant lacking the *v-myc* oncogene. *Virology* 153:272-279.
- Moelling, K., B. Heimann, P. Beimling, U. R. Rapp, and T. Sander. 1984. Serine- and threonine-specific protein kinase activities of purified *gag-mil* and *gag-raf* proteins. *Nature (London)* 312:558-561.
- Moscovici, C., J. Samarut, L. Gazzolo, and M. G. Moscovici. 1981. Myeloid and erythroid neoplastic responses to avian defective leukemia viruses in chicken and in quail. *Virology* 113:765-768.
- Moscovici, M. G., P. Jurdic, J. Samarut, L. Gazzolo, C. V. Mura, and C. Moscovici. 1983. Characterization of the hemopoietic target cells for the avian leukemia virus E26. *Virology* 129:65-78.
- Ness, A. N., H. Beug, and T. Graf. 1987. *v-myb* dominance over *v-myc* in doubly transformed chick myelomonocytic cells. *Cell* 51:41-50.
- 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.
- Palmieri, S., P. Kahn, and T. Graf. 1983. Quail embryo fibroblasts transformed by four *v-myc*-containing virus isolates show enhanced proliferation but are non tumorigenic. *EMBO J.* 2:2385-2389.
- Palmieri, S., and M. L. Vogel. 1987. Fibroblast transformation parameters induced by the avian *v-mil* oncogene. *J. Virol.* 61:1717-1721.
- Poste, G., and M. K. Flood. 1979. Cells transformed by temperature-sensitive mutants of avian sarcoma virus cause tumors *in vivo* at permissive and nonpermissive temperatures. *Cell* 17:789-800.
- 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.
- Royer-Pokora, B., H. Beug, M. Claviez, H.-J. Winkhardt, R. R. Friis, and T. Graf. 1978. Transformation parameters in chicken embryo fibroblasts transformed by AEV and MC29 avian leukemia viruses. *Cell* 13:751-760.
- Saule, S., J. Coll, M. Righi, C. Lagrou, M. B. Raes, and D. Stéhelin. 1983. Two different types of transcription for the myelocytomatosis viruses MH2 and CM11. *EMBO J.* 2:805-809.
- Smith, J., M. Fauquet, C. Ziller, and M. N. LeDouarin. 1979. Acetylcholine synthesis by mesencephalic neural crest cells in the process of migration *in vivo*. *Nature (London)* 282:853-855.
- Weinberg, R. A. 1985. The action of oncogenes in the cytoplasm and nucleus. *Science* 230:770-776.



## RESUME

De nombreuses études ont montré que la transformation de fibroblastes de rongeurs en culture primaire pouvait être obtenue, *in vitro*, par la coopération d'un oncogène à localisation nucléaire et d'un oncogène à localisation extranucléaire. La coopération des oncogènes *v-mil* (cytoplasmique) et *v-myc* (nucléaire) est nécessaire pour assurer la transformation de cellules de neurorétine d'embryon de Poulet de 7 jours en culture (CNR). *v-mil* induit une prolifération des CNR et *v-myc* transforme les CNR proliférantes.

Des mutants des oncogènes *v-myc* et *v-mil* ont été obtenus après l'infection de CNR à l'aide du rétrovirus MH2 (porteur des oncogènes *v-myc* et *v-mil*). Le clonage des mutants porteurs de l'oncogène *v-mil* a permis de montrer l'existence d'une recombinaison spontanée entre MH2 et son virus auxiliaire RAV-I. La construction de chimères entre *v-mil* et *v-myc* a permis d'établir l'importance de la région carboxyterminale dans la prolifération des CNR.

Dans les neurorétines aviaires en culture, deux types cellulaires sont présents : des cellules neuronales et des cellules épithéliales. Des phénomènes de transdifférenciation en cellules du cristallin et en cellules pigmentaires peuvent survenir. Nous avons étudié l'influence des oncogènes *v-mil* et *v-myc* sur les programmes de différenciation des cellules de neurorétine de Caille de 6 jours (QNR). Les cultures infectées par les virus porteurs de l'oncogène *v-mil* contiennent un pourcentage élevé de cellules d'origine neuronale qui meurent rapidement en l'absence d'infection. L'oncogène *v-myc* favorise une transdifférenciation majoritaire en cellules pigmentaires.

Nous avons testé l'effet d'autres oncogènes seuls ou en coopération sur les neurorétines. Nos résultats indiquent que la protéine oncogène P135 $gag$ - $myb$ - $ets$  à localisation nucléaire issue du virus E26 est susceptible d'induire la prolifération des C.N.R. et de coopérer dans la transformation avec une autre protéine oncogène à localisation nucléaire, la p61/63 $myc$ , démontrant ainsi que la coopération entre oncogènes nucléaires est possible et efficace.