

La coopération d'oncogènes dans la transformation cellulaire

J Samarut

*École normale supérieure de Lyon, laboratoire de biologie moléculaire et cellulaire,
CNRSUMR 49, 46 allée d'Italie, 69634 Lyon Cedex 07, France*

(15^e réunion du groupe Développement, INRA, Paris, 24–26 mai 1989)

Résumé — La transformation oncogène des cellules s'accompagne de modifications dans leur structure et leur physiologie (changements de morphologie, blocage de la différenciation, altérations du cytosquelette et de la matrice extracellulaire, dérèglements de la croissance). Ces modifications affectent à des degrés divers le comportement des cellules transformées, en culture ou *in vitro* : croissance anarchique indépendante des facteurs régulateurs externes, formation de tumeurs *in vivo*. Les modèles expérimentaux de la transformation reposent sur l'introduction et l'expression de séquences génétiques oncogènes dans des cellules cibles en culture ou *in vivo*. Les approches *in vivo* trouvent une extension nouvelle dans l'utilisation d'animaux transgéniques. Dans la plupart des modèles étudiés, la transformation complète de cellules primaires en cellules tumorales ou leucémiques nécessite l'intervention de plusieurs oncogènes qui agissent en coopération. Ces observations confirment les hypothèses faisant intervenir plusieurs événements génétiques dans le développement de cancers. Cependant, dans des tumeurs humaines spontanées, il n'a pas encore été possible d'identifier des ensembles coopératifs d'oncogènes, et les seuls oncogènes identifiés sont très peu diversifiés d'un type de tumeur à l'autre. Ces données conduisent à imaginer l'existence d'autres systèmes de gènes impliqués dans la transformation. Parmi ces gènes, pourraient se trouver des oncogènes récessifs ou anti-oncogènes, dont la fonction normale serait de réprimer la croissance, et dont l'inactivation pourrait contribuer à la transformation.

cancer / oncogène / tumeur / leucémie

Summary — **Oncogene cooperation in cell transformation.** *Oncogenic cell transformation induces major changes in the structure and physiology of the cells: modifications of morphology, differentiation block, disorganisation of cytoskeleton and extracellular matrix, alterations in growth control. The identification of oncogenes relies upon transfer into host normal cells of DNA isolated from cancer cells. The recent development of DNA transfer into germinal cells has provided new insights into the genetic control of tumorigenesis in vivo. In most cases, full transformation into leukemic or tumor cell requires the cooperation of several oncogenes. These observations support the hypothesis of cancer as a multistep process. However, many of the cooperative oncogenes have not yet been identified, especially in human cancers. The recent discovery of genes acting as repressors of cell growth in normal cells has brought to light a new class of potential recessive oncogenes that might have a contributory function in cancer development.*

cancer / oncogene / tumor / leukemia

INTRODUCTION

L'identification des proto-oncogènes dans les cellules normales, et de leurs formes mutées, les oncogènes dans les cellules ayant subi une transformation néoplasique, a fourni le point de départ de la génétique moléculaire de la cancérogenèse (Weinberg, 1985; Bishop, 1987). Il est vite apparu que la notion «un oncogène, un cancer» était simpliste, et que, conformément aux hypothèses émises à partir des travaux de génétique cellulaire, la transformation néoplasique résulte de la combinaison d'une multitude d'événements génétiques. Parmi ces événements, certains contribuent à modifier les caractères propres de la cellule, d'autres modifient l'environnement créé par l'organisme dans lequel cette cellule évolue. Dans cette revue nous nous intéresserons exclusivement aux événements qui prennent place dans une cellule normale pour l'amener à un stade potentiellement néoplasique. Nous n'analyserons pas les relations physiologiques entre ces cellules et l'organisme qui les héberge.

LES PARAMÈTRES DE LA TRANSFORMATION CELLULAIRE

Les cellules ayant subi une transformation oncogène présentent des modifications de leur morphologie, de leurs propriétés biochimiques et de leurs paramètres de croissance (Hanafusa, 1977; Royer-Pokora *et al*, 1978). Ces modifications peuvent atteindre des degrés variables selon la nature de l'agent transformant.

Les modifications morphologiques sont particulièrement évidentes sur les fibroblastes. Selon l'agent transformant, ces cellules s'arrondissent ou prennent une morphologie très filiforme, montrent une

réfringence accrue et une réduction de l'adhérence à un support. Ces modifications résultent d'altérations au niveau de la membrane, du cytosquelette et de la matrice extracellulaire (Royer-Pokora *et al*, 1978; Plantefaber et Hynes, 1989). A l'inverse de fibroblastes normaux qui, en culture, s'arrangent en faisceaux de cellules parallèles, les fibroblastes transformés ont tendance à s'empiler et à s'entrecroiser (Hanafusa, 1977). Les cellules non fibroblastiques présentent généralement les caractères morphologiques de cellules immatures dans leurs lignées respectives (Moscovici et Gazzolo, 1982).

Contrairement aux fibroblastes normaux, certains fibroblastes transformés ne présentent plus l'inhibition de contact et peuvent former des couches de cellules superposées. Ces cellules se multiplient souvent en milieu pauvre en sérum et acquièrent généralement la capacité de proliférer en suspension dans l'agar mou. Enfin certains fibroblastes transformés peuvent développer des cultures continues à l'inverse de fibroblastes normaux. Les cellules transformées non fibroblastiques présentent des modifications similaires de leurs caractères de croissance, encore que la capacité de proliférer en absence de support ne soit pas toujours, dans ce cas, un critère de transformation. La transformation se traduit dans ces cellules par un allongement considérable des potentialités de multiplication en culture et par une inhibition plus ou moins permanente de leur différenciation.

La transformation oncogène induit souvent des altérations dans le métabolisme de la cellule, telles que l'augmentation du transport intracellulaire de sucres ou d'acides-amino (White et Weber, 1988) et la sécrétion de protéases spécifiques de la matrice extracellulaire et des membranes basales. L'expression de ces protéases par les cellules transformées leur confère-

rait des propriétés invasives et métastatiques et leur permettrait de proliférer en absence de support d'ancrage (Liotta, 1986).

On peut distinguer 2 états principaux dans la transformation : l'état préneoplasique auquel les cellules présentent des altérations dans leur morphologie et dans le contrôle de leur prolifération, et un état néoplasique où les cellules acquièrent en plus la capacité à former des tumeurs ou des leucémies *in vivo*. Cette distinction est grossière et peut être affinée selon les modèles cellulaires considérés.

LES MODÈLES D'ÉTUDE DE LA TRANSFORMATION ONCOGÈNE

La voie la plus directe pour analyser le rôle de séquences génétiques dans la transformation oncogène consiste à introduire ces séquences dans des cellules normales ou pseudo-normales, et à analyser ensuite l'évolution de ces cellules en culture ou après leur réinsertion dans un organisme. Les différents modèles d'analyse utilisent, soit la transfection d'ADN dans des cellules en culture, soit le transfert de séquences génétiques au moyen de vecteurs rétroviraux dans des cellules en culture ou *in vivo*, soit le transfert d'ADN dans la lignée germinale pour la création d'animaux transgéniques.

Transfection d'ADN dans des cellules en culture

C'est par transfection sur les fibroblastes immortalisés 3T3 de souris qu'ont été identifiés les premiers oncogènes humains (synthèse dans Cooper, 1987).

Cette méthode est applicable exclusivement sur des cellules en culture, et présente plusieurs limitations. Tout d'abord,

au cours de la transfection, certains gènes peuvent subir des réarrangements qui leur confèrent une activité oncogène. La séquence oncogène ainsi modifiée n'est donc pas représentative de la situation qui existe dans les cellules ayant fourni l'ADN. Cette activation artificielle a permis cependant d'identifier des oncogènes potentiels dans l'ADN humain (Kozma *et al*, 1988; Takahashi et Cooper, 1987). D'autre part, la faible efficacité de la transfection limite beaucoup l'utilisation de cette technique sur des cellules peu représentées dans une population cellulaire hétérogène, comme par exemple les précurseurs hématopoïétiques.

Transformation par des rétrovirus

La limitation imposée par la faible efficacité du transfert d'ADN dans des cellules peut être levée par l'utilisation de vecteurs biologiques, parmi lesquels les rétrovirus semblent les plus performants. En fait, un certain nombre de ces virus constituent des vecteurs naturels de séquences oncogènes dérivées des proto-oncogènes (Bishop, 1985). Parmi les rétrovirus naturels, 3 rétrovirus aviaires véhiculent respectivement plusieurs oncogènes dans leurs génomes et constituent ainsi d'excellents outils pour analyser la coopération d'oncogène dans la transformation.

Le virus MH2 porte les oncogènes *v-myc* et *v-mil* qui codent respectivement pour une protéine *v-myc* nucléaire et une protéine fusion *gag-mil* qui est une sérine-thréonine kinase cytoplasmique (Coll *et al*, 1983). Ce virus induit des leucémies myéloïdes *in vivo* et transforme les précurseurs des macrophages *in vitro* (Moscovici et Gazzolo, 1982).

Le virus E26 renferme 2 séquences codantes fusionnées dérivant respectivement des proto-oncogènes *c-myc* et *c-ets1* (Le-

prince *et al*, 1983; Nunn *et al*, 1983). L'oncogène chimère formé par la transduction de ces 2 proto-oncogènes code pour une protéine fusion gag-myb-ets à localisation nucléaire. Le virus E26 induit des leucémies érythroïdes et myéloïdes *in vivo*. *In vitro*, il transforme des précurseurs myéloïdes ou érythroïdes et des précurseurs bipotents communs aux 2 lignées (Moscovici *et al*, 1983; Radke *et al*, 1982).

Le virus de l'érythroblastose aviaire, AEV, a transduit dans son génome 2 séquences oncogènes, respectivement *v-erbA* et *v-erbB*. La séquence *v-erbA* dérive du proto-oncogène *c-erbA* qui code pour un récepteur nucléaire de l'hormone thyroïdienne T3 (Sap *et al*, 1986; Weinberger *et al*, 1986). L'oncogène *v-erbB* dérive du proto-oncogène *c-erbB* qui code pour le récepteur membranaire des facteurs de croissance EGF et TGF α (Lax *et al*, 1988). Le virus code pour la protéine gag-*erbA* nucléaire qui est une forme altérée de récepteur nucléaire incapable de fixer l'hormone T3, et pour la protéine *v-erbB* qui ne fixe plus l'EGF ou le TGF α et qui délivre dans la cellule une activité tyrosine kinase constitutive. L'AEV induit des sarcomes et des érythroleucémies *in vivo*. En culture, il transforme les fibroblastes, des précurseurs des cellules érythrocytiques et des précurseurs des mastocytes (Graf et Beug, 1978; Gazzolo *et al*, 1980; Samarut et Gazzolo, 1982; Moscovici *et al*, 1989). Il constitue par conséquent un excellent outil pour analyser les rôles respectifs des hormones et des facteurs de croissance dans la transformation oncogène.

De très nombreux rétrovirus ont été construits artificiellement en recombinant dans leur génome diverses séquences testées pour leurs potentialités oncogènes (Mathey-Prévoit et Baltimore, 1988; Hariharan *et al*, 1988; Young et Witte, 1988; Compere *et al*, 1989; Browder *et al*, 1989; Johnson *et al*, 1989). Plusieurs oncogènes

peuvent être insérés dans un même génome rétroviral (Blasi *et al*, 1985; Bowtell *et al*, 1988). Dans certains cas d'infection par des rétrovirus, la transformation peut résulter, dans les cellules hôtes, de réarrangements du génome cellulaire dus à l'intégration du génome viral (Stocking *et al*, 1988; Morishita *et al*, 1988).

Le modèle des animaux transgéniques

La réalisation d'animaux transgéniques est une des approches les plus prometteuses pour analyser les potentialités oncogéniques de séquences génétiques, car l'ADN transféré se retrouve dans une configuration identique dans tous les tissus de l'hôte, permettant ainsi d'analyser les paramètres de la spécificité tissulaire dans la transformation (synthèse dans Hanahan, 1988). Un des intérêts de cette méthode est la possibilité d'analyser l'influence de facteurs génétiques sur le développement de cancers. Ainsi, le croisement de souris transgéniques portant respectivement les oncogènes *myc* et *ras* a permis d'analyser les effets coopératifs de ces 2 oncogènes dans les descendants (Andres *et al*, 1988; Sinn *et al*, 1987). Enfin, ce modèle permet d'analyser l'influence de facteurs environnants sur le développement de cancers *in vivo*.

LA COOPÉRATION D'ONCOGÈNES DANS LA TRANSFORMATION

Le concept de l'existence de plusieurs événements successifs dans le développement d'une cellule cancéreuse a été formulé initialement à partir des travaux sur la cancérogenèse chimique qui ont permis de définir les étapes d'initiation, de promotion et de progression de la transformation oncogène (Weinstein *et al*, 1982). Divers ar-

guments en faveur de cette théorie ont été apportés par la génétique moléculaire (Duesberg, 1987). En particulier, on peut estimer que la probabilité d'apparition d'un réarrangement ou d'une mutation dans un protooncogène cellulaire est infiniment plus élevée que celle de l'apparition d'un néoplasme, ce qui suggère fortement que la transformation cancéreuse *in vivo* résulte de la combinaison de plusieurs événements génétiques.

Transformation de fibroblastes en culture

Les fibroblastes ont constitué le premier modèle cellulaire développé pour analyser les potentialités oncogènes de séquences génétiques. Les premiers travaux ont été réalisés sur une lignée de fibroblastes immortalisés de souris, les cellules 3T3. Ces cellules présentent un phénotype pseudo-normal et ne forment pas de tumeurs après implantation dans une souris tolérante. La transfection de cellules 3T3 avec de l'ADN isolé de tumeurs humaines a permis d'identifier le pouvoir transformant d'un allèle muté du protooncogène *c-Ha-ras* (synthèse dans Barbacid, 1987). Ce même oncogène ainsi que des oncogènes de la même famille ou d'autres oncogènes codant pour des protéines cytoplasmiques ou membranaires ont été identifiés, par la suite, dans différentes tumeurs humaines et animales (Cooper, 1987). Les oncogènes du groupe *ras* sont les plus fréquemment identifiés dans des types de tumeurs très divers. Cette technique n'a pas permis d'identifier jusqu'à présent, des oncogènes codant pour des protéines nucléaires. L'ADN issu de certaines tumeurs ou leucémies ne transforme pas les cellules 3T3 par transfection, ce qui laisse supposer que la technique est impropre à révéler certains oncogènes, ou bien que

les cellules 3T3 ne constituent pas la cible de transformation de certains oncogènes. Aucune corrélation n'a pu être effectuée jusqu'à présent entre le type d'oncogène identifié par cette technique et la nature de la tumeur qui le renferme, ce qui laisse imaginer que les oncogènes identifiés par cette voie ne sont pas les seuls éléments génétiques à l'origine des néoplasmes analysés.

L'application de cette technique sur des fibroblastes primaires de rat montre que les allèles mutés des oncogènes *ras* sont inefficaces dans ce système. Par contre, la transformation est obtenue lorsque les oncogènes *ras* sont cotransfectés avec un oncogène *myc* (Land *et al*, 1983). Un résultat identique est obtenu lorsque l'oncogène *ras* est associé à l'oncogène *N-myc* (Yancopoulos *et al*, 1985), ou au protooncogène dérégulé *c-jun* (Schütte *et al*, 1989), ou à un allèle muté du gène P53 (Eliyahu *et al*, 1984; Parada *et al*, 1984; Hinds *et al*, 1989), ou à divers oncogènes de virus à ADN comme LT du virus SV40 (Cherington *et al*, 1988), LT de polyome (Land *et al*, 1983), E1A d'adénovirus humain (Ruley, 1983), ou E7 du virus du papillome humain HPV16 (Crook *et al*, 1989; Phelps *et al*, 1988; Storey *et al*, 1988). Cette forme de coopération dans la transformation des fibroblastes primaires est aussi retrouvée entre les 2 oncogènes LT et MT de polyome (Rassoulzadegan *et al*, 1982). Il faut noter que tous les oncogènes identifiés qui coopèrent avec *ras* dans ce test soit codent pour des protéines nucléaires (*myc*, P53), soit codent pour des protéines qui se complexent à des protéines nucléaires comme la protéine Rb dont la fonction pourrait être le contrôle négatif de la prolifération cellulaire (synthèse dans Green, 1989; Weinberg, 1985).

La différence de réponse des cellules 3T3 et des fibroblastes primaires à l'oncogène *ras* laisse supposer que l'oncogène

ras seul ne peut transformer que des cellules préalablement immortalisées, ce qui a été effectivement vérifié (Newbold et Overell, 1983). On doit donc admettre que les oncogènes coopérant avec *ras* dans la transformation des cellules primaires ont des fonctions immortalisantes. Ceci a été vérifié pour LT de polyome (Rassoulzadegan *et al*, 1983), E7 de HSV16 (Vousden et Jat, 1989), E1A (Ruley, 1983), P53 (Jenkins *et al*, 1985; Rovinski et Benchimol, 1988) et *N-myc* (Schwab et Bishop, 1988). Ces cellules immortalisées acquièrent la capacité de se répliquer indéfiniment en culture. Toutefois, elles conservent une certaine sensibilité au contrôle de la croissance par l'environnement cellulaire et ne forment pas de tumeur *in vivo*.

La transformation des fibroblastes primaires peut, dans certains cas, être obtenue avec un seul oncogène. Dans le cas de transformation par des rétrovirus, on peut imaginer que des structures rétrovirales coopèrent avec l'oncogène véhiculé selon un mécanisme encore inexpliqué (Cichutek et Duesberg, 1989; synthèse dans Duesberg, 1985). On peut aussi imaginer que certaines oncoprotéines renferment plusieurs domaines fonctionnels coopératifs, comme la protéine LT de SV40 (Cherington *et al*, 1988) et la protéine *v-src* (Calothy *et al*, 1987). Certains types cellulaires pourraient être particulièrement sensibles à l'effet d'un seul oncogène (Hjelle *et al*, 1988). Enfin certaines oncoprotéines pourraient induire des réarrangements du génome cellulaire aboutissant à l'activation de gènes cellulaires (Oshimura *et al*, 1985; Stenman *et al*, 1987; Cerni *et al*, 1987).

Bien que des oncogènes induisent à eux seuls certains caractères de transformation, la coopération d'oncogènes semble renforcer ces caractères. Ainsi, sur fibroblastes d'embryons de poulet, l'oncogène *v-erbB* de l'AEV est suffisant pour in-

duire l'apparition de certains caractères de transformation comme la formation de colonies en agar mou (Sealy *et al*, 1983; Frykberg *et al*, 1983). Cependant, la coopération avec l'oncogène *v-erbA* renforce les capacités de croissance des fibroblastes transformés par *v-erbB* et augmente leurs propriétés tumorigènes *in vivo* (Gandrillon *et al*, 1987; Jansson *et al*, 1987).

Transformation des cellules hématopoïétiques

Pour les 3 virus aviaires qui renferment 2 oncogènes, la préservation de l'intégrité fonctionnelle de ces 2 oncogènes est nécessaire pour que les virus développent la totalité de leur spectre oncogénique respectif.

Dans le virus E26, une mutation dans la séquence *v-myb* affecte seulement la transformation myéloïde mais pas la transformation érythroïde (Beug *et al*, 1984). Inversement, une mutation dans la séquence *v-ets* altère la capacité de transformation sur les cellules érythroïdes mais pas sur les cellules myéloïdes (Golay *et al*, 1988; Nunn et Hunter, 1989). Ces résultats suggèrent que les séquences *v-myb* et *v-ets* sont responsables respectivement de la transformation myéloïde et érythroïde. Cependant certaines mutations dans la séquence *v-ets* modifient le phénotype des cellules transformées, ce qui suggère que les 2 oncogènes coopèrent dans le blocage des cellules myéloïdes à un stade très immature (Golay *et al*, 1988).

Le virus MH2 transforme les macrophages et leur confère une croissance autocrine. L'analyse de mutants naturels ou artificiels du virus a montré que la transformation résulte de l'action du gène *v-myc* alors que le produit de l'oncogène *v-mil* induit la production et la sécrétion par les

macrophages transformés d'un facteur de croissance spécifique, le cMGF, auquel ils sont directement sensibles pour la prolifération (Graf *et al*, 1986). Une situation très analogue est observée dans des cultures de moelle de souris infectées par un rétrovirus recombinant portant les oncogènes *v-myc* et *v-raf* (*v-raf* est l'homologue murin de *v-mil*). Les cellules monocytiques infectées par ce virus sont bloquées dans leur différenciation et se développent en absence de facteur de croissance spécifique. La transformation et la prolifération de ces cellules nécessite la coopération des 2 oncogènes (Blasi *et al*, 1985). Il est intéressant de noter que la plupart des clones cessent de proliférer et se différencient après un mois de culture. Certains clones peuvent émerger et être alors établis en lignées, suggérant l'existence d'un événement additionnel conduisant à l'immortalisation.

La même combinaison des oncogènes *v-raf* et *v-mil* induit une transformation des cellules érythrocytiques de souris (Klinken *et al*, 1989). L'expression dérégulée de l'oncogène *myc* peut induire le blocage de la différenciation érythrocytique (Coppola et Cole, 1986; Maruyama *et al*, 1987; Kaneko-Ishino *et al*, 1988). L'oncogène *v-raf* semble donc responsable de l'induction de la prolifération des cellules bloquées et pourrait leur conférer une croissance autocrine (Klinken *et al*, 1988). Cependant la très faible efficacité d'établissement des lignées érythroblastiques avec des rétrovirus associant *v-myc* et *v-raf* suggère que des événements génétiques ultérieurs sont nécessaires pour l'immortalisation des cellules transformées (Klinken *et al*, 1988).

La transformation des précurseurs érythrocytiques de poulet par le virus de l'érythroblastose aviaire fournit un modèle très intéressant de coopération d'oncogènes. Ce virus bloque la différenciation des précurseurs érythrocytiques immatures et in-

duit leur autorenouvellement (Samarut et Gazzolo, 1982; Graf et Beug, 1978). La coopération des oncogènes *v-erbA* et *v-erbB* est nécessaire pour induire cette transformation (Frykberg *et al*, 1983). Par l'utilisation de mutants artificiels du virus exprimant spécifiquement l'un ou l'autre oncogène, on a pu montrer que le produit de *v-erbB* n'altère pas le programme de différenciation mais exerce un effet mitogène sur les précurseurs érythrocytiques et les rend indépendants de l'effet mitogène de facteurs de croissance érythrocytiques (Frykberg *et al*, 1983; Gandrillon *et al*, 1989). Par contre, la protéine codée par *v-erbA* est directement responsable du blocage du programme de différenciation (Gandrillon *et al*, 1989). La coopération des 2 oncogènes est nécessaire pour induire le développement de leucémies *in vivo* (Gandrillon *et al*, 1989).

La coopération entre l'oncogène *myc* et les oncogènes *ras* ou Bcl-2 est nécessaire pour transformer des cellules B et rendre ces cellules hautement tumorigènes (Schwartz *et al*, 1986; Vaux *et al*, 1988).

Reconstitution d'un développement néoplasique *in vivo*

L'environnement physiologique créé par l'organisme *in vivo* peut apparaître plus propice à l'analyse du développement néoplasique de cellules qui présentent des exigences extrêmes en culture. Ainsi l'implantation *in vivo* de cellules fraîchement transfectées avec de l'ADN oncogénique peut conduire au développement de tumeurs issues de cellules transfectées qui ne se seraient pas développées en culture. Cette approche a été utilisée pour suivre le développement néoplasique du tissu prostatique *in vivo* (Thompson *et al*, 1989). Les auteurs infectent *in vitro* des cellules du sinus urogénital du fœtus de souris

avec des vecteurs rétroviraux portant les oncogènes *v-ras* ou *v-myc*, ou la combinaison des 2 oncogènes. Les cellules infectées sont ensuite greffées sur la capsule rénale de souris mâle adulte. On constate que seules les ébauches infectées par le vecteur associant les 2 oncogènes développent des carcinomes. La nature oligoclonale de ces tumeurs suggère que des altérations génétiques ultérieures, dans les cellules transformées, sont nécessaires pour induire leur développement néoplasique. Les cellules transformées par *v-myc* ou *v-ras* seuls développent des hyperplasies ou des dysplasies limitées qui n'évoluent pas en tumeurs.

Modèles des animaux transgéniques

La possibilité de transférer une séquence génétique exogène dans la lignée germinale permet d'analyser les conséquences de l'expression d'un oncogène dans des tissus déterminés, dans le contexte d'un organisme entier (Jaenish, 1988). L'animal né d'un œuf ayant intégré l'ADN exogène est unique par le site d'insertion de l'ADN exogène et peut donner naissance à un clone de progéniteurs génétiquement identiques. Les croisements entre animaux transgéniques d'origine distincte permettent d'analyser les interactions génétiques entre les séquences exogènes portées par chacun des parents (Sinn *et al*, 1987; Andres *et al*, 1988). Il faut noter cependant que des animaux transgéniques indépendants, ayant incorporé le même transgène, peuvent l'exprimer différemment selon le site d'insertion du transgène dans le génome hôte.

Un nombre considérable de lignées de souris transgéniques pour un oncogène a été créé et il est impossible de rapporter tous ces travaux ici. On trouvera une synthèse exhaustive dans Hanahan (1988).

De l'ensemble de ces travaux on peut tirer un certain nombre de constatations générales.

L'efficacité transformante d'un oncogène est très variable selon les tissus dans lesquels il s'exprime. Ainsi la surexpression de l'oncogène *c-fos* n'a d'effet pathologique que dans le thymus et l'os (Rüther *et al*, 1987, 1988). Un autre exemple de cette restriction est fourni par l'oncogène MT de polyome qui développe essentiellement des hémangiomes (Williams *et al*, 1988). Un même tissu dans lequel est ciblée l'expression d'un oncogène répond différemment selon la nature de l'oncogène. Ainsi l'expression spécifique dans la glande mammaire d'un transgène *c-myc* associé au promoteur du gène de la protéine du petit lait (WAP) induit le développement d'un adénocarcinome mammaire, alors qu'un transgène WAP-*ras* n'induit que rarement de telles tumeurs (Schoenenberger *et al*, 1988; Andres *et al*, 1987). Il apparaît donc une certaine spécificité tissulaire d'action des protéines oncogènes. Seul l'oncogène T de SV40 induit des altérations dans une grande variété de tissus comme les cellules α du pancréas, le cristallin, le myocarde, le plexus choroïde (synthèse dans Hanahan, 1988).

D'une façon générale, les altérations tissulaires observées chez les animaux transgéniques se développent progressivement et les néoplasies n'apparaissent que chez les adultes et souvent à l'issue de circonstances particulières. Ainsi les transgènes *c-myc* dont l'expression est ciblée dans la glande mammaire induisent des carcinomes préférentiellement chez les femelles, et après plusieurs cycles de gestation et lactation (Leder *et al*, 1986; Schoenenberger *et al*, 1988; Stewart *et al*, 1984). Un transgène *c-myc* animé par un promoteur spécifique des lymphocytes B induit, dans la moelle et la rate, une hyperplasie polyclonale de cellules préB non malignes

qui évolue en quelques mois en tumeur clonale de cellules B dans le thymus et les ganglions lymphatiques (Adams *et al*, 1985; Langdon *et al*, 1986). Cette observation suggère que l'expression du transgène ne constitue qu'un événement primaire dans le développement de la tumeur et que des événements ultérieurs conduisent à la transformation maligne.

Le ciblage de l'expression du transgène T de SV40 dans le pancréas endocrine induit le développement hyperplasique de tous les îlots de Langerhans, par suite de la prolifération des cellules β . Cependant, seulement quelques-uns de ces îlots développent des tumeurs bien que le niveau d'expression du transgène soit identique dans les îlots hyperplasiques et les nodules tumoraux, ce qui permet de conclure que des événements génétiques ou épigénétiques ont induit la conversion tumorale (Erat *et al*, 1988).

L'existence de facteurs qui induisent la progression tumorale a été démontrée chez des animaux issus de croisement entre parents qui portent respectivement les transgènes *Ha-ras* et *c-myc* animés tous 2 par 1 promoteur sensible aux glucocorticoïdes. Les souris portant les 2 transgènes montrent une accélération du développement des tumeurs mammaires, en comparaison des parents qui portent 1 seul des 2 oncogènes. Cependant, le développement tumoral ne touche pas toutes les glandes mammaires chez un même animal. Ces résultats démontrent que la combinaison des 2 oncogènes *ras* et *myc* active le développement d'une tumeur mais qu'elle n'est pas suffisante pour induire l'ensemble des étapes de la transformation tumorale dans ces conditions (Sinn *et al*, 1987).

L'ensemble de ces résultats montre que le transgène joue essentiellement un rôle initiateur dans le développement de néoplasies. Les souris transgéniques consti-

tuent donc des outils prometteurs pour analyser les événements génétiques qui interviennent aux diverses étapes du développement tumoral. La possibilité d'introduire des mutations ciblées dans les cellules germinales (Zimmer et Gruss, 1989; Joyner *et al*, 1989) devrait conduire à la production de lignées de souris portant des mutations au niveau de divers proto-oncogènes. De tels animaux constitueront des modèles efficaces pour identifier les différents événements génétiques nécessaires au développement de tumeurs néoplasiques.

MÉCANISMES DE LA COOPÉRATION D'ONCOGÈNES

Modifications des exigences en facteurs de croissance

L'une des composantes majeures de la transformation cancéreuse est la diminution des exigences en facteurs de croissance des cellules transformées. Cette propriété résulte, soit de l'expression par les cellules elles-mêmes de facteurs de croissance auxquels elles sont directement sensibles (effet autocrine), soit de l'activation constitutive, dans les cellules, de processus métaboliques qui miment la transmission d'un signal mitotique (Heldin *et al*, 1987).

Le premier cas est parfaitement illustré par le modèle de transformation par l'oncogène *sis* qui code pour une protéine très similaire à la chaîne β du PDGF et qui induit une croissance autocrine des cellules transformées (Deuel *et al*, 1983). La libération de facteurs de croissance par les cellules transformées a été démontrée dans de nombreux types cellulaires. Ainsi, des cellules myéloïdes aviaires transformées sécrètent un facteur de croissance spéci-

que, le cMGF (Adkins *et al*, 1984; Graf *et al*, 1986). Des cellules myéloïdes de souris transformées par le gène humain réarrangé *bcr/abl* produisent de l'interleukine 3 (Hariharan *et al*, 1988). De même, l'expression de l'oncogène *ras* dans des cellules mastocytaires de souris induit leur production d'interleukine 3 (Nair *et al*, 1989). Les mécanismes par lesquels certains oncogènes induisent la production de facteurs de croissance sont encore inconnus. On peut cependant remarquer que les cellules transformées produisent des facteurs de croissance dont elles sont naturellement dépendantes. On peut se demander si la cellule n'est pas amenée, à certaines phases de son développement normal, à produire ses propres facteurs, et si dans ce contexte, les protéines oncogènes ne pourraient pas rendre ce processus constitutif et permanent. Inversement, on peut imaginer que l'effet autocrine constitue un phénomène sélectif qui ne laisse se développer que les cellules qui sécrètent les facteurs dont elles ont besoin impérativement. Dans certains cas, le réarrangement de gènes cellulaires qui codent pour des facteurs de croissance pourrait conduire à une production incontrôlée de ces facteurs (Schuler et Cole, 1988).

Dans de nombreuses cellules transformées, l'induction de la prolifération en absence de facteur de croissance ne résulte pas d'un mécanisme autocrine (Mathey-Prevot *et al*, 1986; Wheeler *et al*, 1987; Rees-Jones *et al*, 1989). On peut imaginer dans ces cas que la protéine oncogène stimule la prolifération en court-circuitant la voie de stimulation normalement activée par un facteur de croissance exogène. Il est à noter que d'une manière générale, l'abrogation des exigences en facteurs de croissance est induite essentiellement par les oncogènes qui codent pour des protéines cytoplasmiques ou transmembranaires comme *abl* (Rees-Jones *et al*,

1989; Mathey-Prevot *et al*, 1986; Wheeler *et al*, 1987; Kipreos et Wang, 1988), *fps*, *src*, *yes*, *ros* (Adkins *et al*, 1984; Carmier et Samarut, 1986), *mil* (Graf *et al*, 1986), *ras* (Nair *et al*, 1989), *erbB* (Gandrillon *et al*, 1989; Adkins *et al*, 1984). La levée de la dépendance envers les facteurs de croissance ne semble pas être suffisante à elle seule pour induire une transformation néoplasique, mais elle conduit à des hyperplasies de cellules qui conservent des potentialités de différenciation spontanée ou induite (Frykberg *et al*, 1983; Kahn *et al*, 1984; Johnson *et al*, 1989; Morishita *et al*, 1988; Carmier et Samarut, 1986; Lang *et al*, 1987; Wong *et al*, 1987; Neufeld *et al*, 1988). Ce caractère semble cependant compléter d'autres caractères de transformation pour augmenter le pouvoir tumorigène des cellules (Baumbach *et al*, 1987; Alexander *et al*, 1989; Lang *et al*, 1986). Ainsi, l'effet autocrine induit par le transfert de gène codant pour des facteurs de croissance dans des cellules préalablement immortalisées leur confère un pouvoir tumorigène (Rosenthal *et al*, 1986; Stern *et al*, 1987; Jaye *et al*, 1988; Sasada *et al*, 1988; Rogelj *et al*, 1988).

Modifications des relations avec l'environnement cellulaire

Les cellules normales voient leur réplication inhibée lorsqu'elles parviennent au contact d'autres cellules normales. Les cellules transformées présentent des sensibilités variables à l'effet répresseur de l'environnement cellulaire. Les fibroblastes primaires de rat transfectés par un oncogène *Ha-ras* peuvent développer des foyers de cellules transformées lorsqu'ils sont isolés de l'environnement des cellules normales (Spandidos et Wilkie, 1984; Land *et al*, 1986). Par contre, les fibroblastes transformés par le couple d'oncogènes *ras*

et *myc* échappent à la répression par les cellules normales (Land *et al*, 1983). Ce comportement des cellules en culture semble refléter la situation décrite *in vivo* dans les expériences de Thompson *et al* (1989) sur la transplantation d'ébauches de tissu prostatique infectées par des rétrovirus oncogènes. Lorsque les cellules infectées par un virus portant *v-Ha-ras* représentent moins de 0,1% des cellules du greffon, elles participent à la morphogénèse normale du tissu prostatique. Lorsque leur concentration est 10 fois supérieure dans le greffon, ces cellules développent des foyers displasiques. Par contre, l'infection des cellules greffées par un rétrovirus exprimant simultanément les oncogènes *ras* et *myc* conduit au développement d'un carcinome au niveau de l'implant, même si le nombre initial de cellules infectées est faible.

D'une façon similaire, des kératinocytes transformés par l'oncogène *Ha-ras* ne développent pas de carcinome lorsqu'ils sont greffés sur des animaux syngéniques à cause d'un effet répresseur exercé par les fibroblastes du derme (Dotto *et al*, 1988).

Le contrôle de la prolifération par les cellules environnantes repose sur l'établissement de communications intercellulaires permettant l'échange de petites molécules (Loewenstein, 1979). Des fibroblastes NIH3T3 transformés par l'oncogène *v-myc* établissent des communications intercellulaires avec des fibroblastes non transformés. Par contre, des fibroblastes transformés par *v-ras* ou *v-src* perdent cette propriété. L'absence d'établissement de jonctions intercellulaires est directement corrélée avec la capacité des cellules transformées à proliférer au milieu de cellules normales et à former des tumeurs *in vivo* (Bignami *et al*, 1988).

L'ensemble de ces observations montre donc que le développement anarchique des cellules transformées s'accompagne

de la rupture des interactions fonctionnelles avec les cellules environnantes. On ne sait pas encore si la disparition des jonctions intercellulaires est un événement causal de l'évolution néoplasique.

Altérations du programme de différenciation

Le blocage de la différenciation est une autre composante de la transformation oncogène (Fizman et Fuchs, 1975; Graf et Beug, 1978; Gazzolo *et al*, 1979; Falcone *et al*, 1985; Gandrillon *et al*, 1989). L'altération du programme de différenciation peut, dans certains cas, conduire les cellules transformées à régresser vers une forme moins différenciée (Gazzolo *et al*, 1979; Ness *et al*, 1987). Cette régression pourrait être responsable d'une reprogrammation morphogénétique des cellules (Klinken *et al*, 1988; Hanecak *et al*, 1989).

D'une manière générale, les oncoprotéines nucléaires semblent responsables de l'altération du programme de différenciation. Ainsi l'oncogène *v-erbA* bloque la différenciation des précurseurs érythrocytiques (Gandrillon *et al*, 1989). L'oncogène *v-myb* altère le programme morphogénétique des précurseurs myéloïdes (Gazzolo *et al*, 1979). Les formes oncogéniques de la protéine *myc* altèrent la différenciation de nombreux types cellulaires (Moscovici et Gazzolo, 1982; Langdon *et al*, 1986; Coppola et Cole, 1986; Sinn *et al*, 1987; Maruyama *et al*, 1987; Andres *et al*, 1988; Kaneko-Ishino *et al*, 1988). Cette absence de spécificité pourrait être expliquée en imaginant que la protéine codée par le protooncogène *c-myc* normal est ubiquitaire et contrôle harmonieusement le choix entre différenciation et prolifération auquel la cellule se trouve confrontée durant sa morphogénèse. Les formes oncogéniques de la protéine *myc* altéreraient ce détermi-

nisme en bloquant la voie de différenciation conservant ainsi les cellules dans un cycle réplicatif (Freytag, 1988; Langdon *et al*, 1986).

CONCLUSION

Il est évident que plusieurs événements génétiques sont nécessaires pour induire le développement néoplasique à partir d'une cellule normale. Certains au moins de ces événements sont induits par des gènes identifiés parmi les oncogènes.

Deux composantes essentielles peuvent être identifiées dans ce processus. D'une part, une altération du programme de différenciation qui se traduit par un blocage du développement morphogénétique de la cellule et parfois sa reprogrammation. Les oncogènes qui codent pour des protéines nucléaires semblent jouer un rôle important dans le dérèglement de ce processus. D'autre part, l'activation de la prolifération des cellules, rend ces cellules moins exigeantes en facteurs de croissance et moins sensibles à l'effet répressif des cellules environnantes. Quelles que soient les voies empruntées, le dérèglement du contrôle de la prolifération aboutit à rendre ces cellules totalement autonomes et ignorantes des facteurs de contrôle de l'environnement. Les oncogènes qui codent pour des protéines cytoplasmiques semblent essentiellement responsables de ces dérèglements de la prolifération.

Les analyses de tumorigenèse *in vivo* montrent que ces 2 composantes essentielles pour la transformation *in vitro* doivent être complétées par d'autres événements génétiques pour induire le développement d'une tumeur ou d'une leucémie.

RÉFÉRENCES

- Adams JM, Harris AW, Pinkert CA, Corcoran LM, Alexander WS, Cory S, Palmiter RD, Brinster RL (1985) The *c-myc* oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature* 318, 533-538
- Adkins B, Leutz A, Graf T (1984) Autocrine growth induced by *src*-related oncogenes in transformed chicken myeloid cells. *Cell* 39, 439-445
- Alexander WS, Adams JM, Corry S (1989) Oncogene cooperation in lymphocyte transformation of *Eu-myc* transgenic pre-B cells *in vitro* is enhanced by *v-Ha-ras* or *v-raf* but not *v-abl*. *Mol Cell Biol* 9, 67-73
- Andres AC, Schönenberger CA, Groner B, Henninghausen L, Lemeur M, Gerlinger P (1987) *Ha-ras* oncogene expression directed by a milk protein gene promoter: tissue specificity, hormonal regulation, and tumor induction in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 1299-1303
- Andres AC, Van der Valk MA, Schönenberger CA, Flückiger F, Le Meur M, Gerlinger P, Groner B (1988) *Ha-ras* and *c-myc* oncogene expression interferes with morphological and functional differentiation of mammary epithelial cells in single and double transgenic mice. *Genes & Dev* 2, 1486-1495
- Barbacid M (1987) *ras* Genes. *Annu Rev Biochem* 56, 779-827
- Baumbach WR, Stanley ER, Cole MD (1987) Induction of clonal monocyte-macrophage tumors *in vivo* by a mouse *c-myc* retrovirus: rearrangement of the CSF-1 gene as a secondary transforming event. *Mol Cell Biol* 7, 664-671
- Beug H, Leutz A, Kahn P, Graf T (1984) Ts mutants of E26 leukemia virus allow transformed myeloblasts, but not erythroblasts or fibroblasts, to differentiate at the non-permissive temperature. *Cell* 39, 579-588
- Bigami M, Rosa S, La Rocca SA, Falcone G, Tato F (1988) Differential influence of adjacent normal cells on the proliferation of mammalian cells transformed by the viral oncogenes *myc*, *ras* and *src*. *Oncogene* 2, 509-514

- Bishop JM (1985) Viral oncogenes. *Cell* 42, 23-38
- Bishop JM (1987) The molecular genetics of cancer. *Science* 235, 305-311
- Blasi E, Mathieson BJ, Varesio L, Cleveland JL, Borchert PA, Rapp UR (1985) Selective immortalization of murine macrophages from fresh bone marrow by a *raf/myc* recombinant murine retrovirus. *Nature* 318, 667-672
- Bowtell DDL, Cory S, Johnson GR, Gonda TJ (1988) Comparison of expression in hemopoietic cells by retroviral vectors carrying two genes. *J Virol* 62, 2464-2473
- Browder TM, Abrams JS, Wong PM, Nienhuis AW (1989) Mechanism of autocrine stimulation in hematopoietic cells producing interleukin-3 after retrovirus-mediated gene transfer. *Mol Cell Biol* 9, 204-213
- Calothy G, Laugier D, Cross FR, Jove R, Hanafusa T, Hanafusa H (1987) The membrane binding domain and myristylation of p60v-src are not essential for stimulation of cell proliferation. *J Virol* 61, 1678-1681
- Carmier JF, Samarut J (1986) Chicken myeloid stem cells infected by retroviruses carrying the *v-fps* oncogen do not exogenous growth factors to differentiate *in vitro*. *Cell* 44, 159-165
- Cerni C, Mougneau E, Cuzin F (1987) Transfer of "immortalizing" oncogenes into rat fibroblasts induces both high rate of sister chromatid exchange and appearance of abnormal karyotypes. *Exp Cell Res* 168, 439-446
- Cherington V, Brown M, Paucha E, St Louis J, Spiegelman BM, Roberts TM (1988) Separation of Simian Virus 40 large-T-antigen-transforming and origin-binding functions from the ability to block differentiation. *Mol Cell Biol* 8, 1380-1384
- Cichutek K, Duesberg PH (1989) Recombinant BALB and Harvey sarcoma viruses with normal proto-*ras* coding regions transform embryo cells in culture and cause tumors in mice. *J Virol* 63, 1377-1383
- Coll J, Righi M, de Taisne C, Dissous C, Gégonne A, 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
- Compere SJ, Baldacci PA, Sharpe AH, Jaenisch R (1989) Retroviral transduction of the human c-Ha-*ras-1* oncogene into midgestation mouse embryos promotes rapid epithelial hyperplasia. *Mol Cell Biol* 9, 6-14
- Cooper GM (1987) Cellular oncogenes and cancer. *Clin Physiol Biochem* 5, 122-129
- Coppola JA, Cole MD (1986) Constitutive *c-myc* oncogene expression blocks mouse erythroleukemia cell differentiation but not commitment. *Nature* 320, 760-763
- Crook T, Morgenstern JP, Crawford L, Banks L (1989) Continued expression of HPV-16 E7 protein is required for maintenance of the transformed phenotype of cells co-transformed by HPV-16 plus EJ-*ras*. *EMBO J* 8, 513-519
- Deuel TF, Huang JS, Huang SS, Stroobant P, Waterfield M (1983) Expression of a platelet-derived growth factor-like protein in simian sarcoma virus transformed cells. *Science* 221, 1348-1350
- Dotto GP, Weinberg RA, Ariza A (1988) Malignant transformation of mouse primary keratinocytes by Harvey sarcoma virus and its modulation by surrounding normal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 6389-6393
- Duesberg PH (1985) Activated proto-onc genes: sufficient or necessary for cancers? *Science* 228, 669-677
- Duesberg PH (1987) Cancer genes: rare recombinants instead of activated oncogenes (a review). *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 2117-2124
- Efrat S, Linde S, Kofod H, Spector D, Delannoy M, Grant S, Hanahan D, Baekkeskov S (1988) Beta-cell lines derived from transgenic mice expressing a hybrid insulin gene-*oncogene*. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 9037-9041
- Eliyahu D, Raz A, Gruss P, Givol D, Oren M (1984) Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells. *Nature* 312, 646-649
- Falcone G, Tato F, Alema S (1985) Distinctive effects of the viral oncogenes *myc*, *erb*, *fps* and *src* on the differentiation program of quail myogenic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 426-430
- Fizman MY, Fuchs P (1975) Temperature-sensitive expression of differentiation in transformed myoblasts. *Nature* 254, 429-431

- Freytag SO (1988) Enforced expression of the *c-myc* oncogene inhibits cell differentiation by precluding entry into distinct predifferentiation state in Go/G1. *Mol Cell Biol* 8, 1614-1624
- Frykberg L, Palmieri S, Beug H, Graf T, Hayman MJ, Vennström B (1983) Transforming capacities of avian erythroblastosis virus mutants deleted in the *erbA* or *erbB* oncogenes. *Cell* 32, 227-238
- Gandrillon O, Jurdic P, Benchaïbi M, Xiao JH, Ghysdael J, Samarut J (1987) Expression of the *v-erbA* oncogene in chicken embryo fibroblasts stimulates their proliferation and enhances tumor growth *in vivo*. *Cell* 49, 687-697
- Gandrillon O, Jurdic P, Desbois C, Pain B, Madjar JJ, Moscovici MG, Moscovici C, Samarut J (1989) Expression of *v-erbA*, an altered nuclear hormone receptor, is sufficient to transform erythrocytic cells *in vitro*. *Cell* 58, 115-121
- Gazzolo L, Moscovici C, Moscovici MG, Samarut J (1979) Response of hemopoietic cells to avian acute leukemia viruses: effects on the differentiation of the target cells. *Cell* 16, 627-638
- Gazzolo L, Samarut J, Bouabdelli M, Blanchet JP (1980) Early precursors in the erythroid lineage are the specific target cells of avian erythroblastosis virus *in vitro*. *Cell* 22, 683-691
- Golay J, Introna M, Graf T (1988) A single point mutation in the *v-ets* oncogene affects both erythroid and myelomonocytic cell differentiation. *Cell* 55, 1147-1158
- Graf T, Beug H (1978) Avian leukemia viruses: interaction with their target cells in *in vivo* and *in vitro*. *Biochim Biophys Acta* 516, 269-299
- Graf T, Ade N, Beug H (1978) Temperature sensitive mutant of avian erythroblastosis virus suggests a block of differentiation as mechanism of leukemogenesis. *Nature* 275, 496-501
- Graf T, Weizaecker F, Grieser S, Coll J, Stehelin D, Patchinsky T, Bister K, Bechade C, Calothy G, Leutz A (1986) *V-mil* induces autocrine growth and enhanced tumorigenicity in *V-myc*-transformed avian macrophages. *Cell* 45, 357-364
- Green MR (1989) When the products of oncogenes and anti-oncogenes meet. *Cell* 56, 1-3
- Hanafusa H (1977) Cell transformation by RNA tumor viruses. In: *Comprehensive Virology vol 10* (H Fraenkel-Conrat and RR Wagner, eds), Plenum Publ Corp, New York, 401-483
- Hanahan D (1988) Dissecting multistep tumorigenesis in transgenic mice. *Annu Rev Genet* 22, 479-519
- Hanecak R, Zovich DC, Pattengale PK, Fan H (1989) Differentiation *in vitro* of a leukemia virus-induced B-cell lymphoma into macrophages. *Mol Cell Biol* 9, 2264-2268
- Hariharan IK, Adams JM, Cory S (1988) *bcr/abl* oncogene renders myeloid cell line factor independent: potential autocrine mechanism in chronic myeloid leukemia. *Oncogene Res* 3, 387-389
- Heldin CH, Besthotz C, Claesson-Welsh L, Westermark B (1987) Subversion of growth regulatory pathways in malignant transformation. *Biochim Biophys Acta* 907, 219-224
- Hinds P, Finlay C, Levine AJ (1989) Mutation is required to activate p53 gene for cooperation with the *ras* oncogene and transformation. *J Virol* 63, 739-746
- Hjelle B, Liu E, Bishop MJ (1988) Oncogene *v-src* transforms and establishes embryonic rodent fibroblasts but not diploid human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 4355-4359
- Jaenish R (1988) Transgenic animals. *Science* 240, 1468-1474
- Jansson M, Beug H, Gray C, Graf T, Vennström B (1987) Defective *v-erbB* genes can be complemented by *v-erbA* in erythroblast and fibroblast transformation. *Oncogene* 1, 167-173
- Jaye M, Lyall RM, Schlessinger J, Sarver (1988) Expression of acidic fibroblast growth factor cDNA confers growth advantage and tumorigenesis to Swiss 3T3 cells. *EMBO J* 7, 963-969
- Jenkins JR, Rudge K, Chumakov P, Currie GA (1985) The cellular oncogene p53 can be activated by mutagenesis. *Nature* 317, 816-819
- Johnson GR, Gonda TJ, Metcalf D, Hariharan IK, Cory S (1989) A lethal myeloproliferative syndrome in mice transplanted with bone marrow cells infected with a retrovirus ex-

- pressing granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *EMBO J* 8, 441-448
- Joyner AL, Skarnes WC, Rossant J (1989) Production of a mutation in mouse En-2 gene by homologous recombination in embryonic stem cells. *Nature* 338, 153-156
- Kahn P, Adkins B, Beug H, Graf T (1984) *Src* and *Eps*-containing Avian Sarcoma Viruses transform chicken erythroid cells. *Proc Acad Sci USA* 81, 7122-7126
- Kaneko-Ishino T, Uan Kume T, Sasaki H, Obinata M, Oishi M (1988) Effect of *c-myc* gene expression on early inducible reactions required for erythroid differentiation *in vitro*. *Mol Cell Biol* 8, 5545-5548
- Kipreos ET, Wang JYJ (1988) Reversible dependence on growth factor interleukin-3 in myeloid cells expressing temperature sensitive *v-abl* oncogenes. *Oncogene Res* 2, 277-284
- Klinken SP, Alexander WS, Adams JM (1988) Hemopoietic lineage switch: *v-raf* oncogene converts Eu-*myc* transgenic B cells into macrophages. *Cell* 53, 857-867
- Klinken SP, Rapp UR, Morse III HC (1989) *raf/myc*-infected erythroid cells are restricted in their ability to terminally differentiate. *Mol Cell Biol* 63, 1489-1492
- Kozma SC, Redmond SMS, Xiao-Chang F, Saurer SM, Groner B, Hynes NE (1988) Activation of the receptor kinase domain of the *trk* oncogene by recombination with two different cellular sequences. *EMBO J* 7, 147-154
- Land H, Parada LF, Weinberg RA (1983) Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* 304, 596-602
- Land H, Chen A, Morgenstern J, Parada L, Weinberg R (1986) Behavior of *myc* and *ras* oncogenes in transformation of REF. *Mol Cell Biol* 6, 1917-1925
- Lang RA, Metcalf D, Gough NM, Dunn AR, Gonda TJ (1986) Expression of a hemopoietic growth factor cDNA in a factor dependent cell line results in autonomous growth and tumorigenicity. *Cell* 43, 531-542
- Lang RA, Metcalf D, Cuthbertson RA, Lyons I, Stanley Ed, Kelso A, Kannourakis G, Williamson DJ, Klintworth GK, Gonda TJ, Dunn AR (1987) Transgenic mice expressing a hemopoietic growth factor gene (GM-CSF) develop accumulations of macrophages, blindness, and a fatal syndrome of tissue damage. *Cell* 51, 675-686
- Langdon WY, Harris AW, Cory A, Adams JM (1986) The *c-myc* oncogene perturbs B lymphocyte development in Em-*myc* transgenic mice. *Cell* 47, 11-18
- Lax I, Johnson A, Howk R, Sap J, Bellot F, Winkler M, Ullrich A, Vennstrom B, Schlessinger J, Givol D (1988) Chicken epidermal growth factor (EGF) receptor cDNA cloning, expression in mouse cells and differential binding of EGF and transforming growth factor alpha. *Mol Cell Biol* 8, 1970-1978
- Leder A, Pattengale PK, Kuo A, Stewart TA, Leder P (1986) Consequences of widespread deregulation of the *c-myc* gene in transgenic mice: multiple neoplasms and normal development. *Cell* 45, 485-495
- Leprince D, Gegonne A, Coll J, de Taisne C, Scneeberger A, Lagrou C, Stehelin D (1983) A putative second cell-derived oncogene of the avian leukemia retrovirus E26. *Nature* 306, 395-397
- Liotta LA (1986) Tumor invasion and metastases-Role of the extracellular matrix: Rhoads memorial award lecture. *Cancer Res* 46, 1-7
- Loewenstein WR (1979) Junctional intercellular communications and the control of growth. *Biochim Biophys Acta* 560, 1-65
- Maruyama K, Schiavi SS, Huse W, Johnson GL, Ruley HE (1987) *myc* and E1A oncogenes alter the responses of PC12 cells to nerve growth factor and block differentiation. *Oncogene* 1, 361-367
- Mathey-Prévoit B, Baltimore D (1988) Recombinants within the tyrosine kinase region of *v-abl* and *v-src* identify a *v-abl* segment that confers lymphoid specificity. *Mol Cell Biol* 8, 234-240
- Mathey-Prévoit B, Nabel G, Palacios R, Baltimore D (1986) Abelson virus abrogation of interleukin-3 dependence in a lymphoid cell line. *Mol Cell Biol* 6, 4133-4135
- Morishita K, Parker DS, Mucenski ML, Jenkins NA, Copeland NG, Ihle JN (1988) Retroviral activation of a novel gene encoding a zinc finger protein in IL-3-dependent myeloid leukemia cell lines. *Cell* 54, 831-840

- Moscovici C, Gazzolo L (1982) Transformation of hemopoietic cells with avian leukemia viruses. In: *Advances in viral oncology, vol 1* (G Klein, ed) Raven Press, New York, 83-105
- Moscovici MG, Jurdic P, Samarut J, Gazzolo L, Mura CV, Moscovici C (1983) Characterization of the hematopoietic target cells for the avian leukemia virus E26. *Virology* 129, 65-78
- Moscovici MG, Siegel ML, Moscovici C (1989) Avian erythroblastosis virus transforms a novel mast cell-basophil precursor target in the japanese quail. *J Virol* 63, 2335-2339
- Nair APK, Diamantis ID, Conscience JF, Kindler V, Hofer P, Moroni C (1989) A v-Ha-ras-dependent hemopoietic tumor model involving progression from a clonal stage of transformation competence to autocrine interleukin 3 production. *Mol Cell Biol* 9, 1183-1190
- Ness SA, Beug H, Graf T (1987) v-myb dominance over v-myc in doubly transformed chick myelomonocytic cells. *Cell* 51, 41-50
- Neufeld G, Mitchell R, Ponte P, Gospodarowicz D (1988) Expression of human basic fibroblast growth factor cDNA in baby hamster kidney-derived cells results in autonomous cell growth. *J Cell Biol* 106, 1385-1394
- Newbold RF, Overell RW (1983) Fibroblast immortality is a prerequisite for transformation by EJ c-Ha-ras oncogene. *Nature* 304, 648-651
- Nunn MF, Hunter T (1989) The *ets* sequence is required for induction of erythroblastosis in chickens by avian retrovirus E26. *J Virol* 63, 398-402
- Nunn MF, Seeburg PH, Moscovici C, Duesberg PH (1983) Tripartite structure of the avian erythroblastosis virus E26 transforming gene. *Nature* 306, 391-395
- Oshimura M, Gilmer T, Barrett C (1985) Non-random loss of chromosome 15 in Syrian hamster tumours induced by V-Ha-ras plus V-myc oncogenes. *Nature* 316, 636-639
- Parada LF, Land H, Weinberg RA, Wolf D, Roter V (1984) Cooperation between gene encoding p53 tumor antigen and *ras* in cellular transformation. *Nature* 312, 649-651
- Phelps WC, Yee CL, Munger K, Howley PM (1988) The human papillomavirus type 16 E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to those of adenovirus E1A. *Cell* 53, 539-547
- Plantefaber LC, Hynes RO (1989) Changes in integrin receptors on oncogenically transformed cells. *Cell* 56, 281-290
- Radke K, Beug H, Korfeld S, Graf T (1982) Transformation of both erythroid and myeloid cells by E26, an avian leukemia virus that contains the myb gene. *Cell* 31, 643-653
- Rassoulzadegan M, Cowie A, Carr A, Glaichenhaus N, Kamen R, Cuzin F (1982) The roles of individual polyoma virus early proteins in oncogenic transformation. *Nature* 300, 713-716
- Rassoulzadegan M, Naghashfar Z, Cowie A, Carr A, Grisoni M, Kamen R, Cuzin F (1983) Expression of the large T protein of polyoma virus promotes the establishment in culture of normal rodent fibroblast cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 80, 4354-4358
- Rees-Jones RW, Goldfarb M, Goff SP (1989) Abelson murine leukemia virus induces platelet-derived growth factor-independent fibroblast growth: correlation with kinase activity and dissociation from full morphologic transformation. *Mol Cell Biol* 9, 278-287
- Rogelj S, Weinberg RA, Fanning P, Klagsburn M (1988) Basic fibroblast growth factor fused to a signal peptide transforms cells. *Nature* 331, 173-175
- Rosenthal A, Lindquist PB, Bringman TS, Goeddel DV, Derynk R (1986) Reexpression in rat fibroblasts of a human transforming growth factor alpha cDNA results in transformation. *Cell* 46, 301-309
- Rovinski B, Benchimol S (1988) Immortalization of REF by the cellular p53 oncogene. *Oncogene* 2, 445-452
- Royer-Pokora B, Geug H, Claviez M, Winkhardt HJ, Friis RR, Graf T (1978) Transformation parameters in chicken fibroblasts transformed by AEV and MC29 avian leukemia viruses. *Cell* 13, 751-760
- Ruley HE (1983) Adenovirus early region 1A enables viral and cellular transforming genes to transform primary cells in culture. *Nature* 304, 602-606
- Rüther U, Garber C, Komitowski D, Müller R, Wagner EF (1987) Deregulated c-fos expression interferes with normal bone develop-

- ment in transgenic mice. *Nature* 325, 412-416
- Rüther U, Müller W, Sumida T, Tokuhisa T, Rajewsky K, Wagner EF (1988) *c-fos* expression interferes with thymus development in transgenic mice. *Cell* 53, 847-856
- Samarut J, Gazzolo L (1982) Target cells infected by avian erythroblastosis virus differentiate and become transformed. *Cell* 28, 921-929
- Sap J, Munoz A, Damm K, Goldberg Y, Ghysdael J, Lentz A, Beug H, Vennström B (1986) The *c-erb A* protein is a high-affinity receptor for thyroid hormone. *Nature* 324, 635-640
- Sasada R, Kurokawa T, Iwane M, Igarashi K (1988) Transformation of mouse BALB/c cells with human basic fibroblasts growth factor cDNA. *Mol Cell Biol* 8, 588-594
- Schoenenberger CA, Andres AC, Groner B, Van der Valk M, Lemeur M, Gerlinger P (1988) Targeted *c-myc* gene expression in mammary glands of transgenic mice induces mammary tumours with constitutive milk protein gene transcription. *EMBO J* 7, 169-175
- Schuler GD, Cole MD (1988) GM-CSF and oncogene mRNA stabilities are independently regulated in trans in a mouse monocytic tumor. *Cell* 55, 1115-1122
- Schütte J, Minna JD, Birrer MJ (1989) Deregulated expression of human *c-jun* transforms primary rat embryo cells in cooperation with an activated *c-Ha-ras* gene and transforms Rat-1a cells as a single gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 2257-2261
- Schwab M, Bishop JM (1988) Sustained expression of the human protooncogene MYCN rescues rat embryo cells from senescence. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 9585-9589
- Schwartz R, Stanton L, Riley S, Marcu K, Witte O (1986) Synergism of *V-myc*, *V-Ha-ras* in the *in vitro* neoplastic progression of murine lymphoid cells. *Mol Cell Biol* 6, 3221-3231
- Sealy L, Privalsky ML, Moscovici G, Moscovici C, Bishop JM (1983) Site-specific mutagenesis of avian erythroblastosis virus: *erbB* is required for oncogenicity. *Virology* 130, 155-173
- Sinn E, Muller W, Pattengale P, Tepler I, Wallace R, Leder P (1987) Coexpression of MMTV/*v-Ha-ras* and MMTV/*c-myc* in transgenic mice: synergistic action of oncogenes *in vivo*. *Cell* 49, 465-475
- Spandidos D, Wilkie N (1984) Malignant transformation of early passage rodent cells by a single mutated human oncogene. *Nature* 310, 469-475
- Stenman G, Delorme EO, Lau CC, Sager R (1987) Transfection with plasmid pSV2gptEJ induces chromosomes rearrangements in CHEF cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 184-188
- Stern DF, Hare DL, Cecchini MA, Weinberg RA (1987) Construction of a novel oncogene based on synthetic sequences encoding epidermal growth factor. *Science* 235, 321-323
- Stewart TA, Pattengale TA, Leder P (1984) Spontaneous mammary adenocarcinomas in transgenic mice that carry and express MTV/*myc* fusion genes. *Cell* 38, 627-637
- Stocking C, Lölliger C, Kawai M, Suclu S, Gough N, Ostertag W (1988) Identification of genes involved in growth autonomy of hematopoietic cells by analysis of factor-independent mutants. *Cell* 53, 869-879
- Storey A, Pin D, Murray A, Osborn K, Banks L, Crawford L (1988) Comparison of the *in vitro* transforming activity of human papillomavirus types. *EMBO J* 7, 1815-1820
- Takahashi M, Cooper GM (1987) *ret* transforming gene encodes a fusion protein homologous to tyrosine kinases. *Mol Cell Biol* 7, 1378-1385
- Thompson TC, Southgate J, Kitchener G, Land H (1989) Multistage carcinogenesis induced by *ras* and *myc* oncogenes in a reconstituted organ. *Cell* 56, 917-930
- Vaux DL, Cory S, Adams JM (1988) Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with *c-myc* to immortalize pre-B cells. *Nature* 335, 440-442
- Vousden KH, Jat PS (1989) Functional similarity between HPV16E7, SV40 large T and adenovirus E1a proteins. *Oncogene* 4, 153-158
- Weinberg RA (1985) The Action of Oncogenes in the Cytoplasm and Nucleus. *Science* 230, 770-776
- Weinberger C, Thompson CC, Ong ES, Lebo R, Grudl DJ, Evans RM (1986) The *c-erbA* gene

- encodes a thyroid hormone receptor. *Nature* 324, 641-646
- Weinstein IB, Horowitz PB, Fischer V, Ivanovic S, Gattoni-Celli S, Kirschmeier P (1982) Mechanisms of multistage carcinogenesis and their relevance to tumor cell heterogeneity. In: *Tumor cell heterogeneity: origins and implications* (AH Owens, ed) Academic Press, New York, 261 pp
- Wheeler EF, Askew D, May S, Ihle JN, Sherr CJ (1987) The *v-fms* oncogene induces factor-independent growth and transformation of the interleukin-3 dependent myeloid cell line FDC-P1. *Mol Cell Biol* 7, 1673-1680
- White MK, Weber MJ (1988) Transformation by the *src* oncogene alters glucose transport into rat and chicken cells by different mechanisms. *Mol Cell Biol* 8, 138-144
- Williams RL, Courtneige SA, Wagner EF (1988) Embryonic and endothelial tumors in chimeric mice expressing polyoma virus middle T oncogene. *Cell* 52, 121-131
- Wong PMC, Chung SW, Nienhuis AW (1987) Retroviral transfer and expression of the interleukin-3 gene in hemopoietic cells. *Genes & Dev* 1, 358-365
- Yancopoulos G, Nisen P, Tesfaye A, Kohl N, Goldfarb M, Alt F (1985) *N-myc* can cooperate with *ras* to transform normal cells in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 5455-5459
- Young JC, Witte ON (1988) Selective transformation of primitive lymphoid cells by the BCR/ABL oncogene expressed in long term lymphoid or myeloid cultures. *Mol Cell Biol* 8, 4079-4087
- Zimmer A, Gruss P (1989) Production of chimeric mice containing embryonic stem (ES) cells carrying a homeobox *Hox 1.1* allele mutated by homologous recombination. *Nature* 338, 150-153