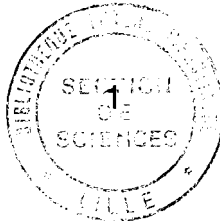


50376
1988
247



50376
1988
247

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

N° d'ordre: 295

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 POGNONEC

**Etude de l'expression et des modifications du
produit de traduction majoritaire du
proto-oncogène c-ets-1**

soutenue le 19 Décembre 1988 devant la commission d'examen:

Président : Professeur A. VERBERT
Rapporteurs : Docteur F. AMALRIC
Docteur S. BALL
Examineurs : Docteur J. GHYSDAEL
Professeur D. STEHELIN

Je profite de cette page rituelle pour remercier ceux qui m'ont aidé et soutenu au cours de ces quatre années de thèse, même s'ils savent déjà la gratitude que je leur témoigne.

Je remercie l'Institut Pasteur qui a accepté de me financer durant les deux premières années de ce travail ainsi que l'Association pour la Recherche sur le Cancer qui a assuré la relève durant les deux dernières années grâce à ses bourses d'étude.

Je voudrais dire un mot également à propos des animaux de laboratoire utilisés dans ces travaux. En effet, paradoxe difficilement contournable, la compréhension du vivant nécessite bien souvent sa destruction. Je souhaite que les résultats présentés ici puissent d'une manière ou d'une autre rendre admissibles ces sacrifices, qui n'ont jamais été effectués dans l'indifférence, loin de là.

Je remercie enfin les membres du jury qui ont accepté de juger ce travail, et plus particulièrement François Amalric qui, bravant le climat de Lille pour quelques heures, me fait le plaisir d'être partie prenante dans la conclusion de cette thèse après avoir été partiellement à l'origine de mon choix pour ce labo. La boucle est bouclée!

DOYENS HONORAIRES DE L'ANCIENNE FACULTE DES SCIENCES

M. H. LEFEBVRE, M. PARREAU.

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

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

PROFESSEUR EMERITE

M. A. LEBRUN

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

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

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

M. A. DUBRULLE.

PROFESSEURS - CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. FOURET René	Physique du solide
M. CABILLARD Robert	Electronique
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
M. TRIDOT Gabriel	Chimie appliquée

PROFESSEURS - 1ère CLASSE

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BILLARD Jean	Physique du solide
M. BOILLY Bénoni	Biologie
M. BONNELLE Jean Pierre	Chimie-Physique
M. BOSCOQ Denis	Probabilités
M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie végétale
M. BKEZINSKI Claude	Analyse numérique
M. BRIDOUX Michel	Chimie-Physique
M. CARKEZ Christian	Informatique
M. CELET Paul	Géologie générale
M. CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M. COEURE Gérard	Analyse
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. DEBCOURSE Jean Pierre	Gestion des entreprises
M. DHAINAUT André	Biologie animale
M. DOUKHAN Jean Claude	Physique du solide
M. DYMMENT Arthur	Mécanique
M. ESCAIG Bertrand	Physique du solide
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOCT Jacques	Métallurgie
M. FRONTIER Serge	Ecologie numérique
M. GRANELLE Jean jacques	Sciences Economiques
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie organique
M. LACOSTE Louis	Biologie végétale
M. LAVEINE Jean Pierre	Paléontologie
M. LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique atomique et moléculaire
M. LEROY Jean Marie	Spectrochimie
M. LHOMME Jean	Chimie organique biologique
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LOUCHEUX Claude	Chimie physique
M. LUCQUIN Michel	Chimie physique
M. MACKE Bruno	Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques
M. MIGEON Michel	E.U.D.I.L.
M. PAQUET Jacques	Géologie générale
M. PETIT Francis	Chimie organique
M. POUZET Pierre	Modélisation - Calcul scientifique
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. SALMER Georges	Electronique
M. SCHAMPS Joel	Spectroscopie moléculaire
M. SECUIER Guy	Electrotechnique
M. SIMON Michel	Sociologie
Mle SPIK Geneviève	Biochimie
M. STANKIEWICZ François	Sciences Economiques
M. TILLIEU Jacques	Physique théorique
M. TOULOTTE Jean Marc	Automatique
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS - 2ème CLASSE

M. ALLAMANDO Etienne	Composants électroniques
M. ANDRIES Jean Claude	Biologie des organismes
M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie animale
M. BASSERY Louis	Génie des procédés et réactions chimiques
Mme BATTIAU Yvonne	Géographie
M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BELLET Jean	Physique atomique et moléculaire
M. BERTRAND Hugues	Sciences Economiques et Sociales
M. BERZIN Robert	Analyse
M. BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BODARD Marcel	Biologie végétale
M. BOIS Pierre	Mécanique
M. BOISSIER Daniel	Génie civil
M. BOIVIN Jean Claude	Spectrochimie
M. BOUQUELET Stéphane	Biologie appliquée aux enzymes
M. BOUQUIN Henri	Gestion
M. BRASSELET Jean Paul	Géométrie et topologie
M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CAPURON Alfred	Biologie animale
M. CATTEAU Jean pierre	Chimie organique
M. CAYATTE Jean Louis	Sciences Economiques
M. CHAPOTON Alain	Electronique
M. CHARET Pierre	Biochimie structurale
M. CHIVE Maurice	Composants électroniques optiques
M. COMYN Gérard	Informatique théorique
M. COQUERY Jean Marie	Psychophysiologie
M. CORIAT Benjamin	Sciences Economiques et Sociales
Mme CORSIN Paule	Paléontologie
M. CORTOIS Jean	Physique nucléaire et corpusculaire
M. COUTURIER Daniel	Chimie organique
M. CRAMPON Norbert	Tectonique Géodynamique
M. CROSNIER Yves	Electronique
M. CURGY Jean jacques	Biologie
Mle DACHARRY Monique	Géographie
M. DAUCHET Max	Informatique
M. DEBRABANT Pierre	Géologie appliquée
M. DEGAUQUE Pierre	Electronique
M. DEJAEGER Roger	Electrochimie et Cinétique
M. DELORME Pierre	Physiologie animale
M. DELORME Robert	Sciences Economiques
M. DEMUNTER Paul	Sociologie
M. DENEL Jacques	Informatique
M. DE PARIS Jean Claude	Analyse
M. DEPREZ Gilbert	Physique du solide - Cristallographie
M. DERIEUX Jean Claude	Microbiologie
Mle DESSAUX Odile	Spectroscopie de la réactivité chimique
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie minérale
Mme DHAINAUT Nicole	Biologie animale
M. DHANELINCOURT Paul	Chimie physique
M. DORMARD Serge	Sciences Economiques
M. DUBOIS Henri	Spectroscopie hertzienne
M. DUBRULLE Alain	Spectroscopie hertzienne
M. DUBUS Jean Paul	Spectrométrie des solides

M. DUPONT Christophe	Vie de la firme (I.A.E.)
Mme EVRARD Micheline	Génie des procédés et réactions chimiques
M. FAKIR Sabah	Algèbre
M. FAUQUEMBERGUE Renaud	Composants électroniques
M. FONTAINE Hubert	Dynamique des cristaux
M. FOUQUART Yves	Optique atmosphérique
M. FOURNET Bernard	Biochimie structurale
M. GAMBLIN André	Géographie urbaine, industrielle et démographie
M. GLORIEUX Pierre	Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. COUDMAND Pierre	Chimie physique
M. GOURIEROUX Christian	Probabilités et statistiques
M. GREGORY Pierre	I.A.E.
M. CREMY Jean Paul	Sociologie
M. GREVET Patrice	Sciences Economiques
M. GRIMBLOT Jean	Chimie organique
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie animale
M. HENRY Jean Pierre	Génie mécanique
M. HERMAN Maurice	Physique spatiale
M. HOUDART René	Physique atomique
M. JACOB Gérard	Informatique
M. JACOB Pierre	Probabilités et statistiques
M. JEAN Raymond	Biologie des populations végétales
M. JOFFRE Patrick	Vie de la firme (I.A.E.)
M. JOURNEL Gérard	Spectroscopie hertzienne
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LANGRAND Claude	Probabilités et statistiques
M. LATTEUX Michel	Informatique
Mme LECLERCQ Ginette	Catalyse
M. LEFEBVRE Jacques	Physique
M. LEFEVRE Christian	Pétrologie
Mlle LEGRAND Denise	Algèbre
Mlle LEGRAND Solange	Algèbre
M. LEGRAND Pierre	Chimie
Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LEMAIRE Jean	Spectroscopie hertzienne
M. LE MAROIS Henri	Vie de la firme (I.A.E.)
M. LEROY Yves	Composants électroniques
M. LESENNE Jacques	Systèmes électroniques
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique théorique
M. LOSFELD Joseph	Informatique
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MAHIEU Jean Marie	Optique - Physique atomique
M. MAIZIERES Christian	Automatique
M. MAURISSON Patrick	Sciences Economiques et Sociales
M. NESMACQUE Gérard	Génie Mécanique
M. NESSELYN Jean	Physique atomique et moléculaire
M. MONTEL Marc	Physique du solide
M. MORCELLET Michel	Chimie organique
M. MORTREUX André	Chimie organique
Mme MOUNIER Yvonne	Physiologie des structures contractiles
M. NICOLE Jacques	Spectrochimie
M. NOTELET Francis	Systèmes électroniques
M. PARSY Fernand	Mécanique
M. PECQUE Marcel	Chimie organique
M. PERROT Pierre	Chimie appliquée

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

LISTE DES PUBLICATIONS

- 1 -H. PRATS., B. MARTIN., P. POGNONEC., A.C.BURGER et J.P. CLAVERYS.
A plasmid vector allowing positive selection of recombinant plasmids in *Streptococcus pneumoniae*.
GENE (1985) **39**, 41-48
- 2 -A. GEGONNE., P. POGNONEC., D. LEPRINCE., D. DERNIS., E. REMAUT., D. STEHELIN et J. GHYSDAEL.
Preparation and characterization of specific antisera directed against different polypeptidic domains encoded by the v-ets oncogene of the avian acute leukemia virus E26.
C.R. Acad. Sc. Paris (1986) **303**, Série III N°7 : 253-256
- 3 -J. GHYSDAEL., A. GEGONNE., P. POGNONEC., D. DERNIS., D. LEPRINCE et D. STEHELIN.
Identification and preferential expression in thymic and bursal lymphocytes of a cellular ets oncogene encoded 54 000 Mr cytoplasmic protein.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1986) **83**, 1714-1718
- 4 -J. GHYSDAEL., A. GEGONNE., P. POGNONEC., K.E. BOULUKOS., D. LEPRINCE., D. DERNIS., C. LAGROU et D. STEHELIN.
Identification in chicken macrophages of a set of proteins related to, but distinct from the chicken cellular c-ets-encoded protein P54c-ets.
EMBO Journal (1986) **5**, 2251-2256.
- 5 -A. GEGONNE., D. LEPRINCE., P. POGNONEC., D. DERNIS., M.B. RAES., D. STEHELIN et J. GHYSDAEL.
The 5' and 3' extremities of the v-ets oncogene of avian leukemia virus E26 encoded amino-acid sequences not derived from the c-ets-encoded cellular proteins
Virology (1987)**156**, 177-180
- 6 -M. DAVID., O. DOUMERGUE., P. POGNONEC., et D.KAHN.
Transcription patterns of *Rhizobium meliloti* symbiotic plasmid pSym : Identification of nif-A-independent fix genes.
J. Bacteriol.(1987) **109**, 2239-2244.
- 7 -K.E. BOULUKOS., P. POGNONEC., A. BEGUE., F. GALIBERT., J.C. GESQUIERE., D. STEHELIN et J. GHYSDAEL.
Identification in chickens of an evolutionarily conserved cellular ets-2 gene (c-ets-2) encoding nuclear proteins related to products of the c-ets proto-oncogene.
EMBO J. (1988), **7**, 697-705.
- 8 -P. POGNONEC., K.E. BOULUKOS., A. GEGONNE., M. BAILLY., D. STEHELIN et J. GHYSDAEL.
Identification and differential expression of the proteins encoded by the c-ets-1 and c-ets-2 proto-oncogenes.
Arch. Int. Physiol. Biochem. (1988), **96**,B51.
- 9 -P. POGNONEC., K.E. BOULUKOS., J.C. GESQUIERE., D. STEHELIN et J. GHYSDAEL.
Mitogenic stimulation of thymocytes results in the calcium-dependent phosphorylation of the c-ets-1 protein.
EMBO J. (1988), **7**, 977-983.
- 10 -P. POGNONEC., K.E. BOULUKOS et J. GHYSDAEL.
The c-ets-1 protein interacts with DNA in a phosphorylation dependent manner.
soumis à EMBO J.

GLOSSAIRE

A23187:	Ionophore de calcium.
ADN:	Acide Desoxynucléique.
AMV:	Avian Myeloblastosis Virus.
ARN:	Acide desoxyribonucléique.
ASV:	Avian Sarcoma Virus.
ConA:	Concanavaline A.
IBMX:	Iso Butyl-Methyl-Xanthine.
IL:	Interleukine.
IP₃:	Inositol Triphosphate.
kD:	Kilodalton.
pH:	Potentiel Hydrogène.
PKA:	Protéine Kinase A.
PKC:	Protéine Kinase C.
SDS:	Sodium Dodecyl Sulfate.
SV40:	Simian Virus 40.
TPA:	12-O-TetradecanoylPhorbol-13-Acétate.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.

I. Généralités.....	p14
II. Classification des oncogènes.....	p15
III. Approche sur la fonction des produits d'oncogènes.....	p16
IV. Précisions sur les produits d'oncogènes à localisation nucléaire.....	p17
V. Le calcium et son rôle dans l'activation lymphocytaire.....	p19
1. Présentation des lymphocytes T.....	p20
2. L'activation des lymphocytes T résulte en une augmentation de la concentration interne en calcium.....	p21
VI. Présentation du travail.....	p22

RESULTATS.

I. Présentation.....	p24
II. Caractérisation du produit de traduction prédominant de l'équivalent cellulaire de la portion <u>v-ets</u> du virus E26.....	p25
1. La protéine Ets-1 est évolutivement conservée.....	p26
2. Ets-1 est majoritairement localisée dans les noyaux cellulaires.....	p27
III. Etude de l'expression de Ets-1 au sein des cellules B et T.....	p29
1. Expression de Ets-1 au cours de la différenciation de la lignée B.....	p29
2. Expression de Ets-1 au cours de la maturation embryonnaire du thymus et de la différenciation des thymocytes.....	p30
3. Expression de Ets-1 dans les différentes sous-populations thymiques.....	p31
4. Expression de Ets-1 dans les lymphocytes T circulants.....	p32
5. Conclusion.....	p33
IV. Etude des modifications post-traductionnelles des protéines Ets-1 et de leurs régulation.....	p34
1. Le produit de traduction de <u>c-ets-1</u> est une phosphoprotéine.....	p34
2. La phosphorylation de Ets-1 requiert la présence de calcium dans le milieu.....	p36
3. Ets-1 est phosphorylée dans les secondes qui suivent une stimulation mitogénique sur les thymocytes.....	p37

4. Comparaison de la stabilité des formes phosphorylées de Ets-1 avec la demi-vie de Ets-1.....p38
5. Conclusion.....p39

- V. Ets-1 est une protéine pouvant interagir avec l'ADN.....p40**
1. Ets-1 est spécifiquement retenue sur une colonne d'ADN-cellulose.....p40
 2. Ets-1 perd son affinité pour l'ADN après phosphorylation.p42
 3. Ets-1 est associée à l'ADN in vivo.....p43
 - a. Solubilisation de Ets-1 en présence de forces ioniques croissantes.....p43
 - b. Solubilisation de Ets-1 par digestion de l'ADN chromosomique.....p44
 4. Effet des modifications post-traductionnelles de Ets-1 sur son affinité pour l'ADN chromosomique.....p45

DISCUSSION.....p47

BIBLIOGRAPHIE.....p50

ANNEXES.....p60

- ARTICLE 1: Identification and differential expression of the proteins encoded by the c-ets-1 and c-ets-2 proto-oncogenes.....p61
- ARTICLE 2: Mitogenic stimulation of thymocytes results in the calcium-dependent phosphorylation of the c-ets-1 protein.....p63
- ARTICLE 3: The c-ets-1 protein interacts with DNA in a phosphorylation dependent manner.....p71

INTRODUCTION

I. Généralités.

Après la découverte par P. Rous (P. Rous, 1911) d'un agent responsable de sarcomes aviaires, en 1911, il fallut attendre près de 60 ans pour voir apparaître l'idée du mode de fonctionnement de ce type d'agents, maintenant appelé rétrovirus, par référence aux mécanismes spécifiques de leur réplication. En effet, en 1972, G. Todaro et R. Huebner (J. Todaro et R. Huebner, 1972) proposaient pour la première fois le modèle selon lequel les rétrovirus pourraient intégrer dans leur génome une information cellulaire, appelée oncogène, responsable de l'activité transformante de ces virus. Ce modèle était confirmé quatre années plus tard par les travaux de D. Stéhelin et al., (D. Stéhelin et al., 1976) qui démontraient, en effet, que la séquence *v-src* du virus du sarcome de Rous (RSV) était représentée dans les génomes de cellules aviaires non infectées. Peu de temps après, D. Spector et al. (D. Spector et al., 1978) montraient que la séquence *c-src* n'était pas spécifique aux aviaires comme il avait été initialement proposé, mais était également présente chez les mammifères. Depuis, une quantité impressionnante d'études ont montré que cette conservation de séquences oncogéniques au cours de l'évolution était vraie non seulement pour *src*, mais aussi pour tous les autres oncogènes. Citons par exemple le cas de l'oncogène *ras*, dont une séquence homologue a été caractérisée chez la levure, évolutivement éloignée de plusieurs millions d'années de l'homme! (D. Defeo et al., 1983).

Or, il a été observé que les enzymes clés de la machinerie cellulaire, telles les DNA polymérases ou les RNA polymérases, sont très conservées des procaryotes jusqu'à l'homme (Wong et al., 1988; Allison et al., 1985), démontrant le peu de latitude de modification laissé à ces produits cruciaux. Il était donc raisonnable de supposer que la conservation phlogénétique des séquences oncogènes, ainsi que les effets biologiques étonnants des virus les ayant intégrées, reflétaient des fonctions fondamentales pour ces produits dans la vie cellulaire.

L'importance des protéines oncogènes dans la physiologie cellulaire est illustrée par le schéma 1, dont le seul intérêt est de permettre au lecteur d'appréhender le large spectre d'action de ces différents produits. Précisons cependant que ce schéma ne représente pas une réalité biologique, mais regroupe en une cellule imaginaire bon nombre des fonctions connues ou présumées des produits de certains oncogènes.

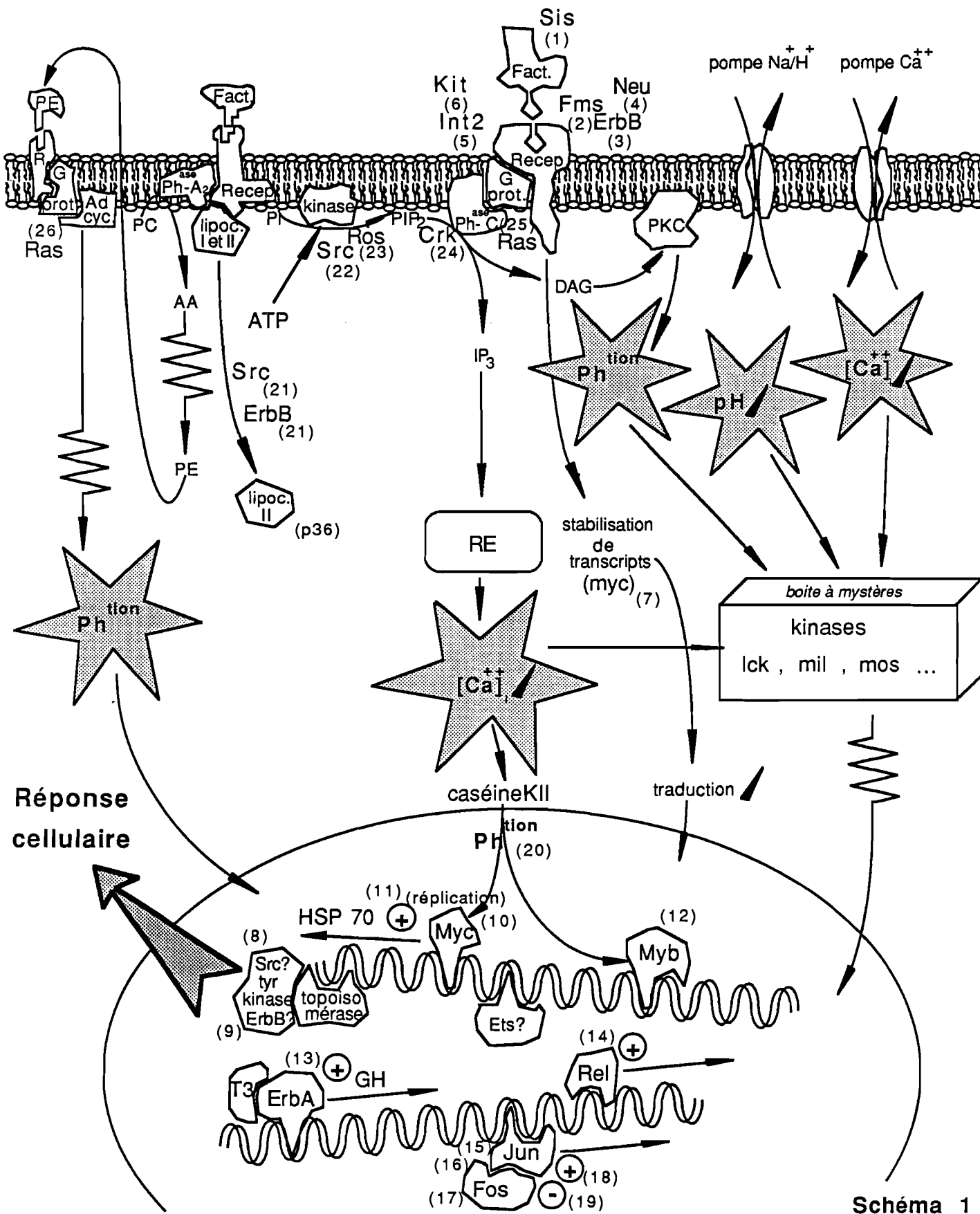


Schéma 1

II. Classification des oncogènes.

Ces différents produits d'oncogènes ont été classés en trois grandes catégories:

i. la classe des oncogènes dont les produits sont homologues à certains récepteurs de facteurs de croissance:

fms: CSF1recept., *erbB*: EGFrecept.; *erbB2/neu*?; *kit*: proche du PDGFrecept...

et à certains facteurs de croissance:

sis: PDGF_β, *int2*: FGF.

Ces produits sont impliqués dans la réception de signaux par la cellule et sont par conséquent présents sur la membrane plasmique.

ii. la classe des oncogènes dont les produits sont impliqués dans la transmission des signaux reçus par la membrane plasmique. Ce sous-ensemble comprend une majorité de protéines kinases:

src: tyr kinase, *ros*: tyr kinase, *yes*: tyr kinase, *abl*: tyr kinase, *fps/fes*: tyr kinase, *trk*: tyr kinase, *lck*: tyr kinase, *raf/mil*: ser/thr kinase, *mos*: ser/thr kinase, ...

et *ras*, une famille de protéines G.

Références citées sur le schéma 1:

1 : R.F.	Doolittle et al.,	1983.	2 : C.J.	Sherr et al.,	1985.
3 : J.	Downward et al.,	1984.	4 : A.L.	Schechter et al.,	1984.
5 : C.	Dickson et al.,	1987.	6 : Y.	Yarden et al.,	1986.
7 : J.M.	Blanchard et al.,	1985.	8 : B.	Mroczkowski et al.,	1984.
9 : M.	Basu et al.,	1985.	10: S.M.	Iguchi et al.,	1987.
11: R.E.	Kingston et al.,	1984.	12: H.	Bading et al.,	1987.
13: B.M.	Forman et al.,	sous presse	14: C.	Gelinas et al.,	en préparation
15: K.	Lech et al.,	1988.	16: F.J.	Rauscher et al.,	1988.
17: D.	Bohman et al.,	1987.	18: R.	Chiu et al.,	1988.
19: P.	Sassone et al.,	1988a.	20: B.	Luscher et al.,	en préparation
21: K.S.	Huang et al.,	1986.	22: Y.	Sugimoto et al.,	1984.
23: I.G.	Macara et al.,	1984.	24: B.J.	Mayer et al.,	1988.
25: M.J.	Wakelam et al.,	1986.	26: T.	Toda et al.,	1985.

iii. la classe des oncogènes dont les produits sont localisés dans le noyau cellulaire, et qui sont impliqués dans l'expression génique, et probablement dans la réplication de l'ADN pour certains. Ils constituent donc l'étape ultime de la transmission des signaux reçus par la cellule:

myc, fos, jun, rel, erbA, myb, ski, ets, etc ...

III. Approche sur la fonction des produits d'oncogènes.

Ces nombreux oncogènes ont tous été caractérisés grâce aux propriétés radicales de leurs produits sur la physiologie cellulaire. De très nombreux systèmes biologiques ont été analysés, et il a été amplement démontré que tous pouvaient, généralement par suite de légères modifications structurales, appelées activations (J. McGrath et al.,1984), ou même par simple sur-expression (P. Martin et al.,1986, S. Gisselbrecht et al.,1987), perturber complètement les cellules dans lesquelles ils s'exprimaient.

Cette première étape, nécessaire à la mise en évidence de ces gènes, n'a cependant pas permis d'élucider la fonction physiologique des produits des oncogènes, qui seule permettra d'approcher le rôle des protéines oncogènes dans les processus cancéreux. A l'heure actuelle, seuls quelques produits d'oncogènes ont été fonctionnellement caractérisés, en général par comparaison des séquences nucléiques dirigeant leur synthèse avec celles de gènes codant pour des produits déjà fonctionnellement caractérisés (Sis (R. Doolittle et al.,1983) et ErbB (J. Downward et al.,1984), par exemple). Une seconde approche, quand les banques de séquences nucléiques ne permettent pas cette détermination, consiste à étudier directement les produits d'oncogènes afin de déterminer s'ils peuvent, d'une manière ou d'une autre, interagir avec un processus déjà connu. C'est ce type de démarche qui a permis de démontrer l'implication de Fos, Jun et plus récemment de Rel dans la régulation transcriptionnelle.

IV. Précisions sur les produits d'oncogènes à localisation nucléaire.

Etant donnés les résultats que nous allons présenter dans ce manuscrit, il nous paraît utile de rappeler brièvement les connaissances actuelles sur certains oncogènes nucléaires qui, nous l'avons déjà dit, sont impliqués ou suspectés d'être impliqués dans la régulation de l'expression génique ou/et dans la réplication du génome. Ainsi, ErbA, codé par le progéniteur de l'oncogène *v-erbA*, présent dans le rétrovirus aviaire AEV, est en fait le récepteur de l'hormone thyroïdienne 3,3',5 triodo thyronine (Sap et al, 1986). Ce récepteur, lorsqu'il est occupé par l'hormone thyroïdienne, se comporte comme un activateur transcriptionnel (S.Izumo et V.Mahdavi., 1988; B. Forman et al., 1988). Myc, codé par un gène dont un équivalent viral existe dans plusieurs rétrovirus indépendants, semble jouer quant à lui un rôle dans la promotion de la réplication de l'ADN (S. Igushi et al, 1987). D'autre travaux (R.Kingston et al, 1984) montraient cependant que la protéine Myc serait impliquée dans la régulation transcriptionnelle du gène codant pour la protéine dite de "choc thermique" Hsp 70. Ceci semble indiquer qu'un même oncogène puisse coder pour un produit assurant une fonction à la fois dans la réplication de l'ADN et dans la transcription de certains gènes. Cette potentielle bivalence n'est pas sans précédent; en effet les résultats obtenus sur NF1 montre, sans ambiguïté, que ce facteur possède cette double fonction (C. Santoro et al., 1988).

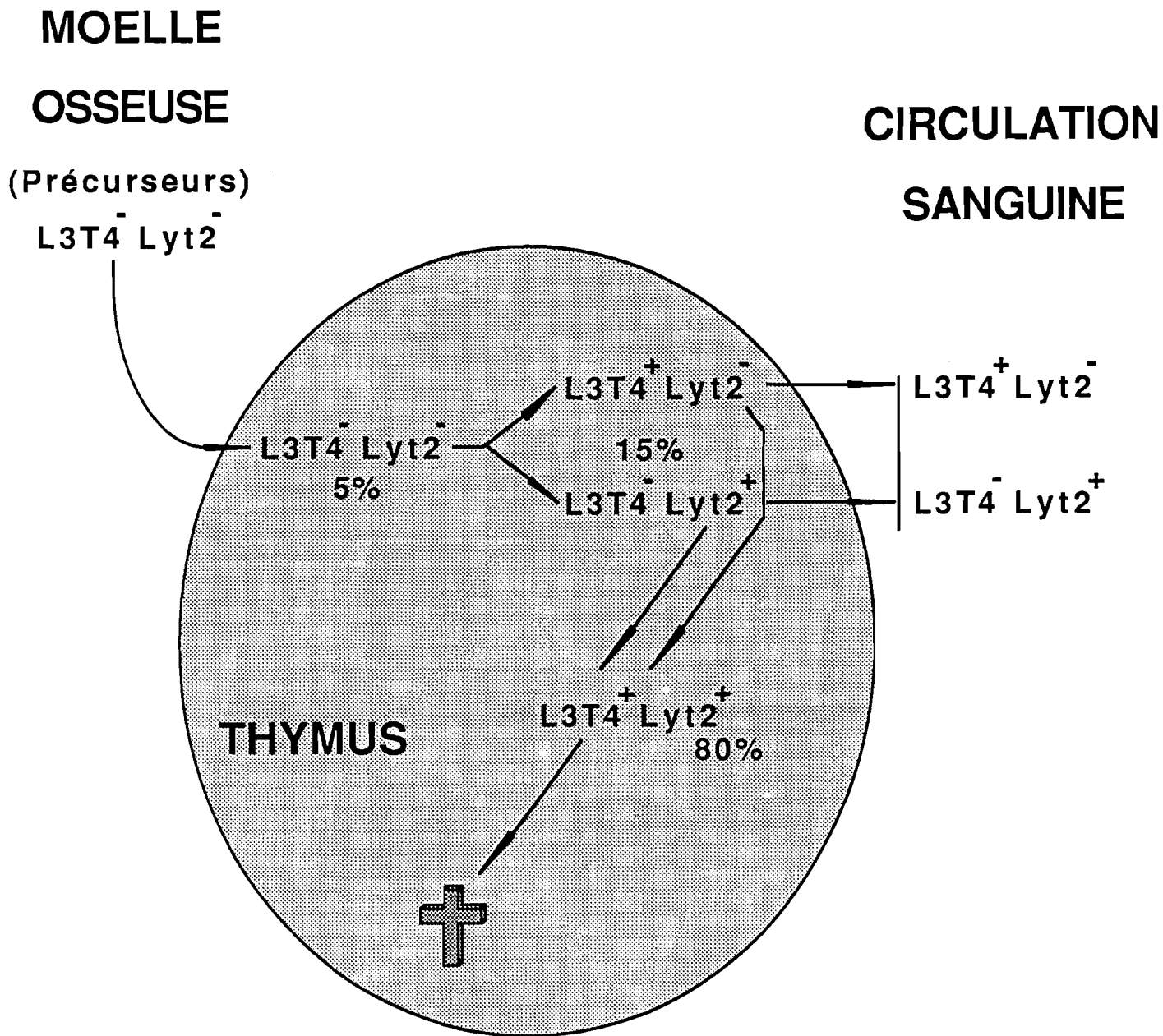
Fos et Jun: deux protéines oncogènes nucléaires fonctionnellement complémentaires.

Nous allons insister plus particulièrement sur le cas des produits des oncogènes *c-fos* et *c-jun*, puisque leur fonction est sans doute la mieux connue à l'heure actuelle parmi les produits d'oncogènes à localisation nucléaire. De plus, ils fournissent le seul exemple connu à l'heure actuelle de collaboration fonctionnelle directe entre deux

oncogènes.

c-fos est remarquable par le fait que sa transcription est immédiatement activée lorsque les cellules sont mises en présence de divers facteurs de différenciation ou de croissance (M. Greenberg et E. Ziff., 1984; W. Kruijer et al., 1984; R. Müller et al., 1984). Cette réponse, qui est suivie d'une augmentation parallèle de la traduction de *c-fos*, est transiente et l'état de régime est généralement retrouvé une heure après la stimulation initiale. Or, il a été démontré que Fos, bien qu'indirectement (P. Sassone et al., 1988c sous presse), était associé à l'ADN, tant *in vitro* que *in vivo* (L. Sambucetti et T. Curran., 1986; M. Renz et al., 1987). Ceci permettait d'imaginer un rôle direct de Fos dans le contrôle génique de la cellule en réponse à une stimulation externe. Cette hypothèse fut confirmée par le fait que Fos, lorsqu'il est fusionné à la portion de la protéine bactérienne LexA permettant une interaction spécifique avec certaines séquences nucléiques trouvées dans les régions promotrices de divers gènes, entraîne une activation spécifique de ces mêmes gènes (K. Lech et al., 1988).

Cette élégante démonstration de l'effet de Fos sur la transcription s'est trouvée confortée par l'étude d'une protéine, originellement appelée p39 à défaut de mieux, et qui est associée de façon non covalente à Fos (T. Curran et al., 1985). Cette protéine s'est en fait révélée être immunologiquement et structurellement indistinguishable de AP1, un facteur de transcription (F. Rauscher et al., 1988; P. Sassone et al., 1988a). Remarquablement, une partie du gène codant pour p39/AP1 a été transduit par un virus aviaire, créant le virus maintenant appelé ASV17 (F. Cavalieri et al., 1985), et dont la séquence responsable de ses propriétés transformantes a été initialement dénommée *v-jun* (Y. Maki et al., 1987). Ce rétrovirus a la capacité d'induire des fibrosarcomes chez le poulet et de transformer des fibroblastes *in vitro*. Etant donné l'infime probabilité de trouver deux protéines, isolées indépendamment, s'associer l'une à l'autre et posséder des activités transformantes, il était clair que cette association devait refléter une complémentarité fonctionnelle. Ceci a rapidement été démontré à l'aide d'un système de gène rapporteur incluant dans son promoteur l'heptanucléotide reconnu par AP1/Jun. La transcription du gène rapporteur n'était en effet optimale que lorsque Fos et Jun étaient simultanément disponibles (R. Chiu et al., 1988). Il est intéressant de noter que dans ce couple fonctionnel d'oncogènes, seul Jun interagit directement et spécifiquement avec l'ADN, reconnaissant la séquence TGACTCA. Fos semble requis pour potentialiser l'effet activateur intrinsèque de Jun, et jouerait donc un rôle de trans-activateur. Tout ceci est indirectement confirmé par le fait que, ainsi que Fos, Jun/AP1 est induit immédiatement après stimulation cellulaire



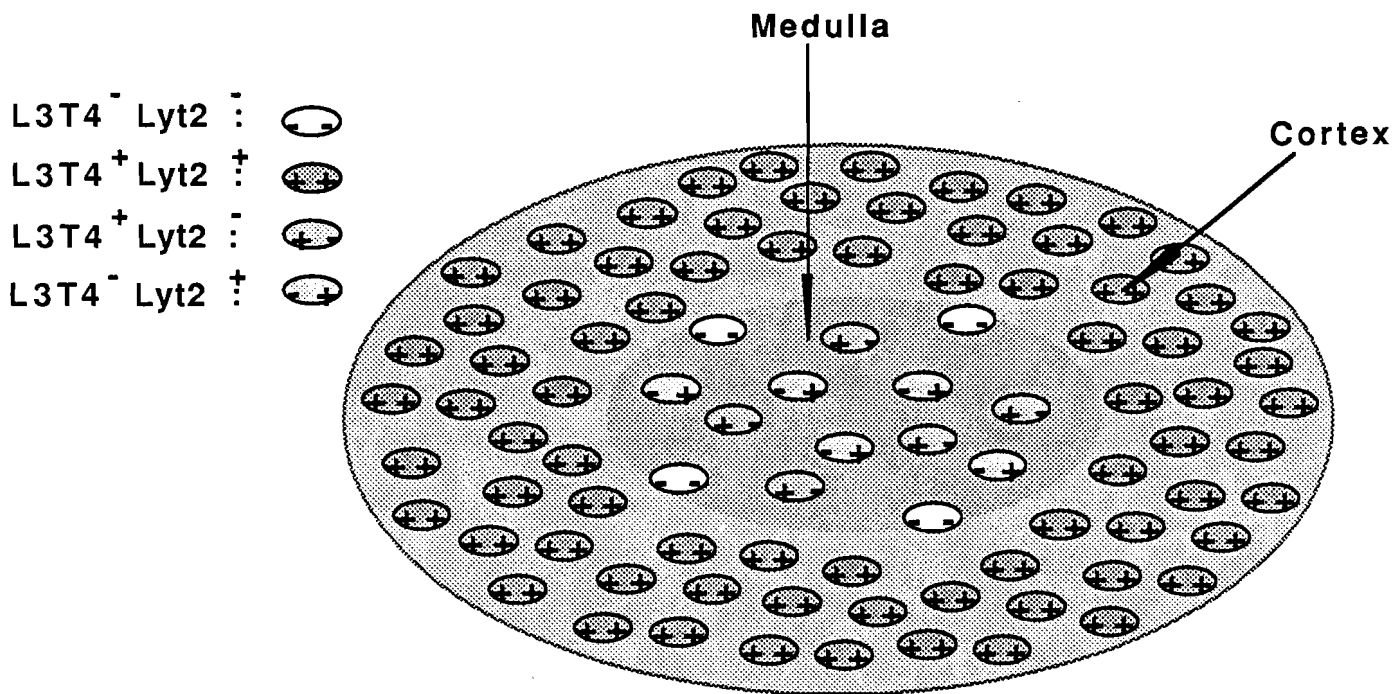
Maturation des lymphocytes T suivie à l'aide
des marqueurs de surface Lyt2 et L3T4.

par divers facteurs, et d'une manière absolument identique à Fos (W. Lamph et al., 1988). Pour terminer cette rapide revue sur Fos et Jun, précisons que Fos, ainsi que l'ensemble des produits d'oncogènes localisés dans le noyau, est modifié post-traductionnellement par phosphorylation. Cette phosphorylation, affectant des résidus sérines, est stimulée par le TPA, bien que la protéine kinase C (PKC) n'en soit apparemment pas responsable (J. Barber et al., 1987). De plus, il semble que cette modification post-traductionnelle affecte la capacité du complexe Fos/Jun d'interagir avec l'ADN (R. Müller et al., 1987), ce qui est en apparence contradiction avec l'observation selon laquelle le traitement de cellules à l'aide de TPA résulte en une augmentation de l'affinité apparente de Jun/AP1 pour sa séquence cible (P. Angel et al., 1987). Cette observation permet de supposer que Fos pourrait, selon les autres facteurs avec lesquels il interagit, avoir aussi bien une fonction d'activateur de la transcription que de répresseur transcriptionnel. En effet, il a pu être démontré que Fos, encore en association avec Jun/AP1, avait un effet rétrorégulateur sur son propre promoteur (P. Sassone., 1988b). Ce type d'effet pléiotropique est bien connu chez les procaryotes, où le facteur Cro du bactériophage lambda présente également ce double comportement d'activateur/répresseur de la transcription (F. Bushman et M. Ptashne., 1988). Il semble que, au moins dans ce cas, l'acidité de certains domaines ait une importance cruciale dans l'activité du facteur. Ceci laisse penser qu'une situation analogue pourrait être également responsable des effets opposés observés pour Fos. Ainsi, selon le degré de phosphorylation de Fos, l'acidité de certains domaines impliqués dans des interactions avec d'autres facteurs présents dans le même complexe transcriptionnel pourrait être modifiée, modulant ainsi l'activité globale de ce complexe sur la transcription.

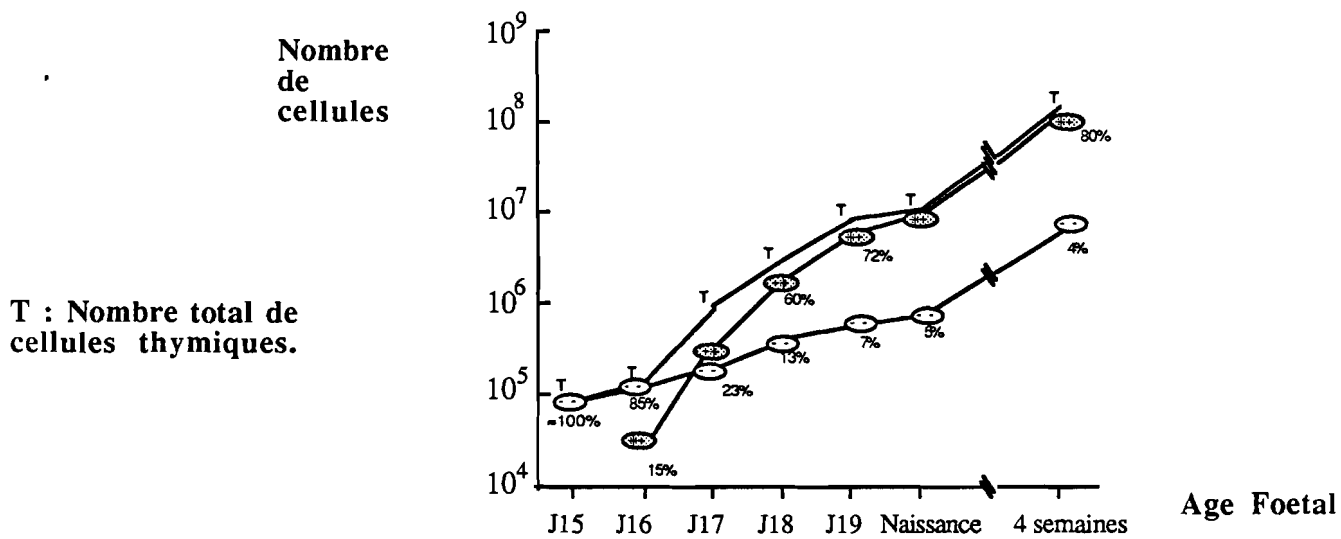
V. Le calcium et son rôle dans l'activation lymphocytaire.

Enfin, pour terminer cette introduction, il nous semble nécessaire de rappeler le fonctionnement de l'un des systèmes de transduction de signaux reçus par la membrane plasmique, étant donné l'importance qu'il tient dans la compréhension des résultats du travail que nous allons présenter dans la suite de ce manuscrit.

Si l'on se rapporte au schéma synthétique grossier que nous avons présenté plus haut, ces systèmes "classiques" sont présentés dans des éclairs, symbolisant la



Localisation des différentes sous-populations thymiques.
Schéma3



Evolution des différentes sous-populations thymiques au cours du développement du thymus

D'après Raulet et al., 1985.

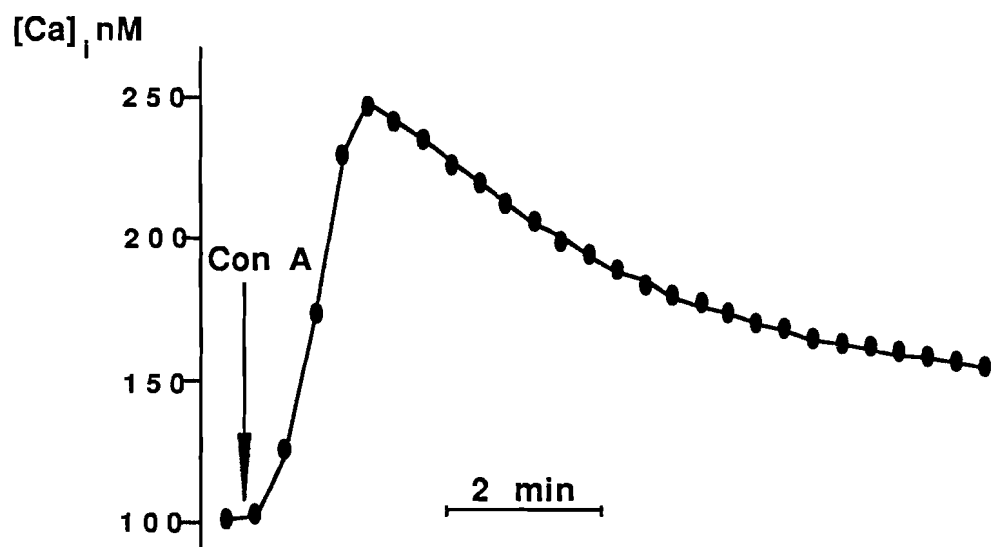
Figure 1

cascade d'évènements qu'ils vont déclencher pour finalement permettre une nouvelle programmation de l'expression génique, en réponse au stimulus initial. On trouve parmi eux une augmentation du pH intracellulaire, une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium, et de nombreux évènements de phosphorylation dus aux kinases activées à la suite de la stimulation cellulaire. Nous allons nous intéresser aux fluctuations de la concentration intracellulaire en calcium, ou encore $[Ca^{++}]_i$, et plus particulièrement dans le cas des lymphocytes T.

1. Présentation des lymphocytes T.

Ces cellules sont impliquées dans la défense immunitaire de l'organisme, et sont produites au sein d'un organe spécialisé, le thymus, dès le premier tiers du développement embryonnaire (F. Jotereau et N. Le Douarin, 1982). Le processus précis de maturation de ces cellules est mal compris et donc sujet à controverses, mais peu globalement être décrit comme indiqué sur le schéma 2 (R. Scollay et al., 1984).

Deux marqueurs de surface sont utilisés afin de pouvoir distinguer entre plusieurs sous-populations. Ces marqueurs, Lyt2 et L3T4 chez la souris, T8 et T4 chez l'homme, permettent de sélectionner une population thymique dépourvue de ces molécules de surface, et donc appelée $Lyt2^-L3T4^-$. Cette population, la seule présente dans les premiers stades de formation du thymus (R. Ceredig et al., 1983), et constituant environ 4% des thymocytes matures, engloberait les précurseurs de tous les autres thymocytes (R. Kingston et al., 1985). La population définie par la présence des deux marqueurs simultanément, et représentant la majorité des thymocytes matures (environ 80%), représenterait les cellules éliminées lors du processus de maturation des lymphocytes T. Cette population se trouve localisée dans le cortex du thymus. Enfin, les populations définies par la présence de l'un des deux marqueurs représenteraient les précurseurs directs des lymphocytes T fonctionnels et circulants, dits cytotoxiques pour la classe $Lyt2^+L3T4^-$ et dits auxiliaires pour la classe $Lyt2^-L3T4^+$, représentant ensemble environ 15% des thymocytes matures. Ces données sont reprises sur la figure 1 et sur le schéma 3. Notons enfin que les thymocytes sont des cellules proliférant activement, alors que les lymphocytes T circulants sont eux, hors stimulation, quiescents.

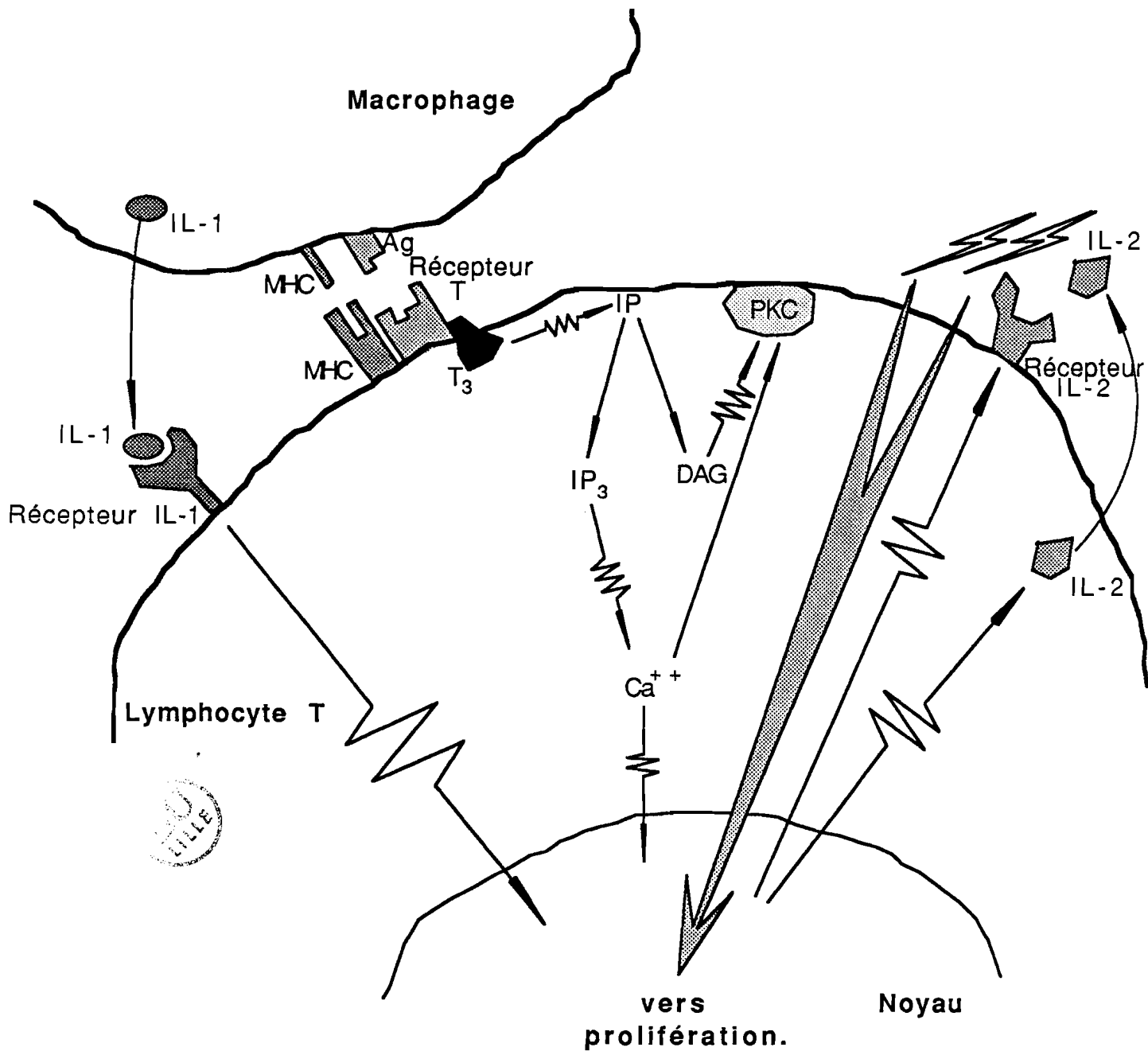


Effet d'une stimulation à l'aide de la lectine concanavaleine A sur la concentration interne en calcium de thymocytes murins

(d'après Hesketh et al., 1985).

2. L'activation des lymphocytes T résulte en une augmentation de la concentration interne en calcium.

Les cellules T, lorsqu'elles sont stimulées par leur antigène, voient systématiquement leur $[Ca^{++}]_i$ augmenter, et ceci dès les premières secondes, pour atteindre un maximum vers 2 min (R. Tsien et al., 1982), et rejoindre ensuite lentement leur état de régime, comme représenté sur la figure 2. Cette augmentation de $[Ca^{++}]_i$, si une interleukine dite IL2 est présente dans le milieu, amènera les lymphocytes à se diviser, accroissant par là même l'efficacité de la réponse immunitaire. Il a pu être montré que les thymocytes, bien que par définition non encore pleinement fonctionnels, sont également capables du même type de réponse (T. Finkel et al., 1987). Plus intéressant encore, il a été démontré que l'effet mitogène dû à l'interaction d'un antigène avec le récepteur T pouvait être imité par un traitement simultané à l'aide de TPA, activateur direct de la PKC, et de l'ionophore de calcium A23187 (A. Truneh et al., 1985), démontrant ainsi l'effet capital de l'augmentation de $[Ca^{++}]_i$ dans la stimulation mitogénique des cellules T. Le schéma 4 résume les principales étapes de l'activation naturelle d'un lymphocyte T, et l'on retrouve les rôles clefs du calcium et de la PKC. Un macrophage, après avoir reconnu et processé un antigène, présente un épitope de ce dernier en conjonction avec un de ses complexes d'histocompatibilité majeure (MHC) au récepteur d'un lymphocyte T associé au récepteur MHC de même classe. Simultanément, le macrophage secrète une interleukine, l'IL1, qui va venir interagir sur un des récepteurs de l'IL1 du lymphocyte T, déclenchant ainsi un processus aboutissant à la production de récepteurs de l'IL2 sur la membrane plasmique de ce lymphocyte, ainsi qu'à la synthèse de l'interleukine correspondante par les lymphocytes T auxiliaires. Parallèlement, le récepteur T, par l'intermédiaire d'un facteur intramembranaire appelé T3 et en réponse à l'antigène présenté, va dégrader les phosphatidyl inositols de la membrane en inositol triphosphates (IP3) d'une part, et en diacylglycérols d'autre part. Ces derniers, en conjonction avec le calcium libéré par l'intermédiaire de l'IP3, vont activer la PKC, qui participera à la réponse du récepteur de l'IL2 à l'IL2, permettant finalement le déclenchement de la prolifération lymphocytaire (H. Mc Donald, 1986).



Activation d'un lymphocyte T

VI. Présentation du travail.

La suite de cette présentation illustre le travail que nous avons effectué sur un des produits oncogènes à localisation nucléaire, appelé Ets-1, et exprimé à haut taux dans les cellules lymphoïdes.

Ets-1 est le produit de traduction majoritaire du locus *c-ets-1* (J. Chen, 1985; J. Ghysdael et al., 1986), évolutivement conservé. Ce même locus, par le biais d'un phénomène d'épissage alternatif de son ARN prémessager, a fourni la séquence *v-ets* qui a été transduite dans le génome d'un rétrovirus aviaire, en compagnie d'une autre séquence oncogène, appelée *v-myb*, pour former le rétrovirus connu sous le nom de E26 (D. Leprince et al., 1988).

Ce locus *c-ets-1*, comme son nom l'indique, appartient à une famille de gènes comprenant également, à l'heure actuelle, les gènes *c-ets-2* (D. Watson et al., 1985; K. Boulukos et al., 1988) et *erg* (E. Reddy et al., 1987).

Le lecteur rencontrera tout d'abord une première partie dans laquelle nous présenterons le produit de traduction majoritaire de *c-ets-1*.

Dans une seconde partie, nous détaillerons nos résultats quant au spectre d'expression de Ets-1 au sein des lymphocytes B et des lymphocytes T.

Dans une troisième partie nous analyserons les modifications post-traductionnelles affectant Ets1, ainsi que leur régulation.

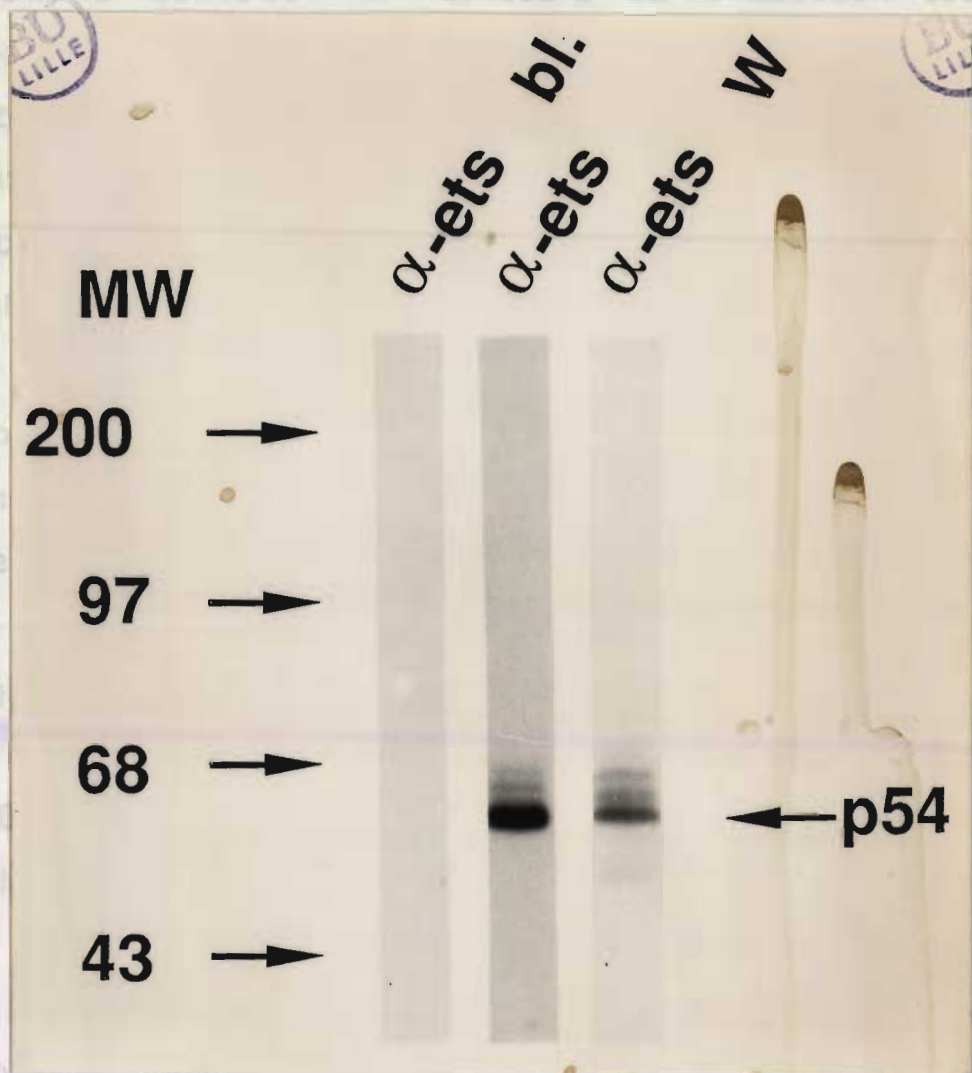
Enfin, nous terminerons en montrant que Ets-1 est capable d'interagir avec l'ADN, in vitro comme in vivo, et que cette interaction est directement modulée par la phosphorylation de Ets-1.

RESULTATS

I. Présentation.

Afin de comprendre l'intérêt initialement porté à l'oncogène *ets*, il est nécessaire de présenter un rétrovirus aviaire induisant des myéloblastoses chez le poulet dès les premières semaines suivant l'infection. Ce rétrovirus, appelé AMV pour **A**vian **M**yeloblastosis **V**irus, contient en son génome, en plus des autres séquences caractéristiques de ce type de virus, une séquence transduite d'un chromosome aviaire, et dénommée *myb* pour son pouvoir myéloblastosant (M. Roussel et al., 1979; K. Klempnauer et al., 1982). Curieusement, un autre rétrovirus aviaire, appelé E26, s'est révélé être également porteur d'une séquence *v-myb*, mais accompagnée d'une autre séquence sans rapport aucun avec les séquences caractéristiques des rétrovirus aviaires. La pathologie entraînée par E26 s'est révélée plus complexe que celle entraînée par AMV, puisque les poulets infectés développaient une leucémie mixte touchant à la fois la lignée myéloïde et la lignée érythroïde, avec une nette prépondérance pour la lignée érythroïde (K. Radke et al., 1982; K. Bister et al., 1982). La séquence inconnue accompagnant *v-myb* a donc été suspectée d'être la cause de la transformation érythroïde. Cette séquence, décryptée en 1984 et baptisée *ets*, pour "erythroid specific" (M. Nunn et al., 1983), ou **E**-**t**went**y**-**s**ix (D. Leprince et al., 1983), n'a malheureusement pas livré de structure déjà connue, si ce n'est une vague similarité, à la frontière du significatif, avec CDC4 et CDC36, des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire de la levure (T. Peterson et al., 1984). Les résultats obtenus depuis sa description originale n'ont pas permis, à l'heure actuelle et à notre connaissance, de préciser de façon non ambiguë le rôle biologique de la séquence *v-ets*.

est nécessaire de présenter un rétrovirus ayant induisant des
 Afin de comprendre l'intérêt initialement porté à l'oncogène etc. il



Produit de traduction majoritaire du locus c-ets-1 mis en évidence par immunoprécipitation (α -ets) et par transfert sur membrane selon la technique dite de Western (α -ets W).

α -ets-bl. représente une immunoprécipitation effectuée à l'aide du sérum bloqué par préincubation en présence de son antigène bactérien.

II. Caractérisation du produit de traduction prédominant de l'équivalent cellulaire de la portion v-ets du virus E26:

Un travail préalable effectué au laboratoire a permis l'obtention d'un sérum dirigé contre une portion de la partie v-ets de la protéine de fusion du virus E26 exprimée en bactérie. Ce sérum, reconnaissant donc la protéine virale de E26, a été utilisé afin d'immunoprécipiter divers lysats de cellules métaboliquement marquées à l'aide de méthionine ³⁵S. Cette étude générale nous a alors permis de mettre en évidence deux produits de traductions différents (J. Ghysdael et al., 1986a):

Le premier, dénommé Ets-1, est fortement similaire à la portion v-ets de la protéine virale de E26, hormis pour ses premiers acides aminés, dont la différence est le résultat d'un évènement d'épissage alternatif du transcrit synthétisé à partir du gène cellulaire précurseur de la séquence virale v-ets. Les derniers acides aminés divergent également entre Ets-1 et la portion virale correspondante (M. Duterque-Coquillaud et al., 1988; J. Chen, 1988).

Le second, aujourd'hui appelé Ets-2, comporte évidemment des séquences hautement similaires, puisqu'il est reconnu par le même sérum, mais également des séquences complètement divergentes (J. Ghysdael et al., 1986b). Il a été montré au laboratoire que ce produit correspondait en fait à la traduction d'un second gène présent chez le poulet, distinct du premier décrit, et comportant deux zones codantes similaires à celle de c-ets-1, séparées entre elles par une zone spécifique à c-ets-2 (K. Boulukos et al., 1988).

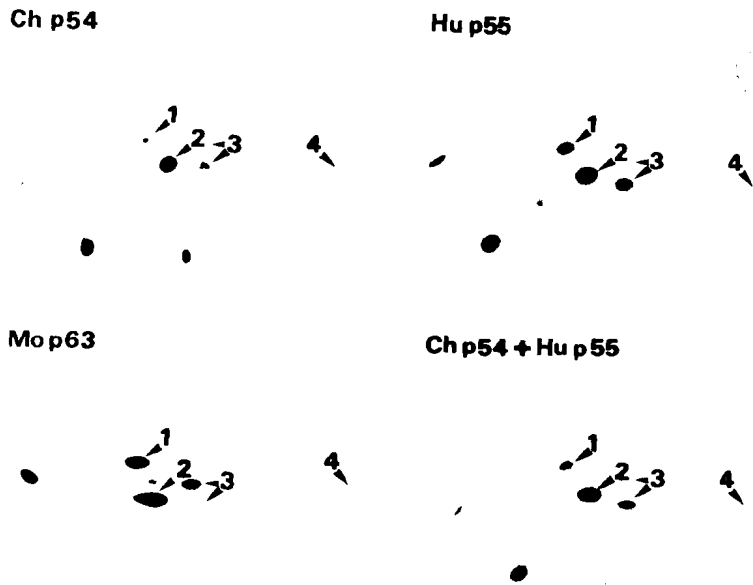
La protéine Ets-1, qui nous intéresse ici, bien que présente au moins à bas niveau dans l'ensemble des lignées et tissus analysés, est fortement exprimée dans les tissus et lignées lymphoïdes. Remarquons que le taux d'expression de cette protéine dans les cellules érythroïdes ne dépasse jamais le niveau basal généralement observé dans les autres populations

Human (B85)
 Mouse (thymocyte)



A

Caractérisation par immunoprécipitation des protéines Ets-1 chez l'homme (Human B85) et chez la souris (Mouse (thymocytes)).



B

Comparaison par analyse bidimensionnelle des peptides tryptiques des produits de traduction majoritaires des locus c-ets-1 aviaires (Ch p54), murins (Mo p63) et humain (Hu p55).

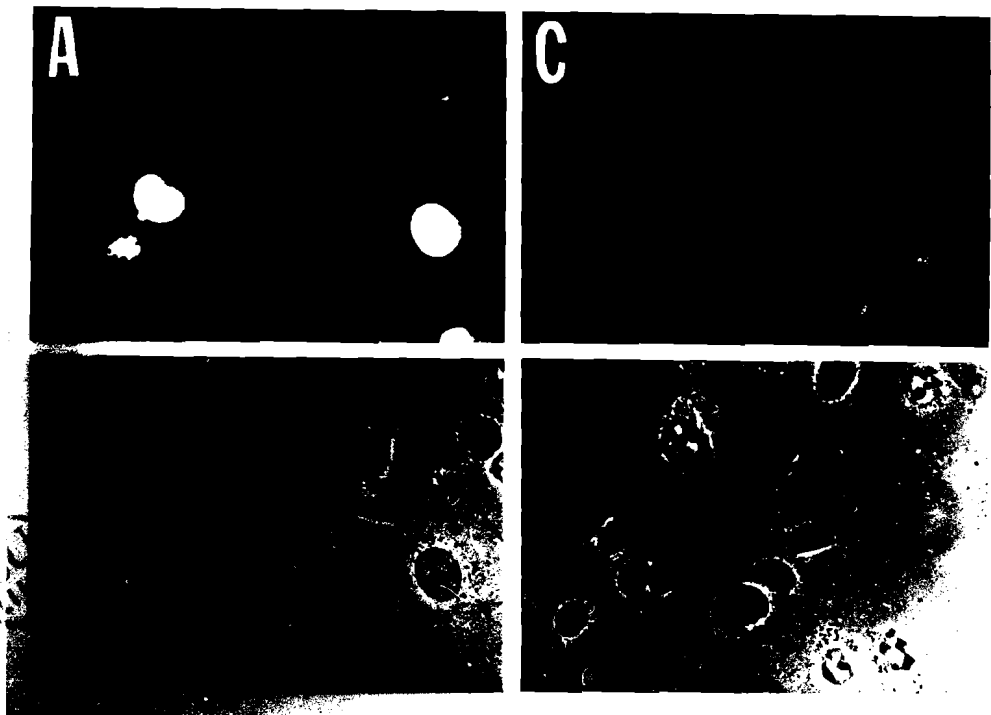
Les peptides strictement conservés sont indiqués par les flèches 1 à 4. La petite flèche 3 représente un état d'oxydation différentiel du peptide 3 retrouvé dans certaines expériences.

Figure 4

étudiées. Ceci indique que le spectre particulier du virus E26 par rapport à AMV ne se reflète pas par une surexpression du produit de traduction majoritaire du locus cellulaire ayant participé à la génèse de E26 dans la population cible spécifique de E26. La figure 3 présente le produit de traduction majoritaire du locus c-ets-1 du poulet. En migration sur gel de polyacrylamide-SDS, cette protéine a un poids moléculaire apparent de 54 kD, tant en transfert de Western (α -ets W) qu'en immunoprécipitation de lysats de thymocytes marqués par la méthionine radioactive (α -ets). La piste α -ets bl. correspond à un contrôle où le sérum α -ets utilisé a été préalablement incubé en présence d'un excès de son antigène bactérien, afin d'en bloquer la réactivité spécifique.

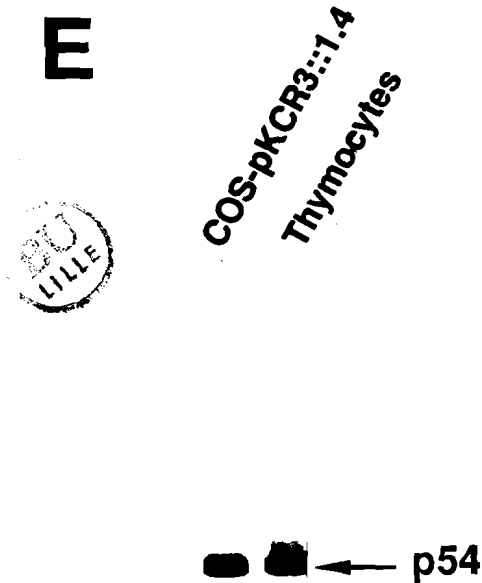
1. La protéine Ets-1 est évolutivement conservée.

Ainsi que nous l'avons présenté plus haut, une protéine jouant un rôle important dans la biologie cellulaire est soumise à une pression sélective importante, réduisant ainsi ses possibilités de modifications au cours de l'évolution. Afin de vérifier que Ets-1 est effectivement un des rouages principaux de la machinerie cellulaire, et non pas un gène spécifique aux aviaires, nous avons voulu savoir si notre sérum reconnaissait spécifiquement certains produits de cellules murines et humaines. Les résultats présentés sur la figure 4 montre que Ets-1 est effectivement évolutivement conservé, puisque des protéines de 63 kD chez la souris et de 55 kD chez l'homme sont spécifiquement immunoprécipitées par ce sérum (panneau A). Des analyses plus fines sur les peptides obtenus par digestion complète à l'aide de trypsine, et résolus sur cellulose après migration bidimensionnelle ont renforcé ce résultat (panneau B).



Visualisation par immunofluorescence de la protéine Ets-1 produite par expression de l'ADN complémentaire c-ets-1 exprimé par la construction transfectée dans des cellules eucaryotes.

A, B: analyse en épifluorescence à l'aide du sérum anti-ets et d'un sérum contrôle non-immun respectivement. C, D: image en contraste de phase des mêmes champs.



Comparaison de la protéine Ets-1 présente dans les thymocytes aviaires avec la protéine Ets-1 produite par expression de l'ADN complémentaire correspondant exprimé par la construction transfectée dans des cellules eucaryotes.

Figure 5

2. Ets-1 est majoritairement localisé dans les noyaux cellulaires:

Ne disposant d'aucune indication fiable sur la fonction de Ets-1, nous avons voulu savoir quelle était sa localisation subcellulaire, ce qui peut éventuellement permettre de se faire une idée grossière du type d'évènements dans lesquels le produit étudié peut être impliqué, ainsi que nous l'avons développé dans l'introduction.

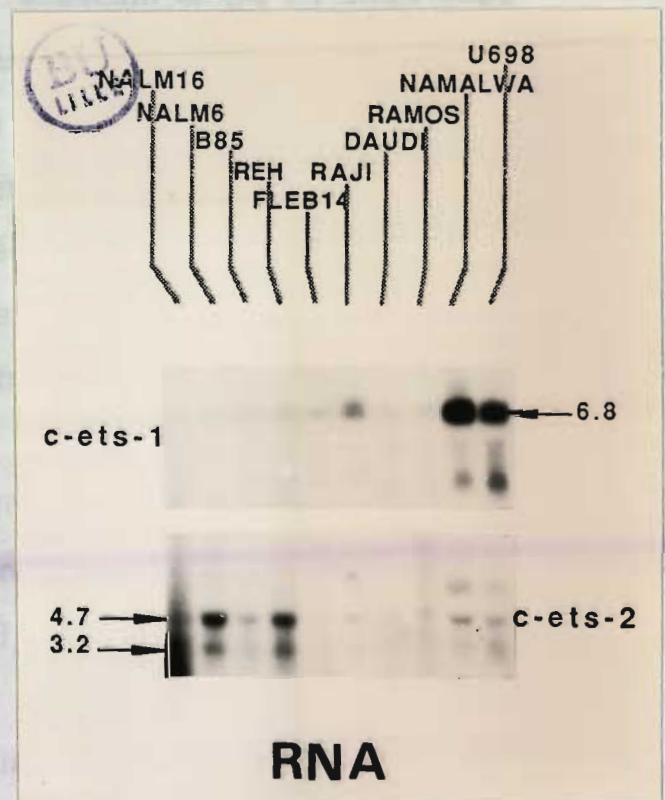
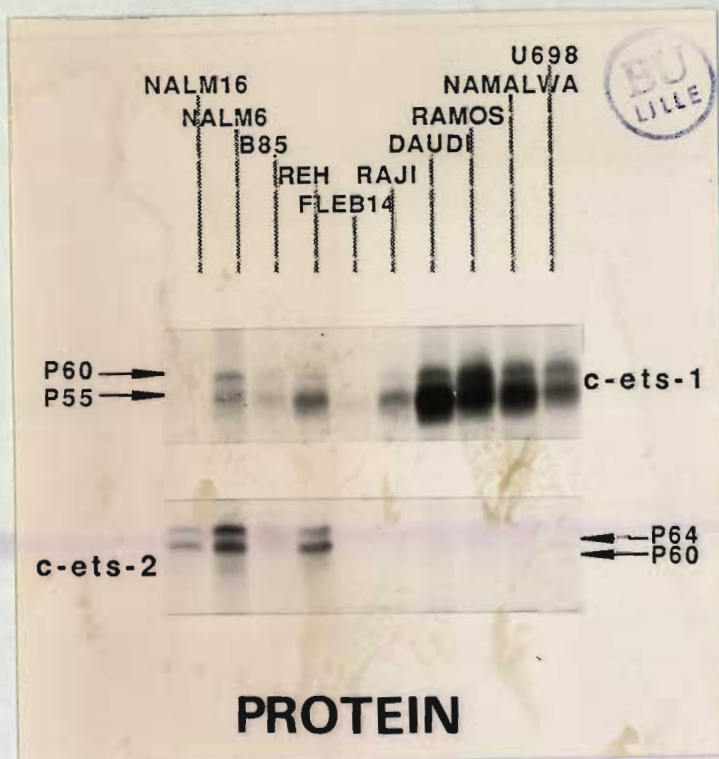
Une première approche, effectuée sur une lignée de lymphocytes T (MSB1), avait donné un résultat clair: un fractionnement de ces cellules dans des conditions telles que les contrôles nucléaires et cytoplasmiques choisis pour suivre la procédure de fractionnement (en l'occurrence les protéines nucléaires Myc endogènes, ainsi que les produits structuraux d'un rétrovirus aviaire introduit dans ces cellules, et dont les localisations membranaire (Env) et cytoplasmique (Gag) sont connues) se retrouvent dans leurs fractions respectives avait indiqué une localisation prépondérante de Ets-1 dans le cytosol de ces cellules. Cependant, des conditions plus douces résultaient en la présence d'environ 50% de Ets-1 dans les noyaux. Notons que la signification des résultats de ces expériences est sujette à discussion, étant donné qu'alors les protéines contrôles de l'intégrité du fractionnement n'étaient plus retrouvées là où nous les attendions...

Un travail parallèle sur Ets-2, effectué au laboratoire par Kim Boulukos, montrait une localisation prédominante de ce produit dans les noyaux des cellules l'exprimant. Ce résultat nous amenait à réinvestiguer ce point pour Ets-1. Kim Boulukos, à la recherche d'un ADN complémentaire au transcript de c-ets-2 dans une banque de clones construite et envoyée par Jan Sap (Laboratoire Européen de Biologie Moléculaire, Heidelberg, RFA), avait également isolé plusieurs clones correspondant à c-ets-1. Ces clones, introduits dans un vecteur d'expression en aval du promoteur précoce de SV40, et transfectés dans des cellules de reins de singes transformées par SV40 T, permettaient la

synthèse d'une protéine indistinguishable de celle observée *in vivo* chez le poulet (figure 5, panneau E). Une étude immunocytochimique à l'aide de notre sérum sur ces cellules transfectées confirmait nos soupçons: bien que certaines cellules transfectées présentaient en observation par épifluorescence un signal cytoplasmique, la majorité du temps, nous observions un signal nucléaire intense (figure 5, Panneau A). Le panneau B représente le même champ qu'en A, mais en observation en contraste de phase. Les panneaux C et D représentent la même analyse qu'en A et B, mais un sérum non-immun a été utilisé au lieu du sérum anti-ets.

L'histoire serait incomplète si nous ne citions pas les travaux de Fujiwara et al. (S. Fujiwara et al., 1988) qui montrent que, selon leurs résultats, Ets-1 serait présente de façon équivalente dans le noyau et dans le cytosol.

Ceci illustre bien la difficulté, sinon l'impossibilité, dans laquelle on se trouve parfois de conclure définitivement. Dans le cas présent, il est possible que la protéine Ets-1 soit effectivement nucléaire, mais très faiblement associée, ce qui expliquerait qu'elle puisse très facilement "fuir" dans le cytoplasme au cours de techniques de fractionnement cellulaire, même relativement douces. Il est également concevable que la localisation subcellulaire de Ets-1 puisse varier selon le type cellulaire, comme cela a déjà été rapporté par exemple pour la protéine Rel (T. Gilmore et al., 1986; T. Gilmore et al, 1988). Enfin, la cellule étant un milieu aux régulations permanentes et nombreuses, il est également possible qu'une même protéine soit localisée en différents endroits de la même cellule au même moment, selon les modifications post-traductionnelles affectant cette protéine par exemple, ainsi que cela a été montré pour la protéine Src (M. Kamps et al., 1985). Nous aurons l'occasion de revenir à cet aspect peut-être inattendu dans la fin de cette présentation.



Expression des produits de c-ets-1 et de c-ets-2 au cours de la différenciation de la lignée des cellules lymphoïdes B.

RNA: ARN transcrits à partir des locus c-ets-1 et c-ets-2.
 PROTEIN: protéines traduites à partir des ARN c-ets-1 et c-ets-2.
 Les tailles des ARN sont indiquées en kilobases.

Figure 6

III. Etude de l'expression de Ets-1 au sein des cellules B et T:

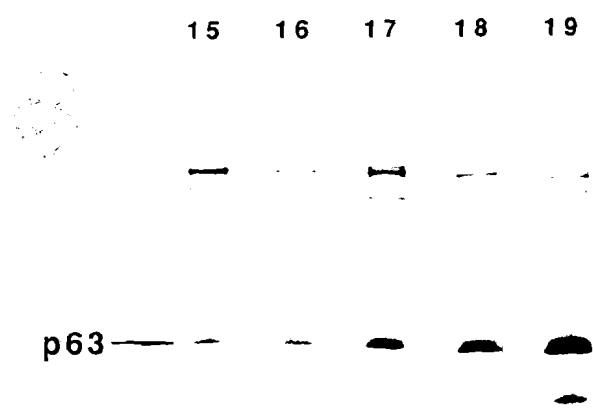
Ainsi que nous l'avons dit plus haut, nous avons pu observer une expression prépondérante de Ets-1 dans les cellules lymphoïdes. Nous avons cherché à savoir si cette expression abondante de Ets-1 pouvait être corrélée à un évènement particulier de la physiologie des lymphocytes B et/ou T, permettant ainsi, et dans ce cas particulier, de préciser à quel stade de différenciation où d'activation la fonction de Ets-1 interviendrait. Ceci, en faisant l'hypothèse que l'abondance du produit reflète son importance, ce qui n'est qu'une base de travail raisonnable, mais non démontrée.

1. Expression de Ets-1 au cours de la différenciation de la lignée B:

Notre approche a consisté à étudier un large éventail de lignées de cellules lymphoïdes B humaines représentant différents stades de maturation de la lignée lymphoïde B. Notre étude a été faite à deux niveaux: d'une part la comparaison de la synthèse de Ets-1 dans ces différentes lignées, et, d'autre part, l'étude de la transcription de c-ets-1 dans ces mêmes cellules. Comme représenté sur la figure 6, les résultats obtenus à ces deux niveaux sont homogènes, et permettent deux conclusions:

i) Les produits du gène c-ets-1 sont d'autant plus abondants que le stade de maturation des cellules B est avancé.

ii) Le parallélisme entre le signal reflétant la néosynthèse protéique de Ets-1 et le signal correspondant à la quantité de transcrits de c-ets-1 indique que les variations observables quant à la néosynthèse de Ets-1 sont dues à un contrôle pré-translationnel, soit au niveau transcriptionnel proprement dit, soit à un contrôle par stabilisation des transcrits.

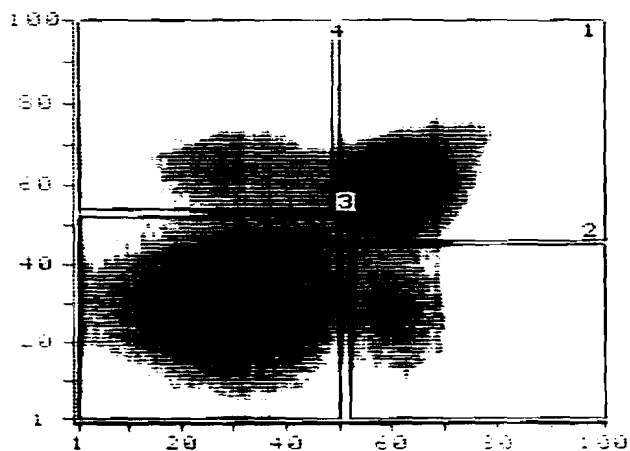


**Expression de la protéine c-ets-1 dans
le thymus au cours du développement
embryonnaire de la souris
(de 15 à 19 jours)**

Ce résultat, indiquant une augmentation de l'expression des protéines Ets-1 au cours de la maturation des cellules B est à comparer avec le résultat obtenu en effectuant la même analyse, mais sur Ets-2. Il est en effet étonnant de constater que dans le même système, le niveau d'expression de chacun des membres de la famille Ets semble être inversement proportionnel au niveau d'expression de l'autre membre. Ainsi, alors que Ets-1 interviendrait dans les étapes tardives de maturation des lymphocytes B, Ets-2 interviendrait dans les étapes précoces de cette même maturation.

2. Expression de Ets-1 au cours de la maturation embryonnaire du thymus et de la différenciation des thymocytes.

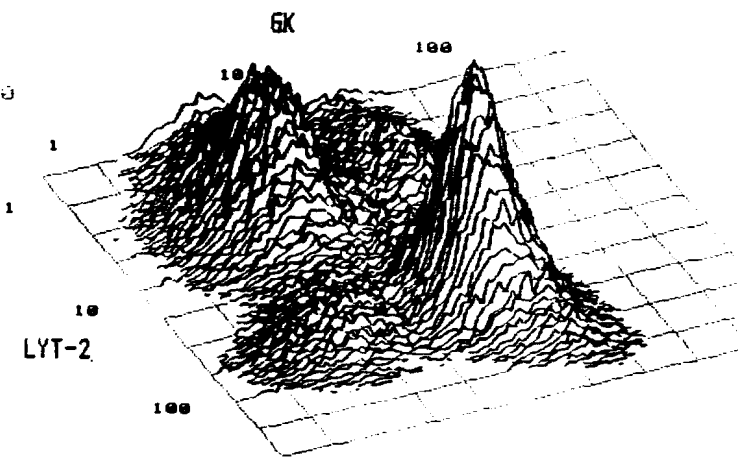
Ne disposant pas comme pour la lignée B d'un éventail de cellules représentatif de la maturation des cellules T, nous avons étudié chez la souris l'expression de Ets-1 au cours du développement embryonnaire du thymus, organe spécialisé dans la différenciation et la maturation des cellules de la lignée T. Notre travail a consisté à prélever les thymus sur des embryons de 15 à 19 jours de développement, de les marquer métaboliquement, de les lyser et d'immunoprécipiter ces lysats en mettant en jeu pour chacun d'eux un nombre identique de molécules marquées incorporées dans les protéines cellulaires totales. Ceci permet de comparer directement le niveau relatif de néosynthèse de Ets-1 dans ces thymocytes au cours de l'embryogénèse. La figure 7 montre clairement que cette synthèse va croissant au cours de la période étudiée, indiquant donc que, en moyenne, chaque thymocyte synthétise de plus en plus de protéines Ets-1 au cours du développement embryonnaire.



A

Les fenêtres 1 à 4 représentent les populations isolées, indiquées pures à au moins 95% avec les paramètres choisis.

MIXTURE THYM. (--) + TOTAL THYM.
+ α Lyt2 DTAF + GK BIO. + AV. PE



GK=L3T4

Séparation des différentes sous-populations thymiques en fonction des marqueurs de surface Lyt2 et L3T4.

B

tt ++ +--+ -- b



Comparaison de l'expression des protéines c-ets-1 entre les populations de thymocytes murins définies par les marqueurs Lyt2 et L3T4.

b: sérum bloqué

Figure 8

3. Expression de Ets-1 dans les différentes sous-populations thymiques:

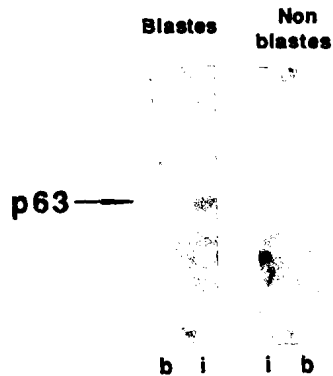
Ainsi que nous l'avons détaillé au cours de l'introduction, les thymocytes présents dans un thymus mature de souris peuvent être séparés en fonction de molécules de surface, caractéristiques de voies fonctionnelles distinctes. Cette séparation, effectuée en collaboration avec Robson McDonald de l'ISREC à Lausanne, consiste en un tri individuel et (heureusement!) automatisé des thymocytes marqués différemment selon la présence ou l'absence des molécules de surface considérées, ici Lyt2 et L3T4. La figure 8, panneau A, démontre que les quatre populations obtenues sont effectivement pures à plus de 95% pour les marqueurs étudiés. Ces populations ont alors été métaboliquement marquées, et les protéines néosynthétisées immunoprécipitées à l'aide de notre sérum. La figure 8, panneau B, montre que le niveau d'expression de Ets-1 dans chacune des quatre populations étudiées est globalement identique, les faibles différences observées sur la figure 8 n'étant pas significatives.

Ce résultat, obtenu dans deux expériences indépendantes, ne permet pas d'envisager un rôle particulier de Ets-1 au cours de la différenciation fonctionnelle des thymocytes.

Un second type de séparation des thymocytes a été effectué, mais cette fois-ci en fonction de la taille des cellules. Ceci, afin d'analyser l'expression de Ets-1 en fonction de l'état de prolifération des thymocytes. Les résultats de la figure 9, panneau A, indiquent que le niveau d'expression de Ets-1 dans les cellules quiescentes est très bas, alors que dans les cellules en prolifération, ce niveau est plus élevé.

Ce résultat, indiquant une corrélation entre l'expression de Ets-1 et la prolifération de thymocytes, est confirmé par les travaux que nous avons effectués sur une lignée de thymocytes, EL4. Cette lignée a la particularité de bloquer sa croissance lorsqu'elle est cultivée en présence de TPA, et de la reprendre rapidement lorsqu'elle est remise dans un

A

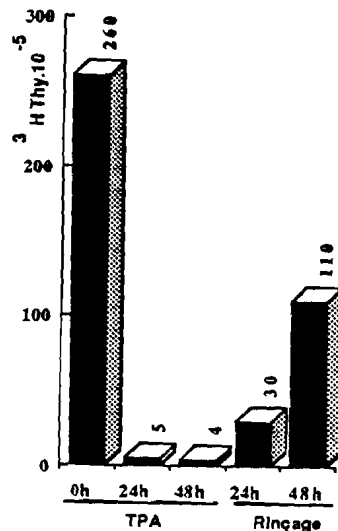


Comparaison de l'expression des protéines c-ets-1 entre des thymocytes murins en prolifération et des thymocytes murins quiescents

i: sérum anti-ets
b: sérum anti-ets bloqué

B

Synthèse d'ADN dans une population de cellules EL4 cultivées en présence de TPA durant 48h, puis rincées.



C

0h 24h 48h 48h rincé 48h
24h 48h

p63 —

Modulation de l'expression des protéines c-ets-1 dans la lignée de thymome murin EL4 par traitement au TPA

Figure 9

milieu frais. La figure 9, panneau B, montre l'effet drastique du TPA sur la synthèse d'ADN de cette lignée, ainsi que sa reprise après rinçage. Sur le panneau C de la même figure est représenté le statut de l'expression de Ets-1 dans ces mêmes conditions. Il est observé un blocage de la néosynthèse de Ets-1 après 1h de traitement, ainsi qu'une reprise progressive de cette néosynthèse après que les cellules aient été rincées, ce qui est en accord avec les résultats obtenus in vivo sur des thymocytes frais.

4. Expression de Ets-1 dans les lymphocytes T circulants:

Après leur maturation et leur sélection au sein du thymus, les lymphocytes T fonctionnels passent dans la circulation sanguine, où ils attendent à l'état quiescent les signaux qui les activeront et les impliqueront dans la défense immunitaire de l'organisme. Nous avons pu montrer, en collaboration avec Hiro Wakasugi, du centre d'Immunologie de Villejuif, que le niveau de Ets-1 dans ces cellules quiescentes était faible, mais augmentait de manière très importante lorsque ces mêmes cellules étaient activées par la présence simultanée de PHA et d'IL2. Ce résultat est repris sur la figure 10 où l'on peut comparer les niveaux de Ets-1 entre cellules quiescentes et cellules stimulées dans deux types d'analyse: le panneau A représente le niveau de néosynthèse des protéines Ets-1 pour un même nombre de cellules, quiescentes ou activées, ce qui représente donc une incorporation d'acides aminés marqués beaucoup plus importante pour les cellules activées. Sur le panneau B figure la même analyse, mais, cette fois ci, à partir du même nombre de molécules radioactives incorporées au cours du marquage, ce qui représente un nombre de cellules environ 10 fois plus important pour le contrôle quiescent, étant donné le métabolisme par définition très bas dans ces conditions. Cependant même dans ce type d'analyse, on peut clairement observer une augmentation de la synthèse de Ets-1 par rapport aux cellules T quiescentes.

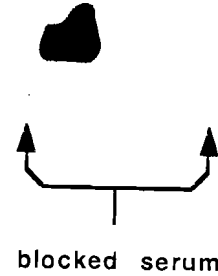
A

Dans cette analyse, une quantité comparable de cellules ont été mises en jeu dans les deux cas, ce qui représente en protéines néosynthétisées un excès de 10 fois pour les lymphocytes activés.

"blocked serum" indique que la même immunoprécipitation a été réalisée avec le sérum préalablement bloqué par un excès de son antigène bactérien, ce qui permet de s'assurer de la spécificité des signaux observés avec le sérum immun.

PHA + IL2 Control

p60
p55



Same number of cells

PHA + IL2 Control



p60
p55



Same protein synthesis

B

Dans cette analyse, une quantité comparable de protéines néosynthétisées a été mise en jeu dans les deux cas, ce qui représente en nombre de cellules un excès de 10 fois pour les lymphocytes quiescents.

Comparaison de l'expression de Ets-1 entre des lymphocytes périphériques quiescents (control) et les mêmes après trois jours de stimulation par la combinaison d'une lectine et de l'interleukine 2 (PHA+IL2).

p55 indique la protéine Ets-1 majoritaire, et p60 une forme modifiée de cette dernière.

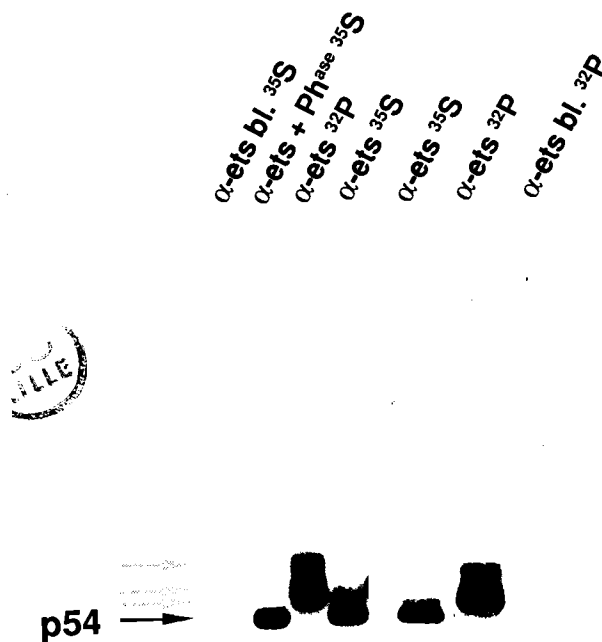
Figure 10

5. Conclusion:

Pour conclure cette partie, nous pouvons résumer les résultats présentés comme suit:

Dans le cas des cellules lymphoïdes B, la maturation conduisant jusqu'à l'excrétion d'immunoglobulines s'accompagne de l'augmentation progressive de la synthèse relative de Ets-1.

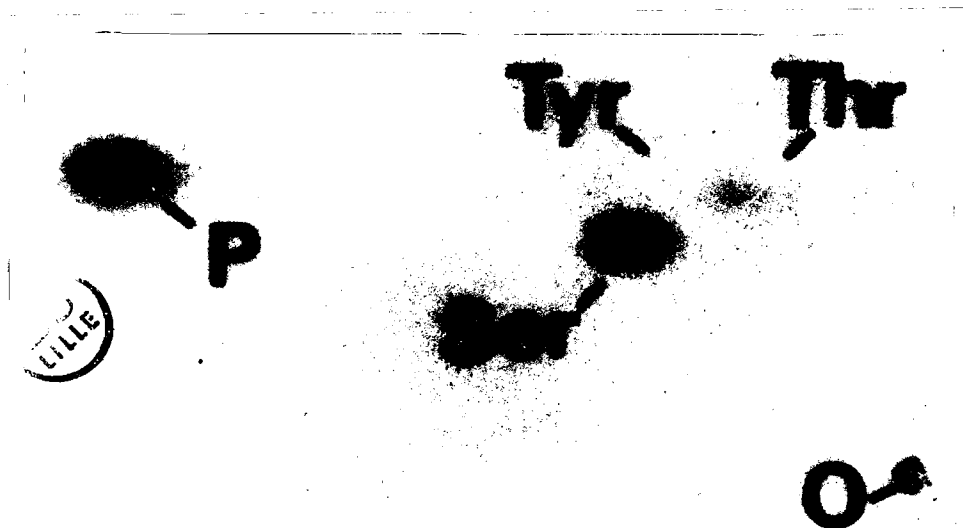
Dans le cas des cellules T, le développement embryonnaire du thymus s'accompagne de l'augmentation progressive de la synthèse relative de Ets-1 dans les thymocytes. Cette synthèse décroît fortement lorsque les cellules T passent dans la circulation et y restent à l'état quiescent, et est fortement réinduite lors de l'activation antigénique dans la périphérie.

A

Caractérisation des modifications post-traductionnelles de Ets-1 par phosphorylation.

³⁵S et ³²P indiquent des marquages métaboliques à l'aide de méthionine radioactive et de phosphate inorganique radioactif respectivement.

Les immunoprécipitations ont été réalisées à l'aide du sérum anti-ets (α-ets); bl. indique que le sérum a été préalablement bloqué par un excès de son antigène bactérien spécifique; Ph^{ase} représente un traitement de l'immun-complexe à l'aide de phosphatase acide de pomme de terre.

B

Analyses des acides aminés phosphorylés de la protéine Ets-1 aviaire.

Ser: phospho-sérine, Thr: phospho-thréonine, Tyr: phospho-tyrosine.
 O: dépôt, P: phosphate libre.

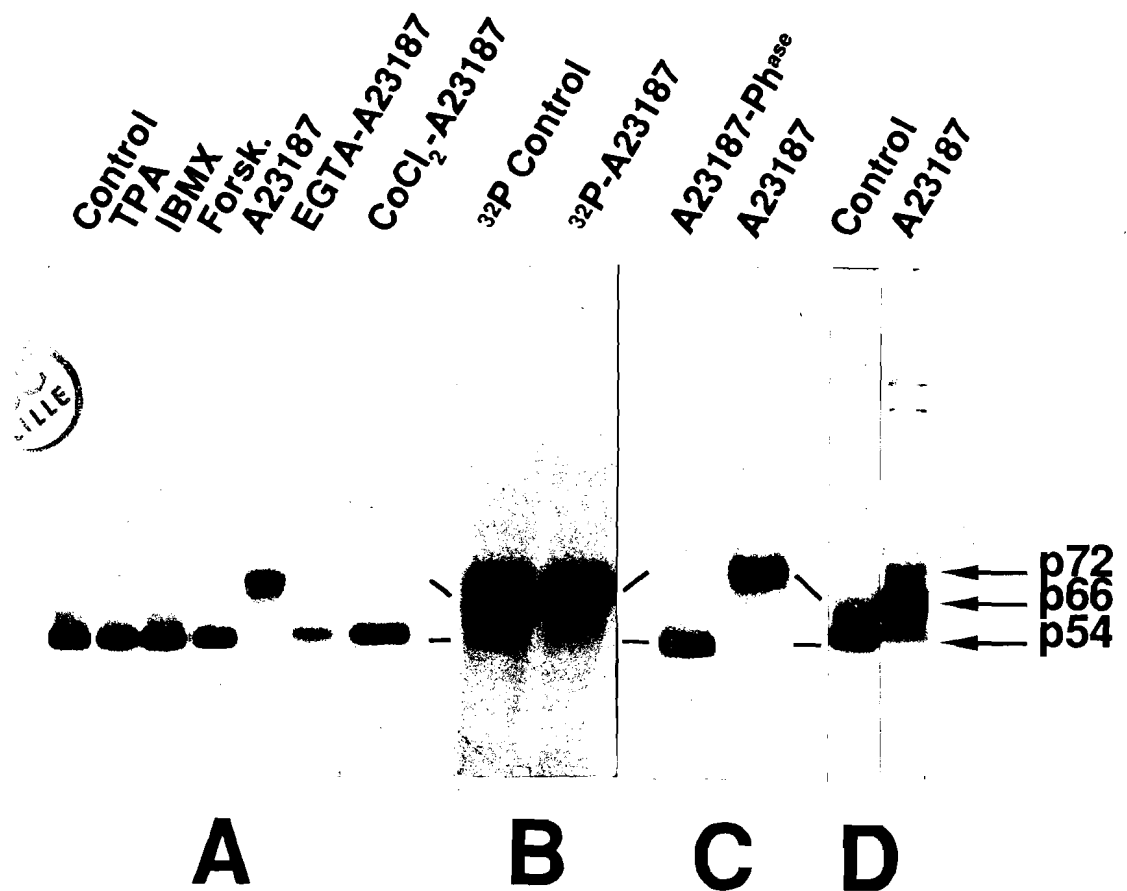
Figure 11

IV. Etude des modifications post-traductionnelles des protéines Ets-1 et de leurs régulations:

L'examen attentif des résultats d'immunoprécipitations de lysats cellulaires tant aviaires que murins ou humains révèle que, outre le produit Ets-1 majoritaire observé, on met toujours en évidence des formes minoritaires de poids moléculaire apparent plus élevé (de 56 à 66 kD pour le poulet, 73 kD pour la souris), également spécifiquement immunoprécipitées. Des cartographies peptidiques bidimensionnelles de ces produits minoritaires n'ont montré aucune différence avec le produit Ets-1 prédominant, suggérant qu'ils ne reflétaient pas des divergences au sein de la structure primaire de la protéine. Nous avons donc investigué si des modifications post-traductionnelles de Ets-1 pouvaient être à l'origine de ces formes à migration électrophorétique ralentie.

1. Le produit de traduction de *c-ets-1* est une phosphoprotéine:

Nous avons voulu savoir si un évènement de phosphorylation pouvait affecter Ets-1. Pour ce faire, nous avons incubé des thymocytes de poussins en présence de phosphate inorganique radioactif, puis analysé les lysats obtenus à partir de ces cellules. La figure 11, panneau A, montre que notre sérum reconnaît spécifiquement dans ces lysats, des produits de poids moléculaires apparents correspondant aux formes minoritaires observées en marquage à l'aide de méthionine radioactive (flèches grisées), mais pratiquement pas de produit de 54 kd. Ceci était donc une forte présomption en faveur de modifications post-traductionnelles de Ets-1 par phosphorylation, responsables des altérations de migration en gel SDS-polyacrylamide. Afin de s'en assurer, nous avons traité un immun-complexe constitué du sérum et des protéines Ets-1 marquées à l'aide de méthionine radioactive à l'aide de



Role du calcium dans la phosphorylation de Ets-1.

A: Après une heure de marquage en présence de méthionine radioactive, les thymocytes aviaires sont traités 5 minutes avec les différents produits indiqués, puis lysés et immunoprécipités par le sérum anti-*ets*.

B: Même expérience qu'en A, mais le marquage a été effectué en présence de phosphate inorganique radioactif.

C: L'immun-complexe obtenu après immunoprécipitation d'un lysat de thymocytes stimulés par l'ionophore de calcium A23187 a été traité par de la phosphatase acide de pomme de terre (A23187-Ph^{ase}) ou déposé tel quel sur gel comme contrôle (A23187).

D: Exposition prolongée permettant de visualiser un produit minoritaire de 72 kD.

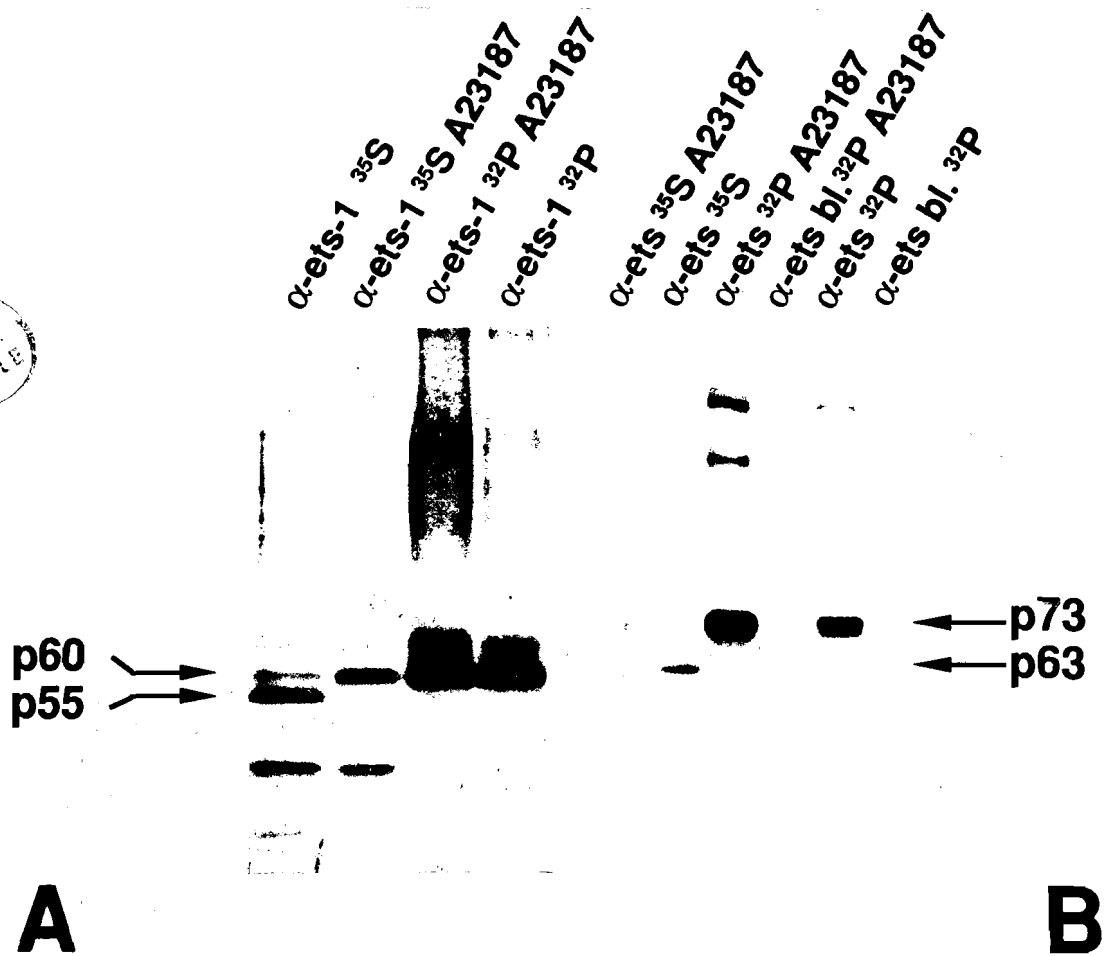
phosphatase acide, et nous avons ensuite analysé ces protéines. Comme indiqué sur la figure 11, panneau A, les formes minoritaires de 56-66 kd observées avant le traitement ont maintenant disparu, confirmant l'implication de la phosphorylation de Ets-1 sur les multiples formes résolues par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Une analyse des acides aminés de Ets-1 marqués au phosphate inorganique radioactif indique que des résidus sérines sont phosphorylés de manière prédominante, avec cependant quelques traces de phosphate sur des résidus thréonines (figure 11, panneau B).

Peut-être est il nécessaire de nous arrêter un instant sur les deux types de marquages métaboliques utilisés, afin de permettre une meilleure appréhension de ces résultats:

L'un, reposant sur l'incorporation lors de la synthèse protéique d'un acide aminé marqué au soufre 35, permet la visualisation de la quantité de molécules Ets-1 effectivement synthétisées lors de la période de marquage (en ignorant les dégradations de ces mêmes protéines pendant la même période, considérées comme négligeables sur 1 heure). Ainsi, un signal pour la p54 Ets-1 de 10 représenterait par exemple 50000 molécules, et donc un signal de 1 pour la p66, forme modifiée de Ets-1, représenterait 5000 molécules.

Le second, utilisant le phosphate inorganique marqué au phosphore 32, permet de visualiser le nombre de phosphates sur une molécule. Ainsi, pour reprendre l'exemple utilisé à l'instant, un signal dans ces conditions de 10 pour la p66 Ets-1 correspondrait par exemple à 50000 événements de phosphorylation, donc en moyenne 10 par protéine. De même, un signal de 1 pour la p54 Ets-1 correspondrait à 5000 événements de phosphorylation, donc une moyenne de 1 protéine sur 10 phosphorylée 1 seule fois.

Ceci permet de mieux saisir les résultats présentés: p54 Ets-1 est majoritaire en nombre de molécules, d'où un signal majoritaire en ^{35}S , mais très peu phosphorylée, d'où un signal très faible en ^{32}P . Par contre,



Les protéines Ets-1 murines et humaines sont également phosphorylées à la suite de l'augmentation de la concentration interne en calcium provoquée par l'ionophore de calcium A23187.

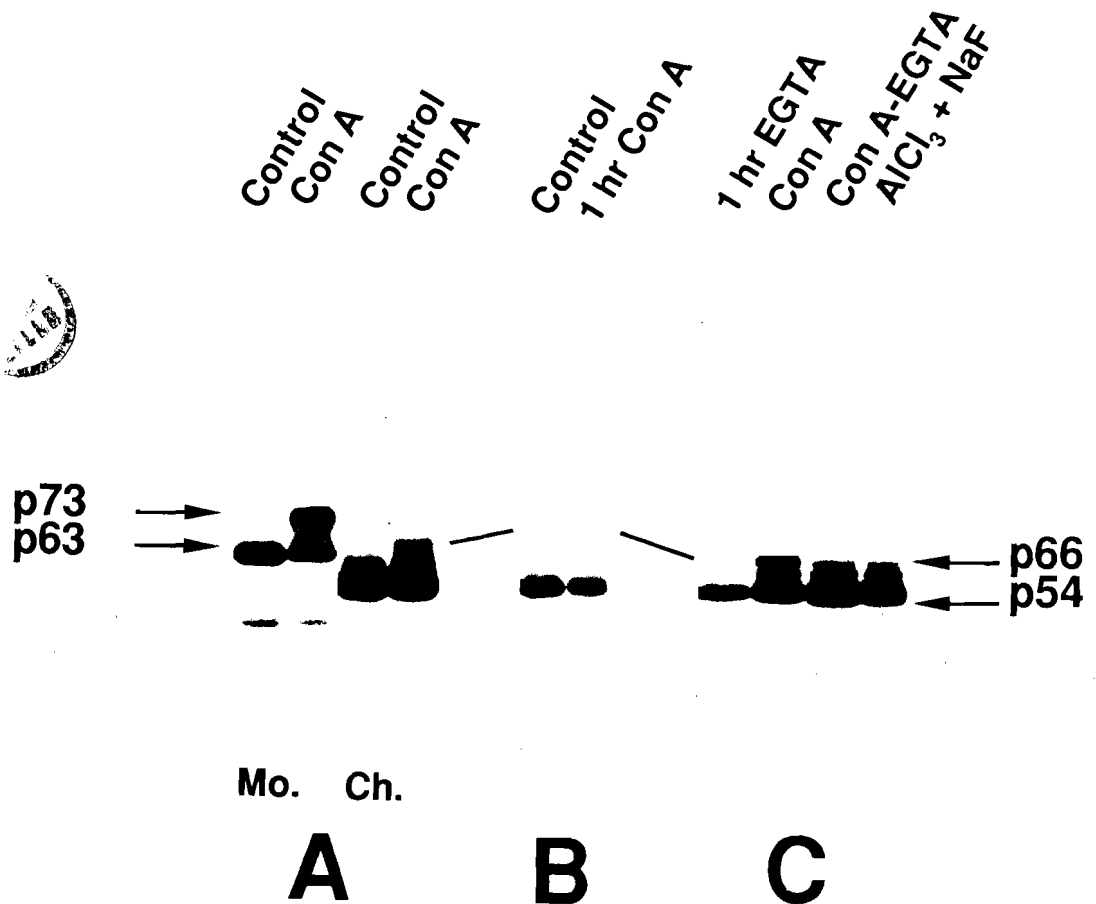
A: Après une heure de marquage en présence de méthionine radioactive (³⁵S) ou de phosphate inorganique radioactif (³²P), les cellules B humaines (lignée B85) sont traitées 5 minutes en présence de 2 μ M de l'ionophore de calcium A23187 ou non, puis lysées et immunoprécipitées par le sérum anti-ets spécifique du produit Ets-1. p55 indique la forme non phosphorylée de Ets-1, et p60 la forme phosphorylée prédominante.

B: Même expérience qu'en A, mais les marquages ont été effectués sur des thymocytes murins, et le sérum utilisé est le sérum anti-ets classique. p63 indique la forme non phosphorylée de Ets-1, et p73 la forme phosphorylée prédominante.

les formes à migration ralentie, ne représentant qu'un faible pourcentage de la population totale, correspondent à peu de protéines Ets-1 (faible signal ^{35}S) très fortement phosphorylées (très fort signal ^{32}P).

2. La phosphorylation de Ets-1 requiert la présence de calcium dans le milieu:

Ayant vérifié que Ets-1 était sujet à des phosphorylations, nous avons alors voulu déterminer les conditions nécessaires à ces modifications. De nombreux oncogènes étant impliqués dans des voies où les protéines kinases A (PKA) et les protéines kinases C (PKC) jouent également un rôle (J. Barber et al., 1987; W. Lamph et al., 1988; Y. Goldberg et al., 1988), nous avons utilisé diverses substances connues pour activer ces kinases. Le lecteur peut constater sur la figure 12, panneau A, que, en utilisant comme référence le rapport entre les formes minoritaires en ^{35}S , (donc très phosphorylées) et les formes majoritaires (peu phosphorylées), aucun de ces agents ne modifie ce rapport, indiquant ainsi la non-implication de la PKC et de la PKA dans ce processus. Par contre, un court traitement de 5 minutes avec 2 μM du calcium ionophore A23187 à la fin de la période de marquage à l'aide de méthionine, résulte en une complète conversion de la forme p54 en la forme p66. Ceci indique clairement que le calcium est impliqué dans la phosphorylation de Ets-1. En effet, la même expérience conduite en présence du chélateur de calcium EGTA, ou du compétiteur cobalt ne conduit à aucune modification. Comme attendu, l'image obtenue en marquage à l'aide de phosphate radioactif, représentée sur le panneau B, bien que moins spectaculaire, confirme cette brutale activation de la phosphorylation de Ets-1. Le fait que seuls des événements de phosphorylation sont responsables de ces modifications est confirmé par le traitement à la phosphatase acide de l'immun complexe comprenant les protéines totalement phosphorylées. On observe alors la complète reconversion de la forme p66 à la forme de départ, p54 (panneau C). Ce même type de modification après traitement à



Les protéines Ets-1 murines et aviaires sont phosphorylées à la suite de l'augmentation de la concentration en calcium interne provoquée par une stimulation mitogénique à l'aide de concanavaleine A.

A: Après une heure de marquage en présence de méthionine radioactive (³⁵S), les thymocytes murins (Mo.) et aviaires (Ch.) sont traités 5 minutes en présence de 10 µg/ml de concanavaleine A (ConA) ou non (Control), puis lysés et immunoprécipités par le sérum anti-*ets*.

p63 et p54 indiquent les formes non phosphorylées de Ets-1 murin et aviaire respectivement, et p73 et p66 les formes phosphorylées prédominantes de ces deux espèces.

B: Le traitement de stimulation est ici effectué durant la période d'une heure de marquage des thymocytes aviaires.

C: Des thymocytes aviaires ont été marqués en présence d'EGTA (1hr EGTA), ou stimulés classiquement 5 minutes à l'aide de concanavaleine A (ConA), ou de concanavaleine A en présence d'EGTA (ConA-EGTA). AlCl₃+NaF représente un traitement permettant spécifiquement la libération des réserves intracellulaires de calcium.

l'ionophore de calcium est également observé chez la souris, où le produit Ets-1 majoritaire de 63 kD migre alors à un poids moléculaire apparent de 73 kD, ainsi que chez l'homme, où de 55 kD, Ets-1 passe à 60 kD (figure 13). Remarquons enfin que chez le poulet, lors du traitement à l'ionophore de calcium, une nouvelle forme de Ets-1 très minoritaire en ^{35}S apparaît vers 72 kD, et correspond donc sans doute à des phosphorylations nombreuses affectant un nombre très restreint de molécules (panneau D de la figure 12).

3. Ets-1 est phosphorylée dans les secondes qui suivent une stimulation mitogénique sur des thymocytes:

Etant donné l'importance cruciale du calcium dans les événements les plus variés de la vie cellulaire, et l'observation de la phosphorylation de Ets-1 lors d'une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium libre ($[\text{Ca}^{++}]_i$), nous avons voulu voir si l'augmentation de la $[\text{Ca}^{++}]_i$ à la suite de stimulations mitogéniques sur les thymocytes s'accompagnait également de la phosphorylation de Ets-1. Pour ce faire, nous avons traité des thymocytes aviaires et murins à l'aide de concanavaline A, une lectine mitogène pour ces populations cellulaires, avec cependant une plus grande efficacité sur les thymocytes murins. Ces thymocytes, préalablement marqués à l'aide de méthionine radioactive, voyaient leur proportion de formes phosphorylées Ets-1 augmenter après 5 minutes en présence de $10\mu\text{g/ml}$ de ConA. Cet effet était plus marqué dans le cas des thymocytes murins, ainsi que l'indique la figure 14, panneau A. Cette phosphorylation provoquée par stimulation mitogénique requiert la présence de calcium extracellulaire. En effet, l'augmentation de $[\text{Ca}^{++}]_i$ provoquée par la libération des réserves de calcium intracellulaires n'est pas suffisante pour provoquer cette modification, ni d'ailleurs pour provoquer la mitose. Ceci est représenté sur la figure 14, panneau C, par la comparaison des signaux Ets-1 sur des thymocytes



Comparaison de la stabilité des formes phosphorylées de Ets-1 avec la demi-vie de Ets-1.

A: Après une heure de marquage en présence de méthionine radioactive (^{35}S), les thymocytes aviaires sont traités 5 minutes en présence de $2 \mu\text{M}$ de l'ionophore de calcium (A23187), ou non (Control), puis chassés 20, 40 ou 60 minutes en présence d'un excès de méthionine froide sans ionophore de calcium et lysés puis immunoprécipités par le sérum anti-ets.

p54 indique la forme non phosphorylée de Ets-1, et p66 la forme phosphorylée prédominante.

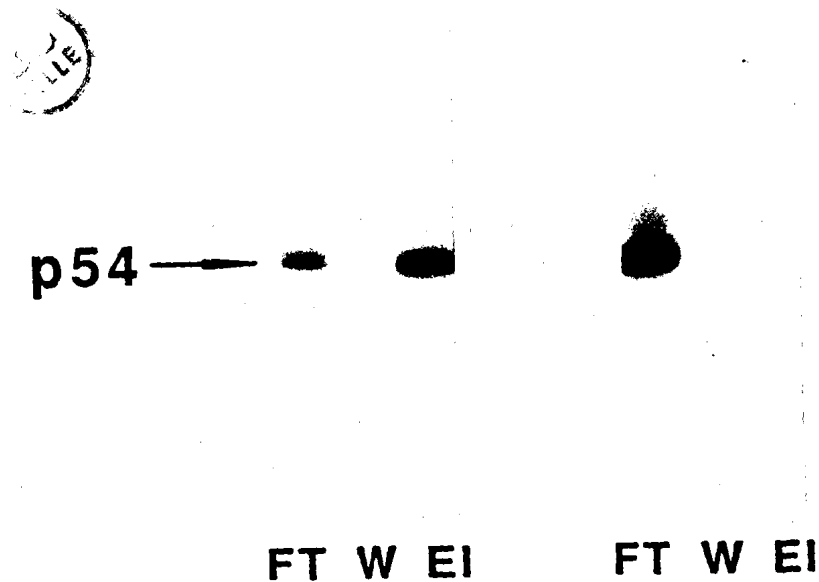
traités par la ConA en présence d'EGTA, où seule la composante interne du calcium est disponible étant donné que l'EGTA ne peut entrer dans les cellules, et sur les mêmes thymocytes stimulés uniquement par la ConA. On observe, en effet, que la forme p66 n'apparaît pas en présence d'EGTA. La même conclusion est obtenue en traitant les thymocytes à l'aide d' AlCl_3 en présence de NaF, ce qui conduit à l'apparition intracellulaire de AlF_4 , connu pour libérer les réserves internes de calcium par l'intermédiaire de l'activation de protéines G (Cockroft et Taylor, 1987). Sur ce même panneau le lecteur peut constater que, comme attendu d'après les résultats que nous venons de présenter, un marquage métabolique des thymocytes par la méthionine radioactive en présence continue d'EGTA, conduit exclusivement à la synthèse de la forme Ets-1 non phosphorylée, p54.

4. Comparaison de la stabilité des formes phosphorylées de Ets-1 avec la demi-vie de Ets-1:

Etant donné la rapidité avec laquelle Ets-1 réagit à ces événements de stimulation, nous avons été amené à déterminer la stabilité de ces modifications, afin de savoir s'il s'agissait d'un événement durable dans le temps, et donc a priori "final" dans ce processus d'activation, ou s'il s'agissait d'un événement ponctuel, qui pourrait alors jouer un rôle de régulateur d'événements plus tardifs impliqués dans ce processus de stimulation. Une première indication nous a été fournie par l'observation de la néosynthèse de Ets-1 dans des thymocytes aviaires entre 1 et 2 heures après le traitement par la lectine (figure 14, panneau B). En effet, dans ces conditions, les formes phosphorylées de Ets-1 étaient difficilement observables, ce qui nous a conduit à supposer que cette modification était transitoire. Afin de vérifier ce point, nous avons effectué une chasse sur les formes phosphorylées et non phosphorylées de Ets-1. Ceci consiste à marquer les cellules en présence de méthionine

**ds DNA
Cellulose**

**Plain
Cellulose**



**Ets-1 est spécifiquement retenue par une colonne
d'ADN-cellulose.**

Des thymocytes aviaires sont marqués classiquement à l'aide de méthionine ³⁵S, lysés en conditions douces et ce lysat est déposé sur colonnes.

dsDNA Cellulose: colonne d'ADN-cellulose.

Plain Cellulose: colonne de cellulose utilisée comme contrôle de spécificité de rétention.

FT: éluat primaire; W: lavage; EI: élution par 1M NaCl.

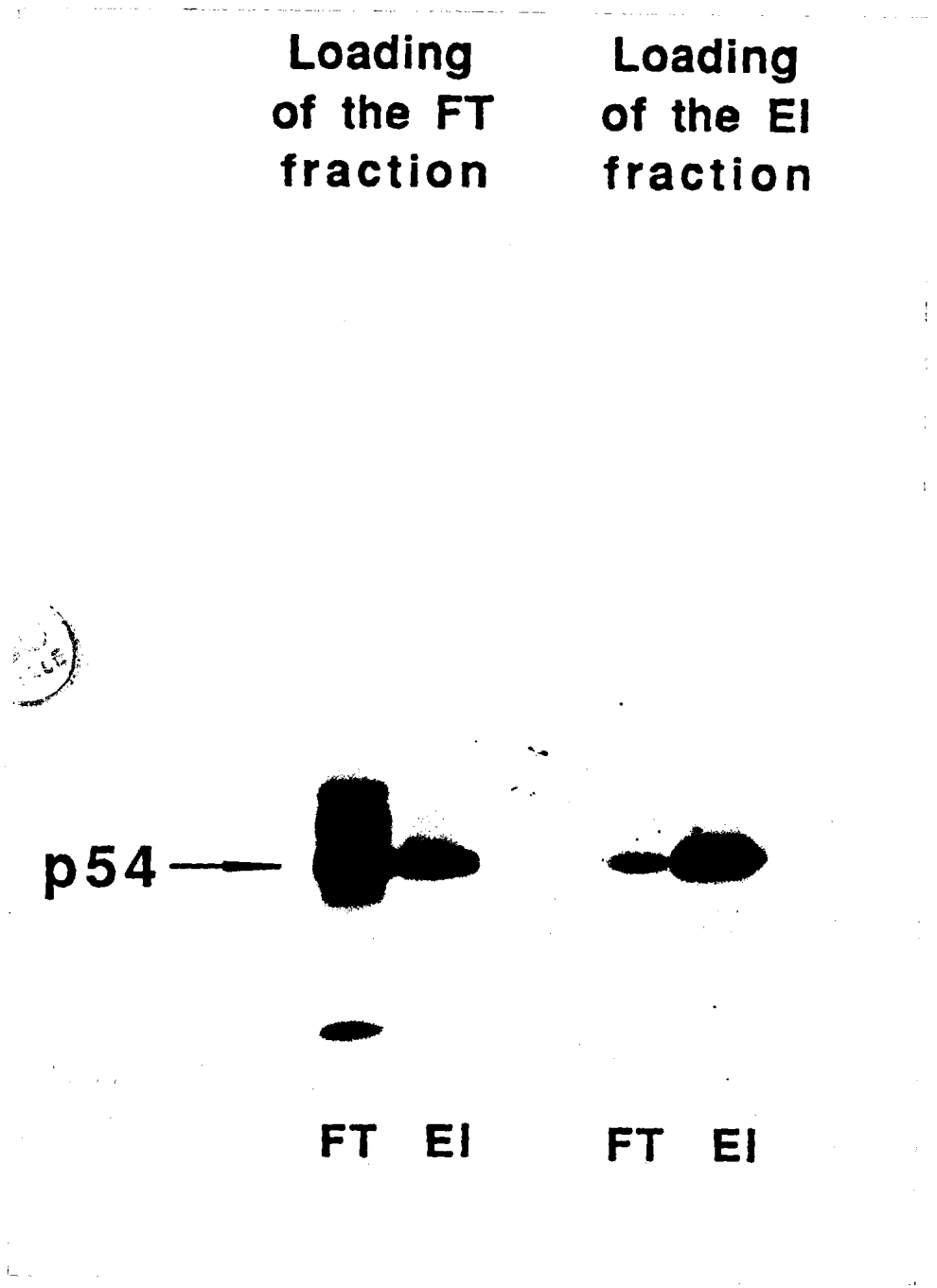
Chaque fraction est ensuite analysée par immunoprécipitation pour la présence de Ets-1.

radioactive, puis de les rincer et de les mettre en présence d'un excès de méthionine froide, et d'analyser les protéines qui nous intéressent après différents temps d'incubation (la chasse), ce qui permet de suivre la stabilité des produits étudiés. Les résultats de la figure 15 permettent de tirer deux conclusions: la demi-vie de p54 Ets-1 est d'environ 30 minutes, alors que celle de la forme phosphorylée p66, représentant donc en fait la stabilité des groupements phosphates, est beaucoup plus brève, au maximum de 10 minutes.

5. Conclusion:

Pour terminer ce chapitre, nous synthétiserons les résultats présentés comme suit:

Ets-1 est une phosphoprotéine, dont la phosphorylation est régulée en fonction de la concentration interne en calcium. Ceci conduit à la phosphorylation rapide de Ets-1 dès les tous premiers stades d'une stimulation mitogénique de cellules lymphoïdes T. Cette phosphorylation, rapide et transitoire, s'accompagne d'importantes modifications structurales reflétées par l'altération de la migration en gel d'acrylamide, et qui pourraient traduire une modification de la fonction de ce produit.



**Etude de la capacité de rétention sur ADN-cellulose
des protéines Ets-1 obtenues dans les fractions
d'éluat primaire et d'éluat à haut sel d'une
première colonne d'ADN-cellulose.**

Loading of the FT fraction: dépôt sur ADN-cellulose de l'éluat primaire d'une première
colonne d'ADN-cellulose.

Loading of the EI fraction: dépôt sur ADN-cellulose de l'éluat haut sel d'une première
colonne d'ADN-cellulose.

FT: éluat primaire; EI: éluat par 1M NaCl.

Chaque fraction est ensuite analysée par immunoprécipitation pour la présence de Ets-1.

V. Ets-1 est une protéine pouvant interagir avec

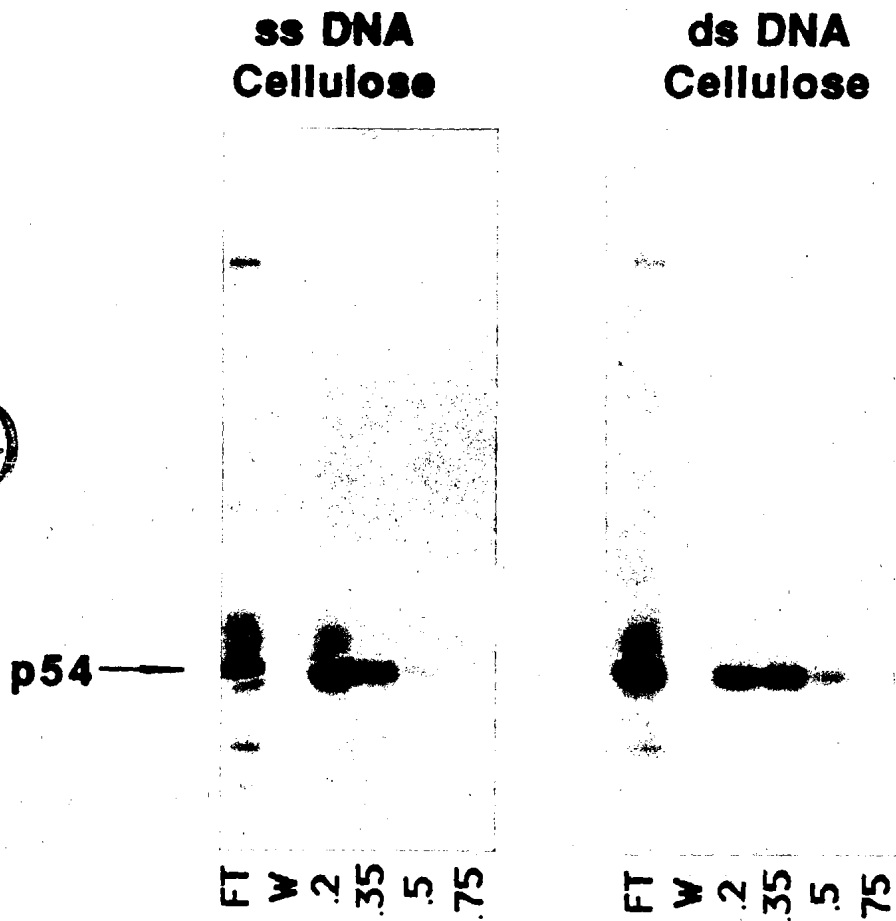
l'ADN:

Nous trouvant face à un produit à localisation nucléaire, phosphorylé et impliqué dans des évènements précoces d'activation cellulaire, nous avons été amené à envisager qu'il pourrait éventuellement agir directement sur l'ADN. Pour tester cette hypothèse, plusieurs expériences ont été réalisées:

1. Ets-1 est spécifiquement retenue sur une colonne d'ADN-cellulose:

L'expérience présentée ici a consisté à mettre en présence un lysat de thymocytes métaboliquement marqués et une pâte de cellulose sur laquelle sont greffés des fragments d'ADN hétérologues. Après incubation, le tout est déposé sur une mini-colonne, et l'éluat primaire récupéré par drainage. L'ADN-cellulose est ensuite rincée à l'aide du tampon de lyse, et finalement rincée par ce même tampon amené à 1 molaire NaCl, afin de rompre les liaisons ioniques qui auraient pu survenir entre certaines protéines du lysat et l'ADN. Chacune de ces trois fractions est ensuite analysée par immunoprécipitation à l'aide du sérum dirigé contre les protéines Ets. La figure 16 illustre les résultats obtenus: environ 60% de Ets-1 est retrouvé dans la fraction d'éluat à haut sel, indiquant une interaction entre ces protéines et l'ADN-cellulose. Afin de vérifier que cette interaction est due à l'ADN et non à la cellulose, la même expérience est faite en parallèle en utilisant une cellulose pure. Dans ce cas, toutes les protéines Ets-1 sont retrouvées dans l'éluat primaire, démontrant la spécificité de la rétention de Ets-1 sur l'ADN.

Le fait que 100% des protéines Ets-1 ne soient pas retenues sur la colonne d'ADN-cellulose peut être dû à plusieurs facteurs:



Comparaison de la capacité de rétention de Ets-1 sur ADN-cellulose entre un ADN double brin et un ADN simple brin.

ss DNA Cellulose: Colonne d'ADN cellulose à ADN simple brin.

ds DNA Cellulose: Colonne d'ADN cellulose à ADN double brin.

FT: éluat primaire; W: lavage; .2 à .75: éluations aux concentrations de NaCl indiquées (en molaire).

Chaque fraction est ensuite analysée par immunoprécipitation pour la présence de Ets-1.

i) La quantité d'ADN n'est pas saturante. Ce point est exclu par l'observation de l'indépendance de la proportion de protéines Ets-1 retenues par rapport à la quantité d'ADN-cellulose mise en jeu.

ii) Certaines formes de Ets-1 sont naturellement incapables d'interagir avec l'ADN (voir plus loin).

iii) Dans le lysat préparé, certains facteurs rendent difficile l'interaction de Ets-1 avec l'ADN.

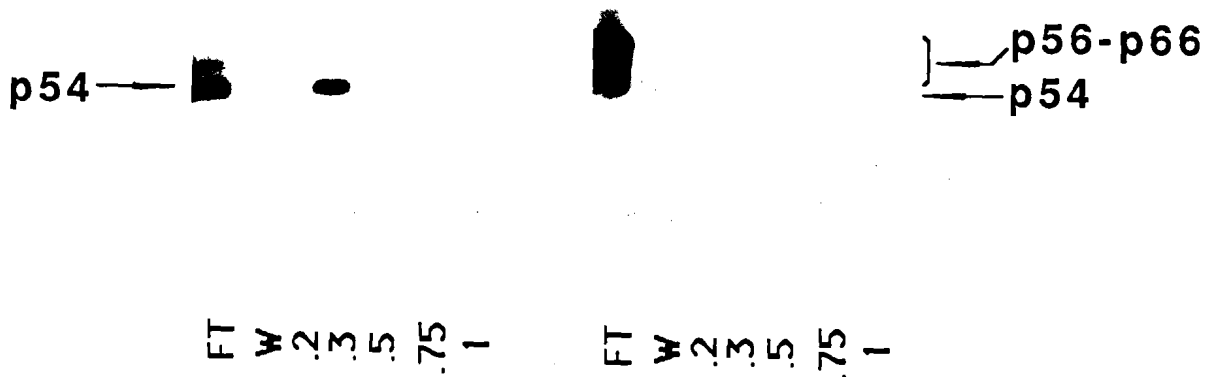
Pour éclairer ce point, nous avons effectué une seconde expérience d'association à l'ADN avec les deux fractions dans lesquelles Ets-1 est observé (figure 17), c'est à dire la fraction d'élution primaire, dans laquelle se trouvent les molécules n'ayant pas été retenues, et la fraction d'élution à haut sel, où seules se trouvent les molécules ayant été retenues. Dans ce cas, nous observons qu'environ 50% des protéines Ets-1 p54 de l'éluat primaire sont retenues par l'ADN, alors que près de 100% des protéines Ets-1 de l'élution à haut sel sont à nouveau retenues. Ceci indique que les protéines ayant déjà interagi avec l'ADN gardent pratiquement toutes cette capacité, excluant ainsi l'idée d'une interaction plus ou moins aléatoire avec l'ADN. Le fait qu'une proportion non négligeable des protéines Ets-1 éluées une première fois soit retenue lors d'une seconde expérience identique indique qu'il existe dans le lysat un ou plusieurs facteurs jouant un rôle de compétiteur pour l'interaction de Ets-1 sur l'ADN-cellulose, et que ces compétiteurs ne sont pas retenus sur la colonne, expliquant que les protéines Ets-1 contenues dans la fraction d'élution à haut sel sont retenues à près de 100% lors d'un second passage sur ADN-cellulose.

Nous avons également, en utilisant la même technique, étudié le comportement de Ets-1 sur une colonne de cellulose où l'ADN greffé est de l'ADN simple brin. La figure 18 indique que Ets-1 est également retenu par l'ADN simple brin, mais avec une affinité plus faible puisque l'élution à lieu vers 200 mM NaCl contre plus de 300 mM pour le double brin.

Remarquons que les points isoélectriques théoriques et

Control

A23187



Comparaison de la capacité de rétention de Ets-1 sur ADN-cellulose en fonction de son état de phosphorylation.

control: un lysat obtenu comme décrit sur la figure 16 est déposé sur colonne d'ADN cellulose comme contrôle.

A23187: un lysat de thymocytes traités en fin de marquage par l'ionophore de calcium est déposé sur colonne d'ADN cellulose dans les mêmes conditions que pour le contrôle.

p54 indique la forme non phosphorylée de Ets-1.

p56-p66 indique les formes phosphorylées de Ets-1.

FT: éluat primaire; W: lavage; .2 à 1: éluations aux concentrations de NaCl indiquées (en molaire).

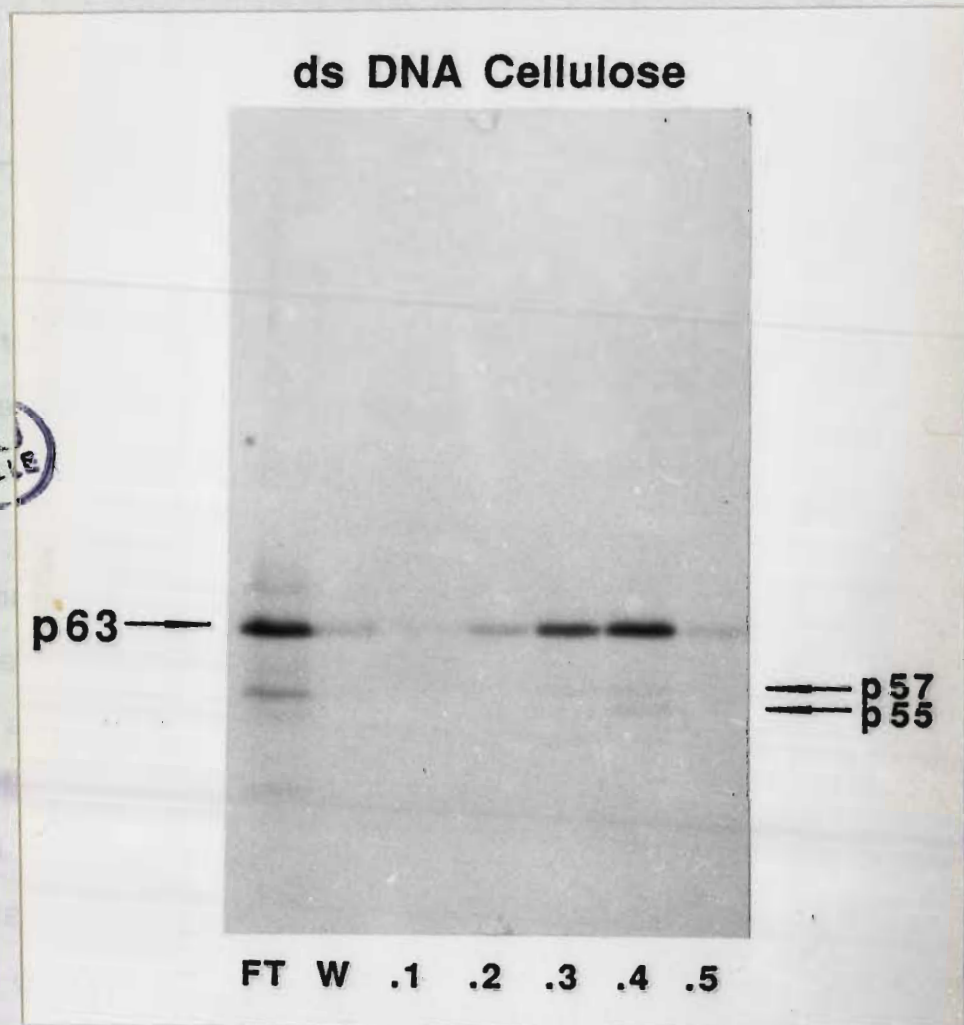
Chaque fraction est ensuite analysée par immunoprécipitation pour la présence de Ets-1.

expérimentaux de Ets-1 se situent vers des valeurs voisines de 5,3, ce qui, au pH où la manipulation est effectuée (pH=7,4), exclut une simple interaction électrostatique globale.

2. Ets-1 perd son affinité pour l'ADN après phosphorylation:

Sur les figures 16 à 18, le lecteur peut remarquer que les formes phosphorylées, toujours présentes de façon minoritaire dans un lysat thymique, sont exclusivement restreintes à la fraction ayant filtré à travers la colonne d'ADN-cellulose, semblant indiquer que les seules formes pouvant être retenues sont des formes non modifiées. Afin de vérifier cette observation, nous avons profité de la possibilité d'augmenter la proportion des formes phosphorylées dans la population de Ets-1 par simple traitement des thymocytes à l'ionophore de calcium A23187, comme nous l'avons décrit plus haut. Les lysats ainsi obtenus ont été passés sur ADN-cellulose, avec en contrôle positif un lysat de thymocytes aviaires non traités. La figure 19 indique qu'effectivement l'ensemble des formes phosphorylées de Ets-1 (p56-p66) sont retrouvées dans le premier éluat, alors que les quelques formes non phosphorylées quand même présentes dans ce lysat sont observées dans les éluations à haut sel. Le lysat contrôle, quant à lui, donne un résultat homogène avec nos premières observations: l'éluion de Ets-1 se produit vers 300 mM NaCl.

Nous avons voulu vérifier que les résultats présentés ici n'étaient pas spécifiques à l'espèce aviaire. Pour ce faire, nous avons reproduit les expériences de rétention de Ets-1 sur ADN-cellulose, ainsi que les analyses reflétant l'effet des phosphorylations de Ets-1 sur son habilité à interagir sur l'ADN, avec des lysats de thymocytes murins. La figure 20 montre que la p63 Ets-1 murine est effectivement retenue sur l'ADN-cellulose, et n'est libérée que vers une salinité de 300 mM NaCl. De



La protéine Ets-1 murine est également retenue sur ADN-cellulose.

ds DNA Cellulose: un lysat de thymocytes murins obtenu comme décrit sur la figure 16 est déposé sur colonne d'ADN cellulose à ADN double brin.

p63 indique la forme majeure de Ets-1 chez la souris. p55 indique une protéine fortement similaire à Ets-1. p57 indique la protéine Ets-2 murine.

FT: éluat primaire; W: lavage; .1 à .5: éluations aux concentrations de NaCl indiquées (en molaire).

Chaque fraction est ensuite analysée par immunoprécipitation pour la présence de Ets-1.

Figure 20

même, un mélange volume/volume de lysats provenant de thymocytes contrôles et de thymocytes stimulés par l'A23187 confirme que chez les mammifères également, seules les formes non phosphorylées de Ets-1 sont retenues sur l'ADN-cellulose: la forme de 73 kd observée sur la figure 21 et correspondant à la version phosphorylée majoritaire de Ets-1 murine est exclusivement retrouvée dans l'éluat primaire.

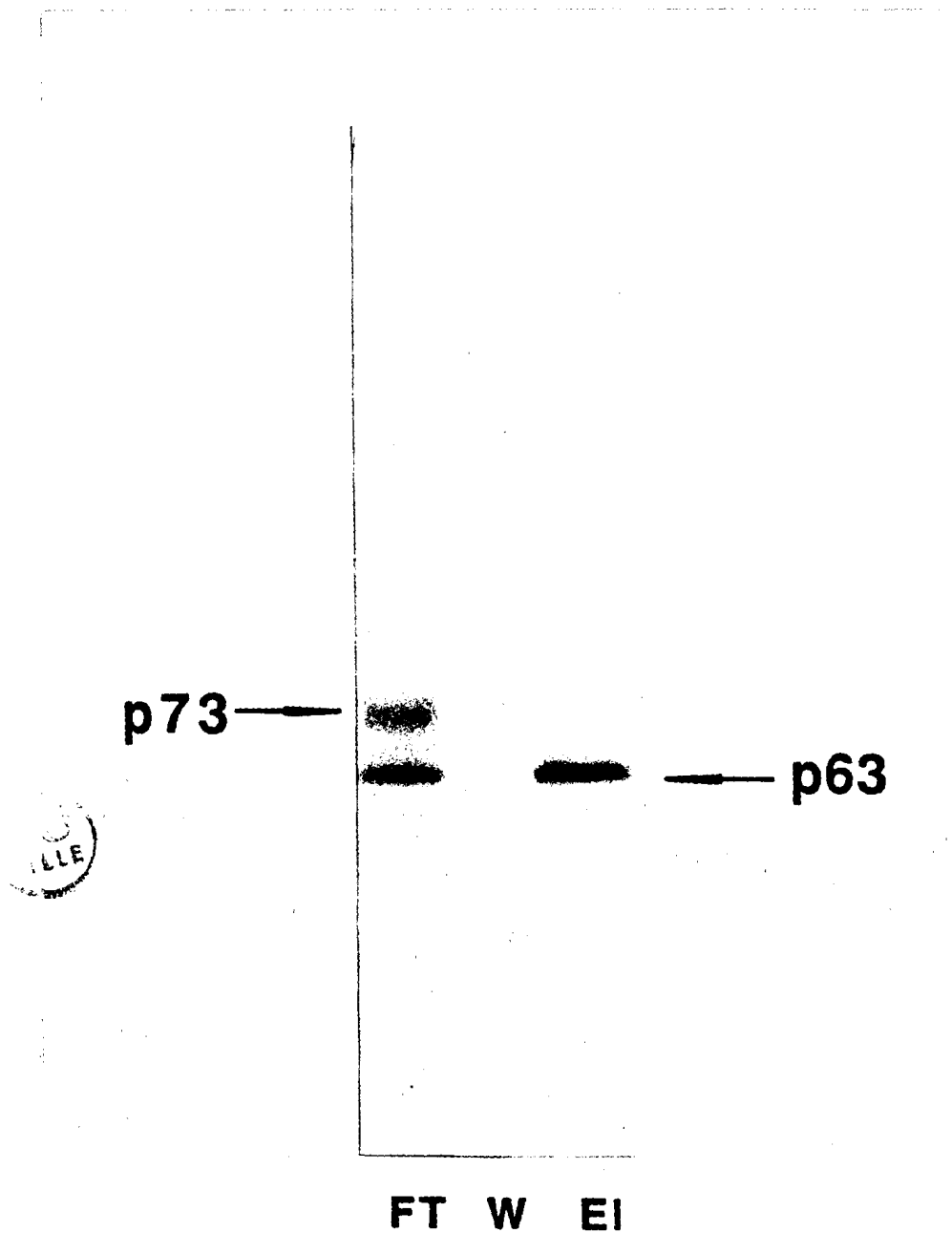
3. Ets-1 est associée à l'ADN in vivo:

L'interaction de Ets-1 avec l'ADN-cellulose, bien que fournissant une indication intéressante, laissait cependant ouverte la question de la réalité biologique de cette observation. Si Ets-1 était effectivement associée à l'ADN in vivo, il devait être possible de la solubiliser en agissant soit sur les liaisons qui la lient à l'ADN, soit en détruisant l'ADN.

Les deux expériences décrites ci-dessous vérifient ces prévisions.

a) Solubilisation de Ets-1 en présence de forces ioniques croissantes.

Nous avons marqué des thymocytes murins à l'aide de méthionine radioactive, et effectué une lyse douce des cellules afin de ne récupérer par centrifugation que les noyaux, dont l'intégrité pouvait être vérifiée par observation sous microscope. Ces noyaux purifiés étaient alors incubés 5 minutes en présence de différentes concentrations salines, puis le contenu de ces noyaux en protéines Ets-1 était comparé à celui du milieu d'incubation. La figure 22 montre que si en dessous de 100mM NaCl, Ets-1 reste localisée dans les noyaux, dès 200 mM, la quasi totalité de Ets-1 est solubilisée, démontrant ainsi que les liaisons responsables de la présence de Ets-1 dans les noyaux sont dépendantes de la force ionique du milieu, ce qui est une des caractéristiques des protéines interagissant avec l'ADN.



**Seule la forme non phosphorylée de la protéine
Ets-1 murine est retenue sur ADN-cellulose.**

Un lysat de thymocytes murins obtenu comme décrit sur la figure 16 est mélangé à un volume équivalent de lysat de thymocytes murins stimulés par l'ionophore de calcium A23187, et déposé sur colonne d'ADN cellulose à ADN double brin.

p63 indique la forme non phosphorylée de Ets-1 chez la souris et p73 la forme phosphorylée prédominante.

FT: éluat primaire; W: lavage; EI: élution par 0.5 M de NaCl.

Chaque fraction est ensuite analysée par immunoprécipitation pour la présence de Ets-1.

Figure 21

b) Solubilisation de Ets-1 par digestion de l'ADN chromosomique:

La même préparation de noyaux a cette fois-ci été incubée en présence de nucléase de microcoque, enzyme digérant les acides nucléiques, ou de RNaseA, enzyme spécifique des acides ribonucléiques comme son nom l'indique. Un contrôle, traité de la même façon, mais sans adjonction d'enzyme, a également été effectué. Après 1 heure de digestion sur la glace, nous avons arrêté la réaction en amenant le milieu à 5 mM EDTA, ce qui perméabilise également la membrane nucléaire. Les noyaux résiduels ont alors été séparés des surnageants par centrifugation, et chaque fraction a été analysée pour la présence de Ets-1 par immunoprécipitation. La figure 23, panneau A, indique sans ambiguïté que 100 unités de nucléase de microcoque libèrent au moins 80% de Ets-1, alors que dans le contrôle comme dans la digestion en présence de RNase, Ets-1 reste intégralement dans la fraction nucléaire. Ceci montre que Ets-1 est effectivement associée avec l'ADN. Notons que seule une faible proportion d'ADN se retrouve dans le surnageant après digestion par la nucléase de microcoque (panneau C), ainsi qu'une faible fraction d'histones (panneau B). Ceci indique que la grande majorité des molécules Ets-1 se trouve sur une portion restreinte de l'ADN chromosomique, indiquant que la répartition de cette protéine sur les chromosomes n'est pas alléatoire. Qui plus est, nous observons que H1, histone impliquée dans le niveau supérieur de structuration de la chromatine, et caractéristique de régions non actives soit pour la réplication, soit pour la transcription, n'est pas du tout libérée dans les conditions de notre traitement. Ceci est en faveur d'une localisation de Ets-1 sur les régions chromosomiques déroulées, et donc actives.

Ces résultats nous confirment donc que Ets-1 est physiologiquement associé à l'ADN, et semble plus particulièrement impliqué dans les régions dites "ouvertes" de la chromatine, c'est à dire actives pour la transcription ou la réplication.



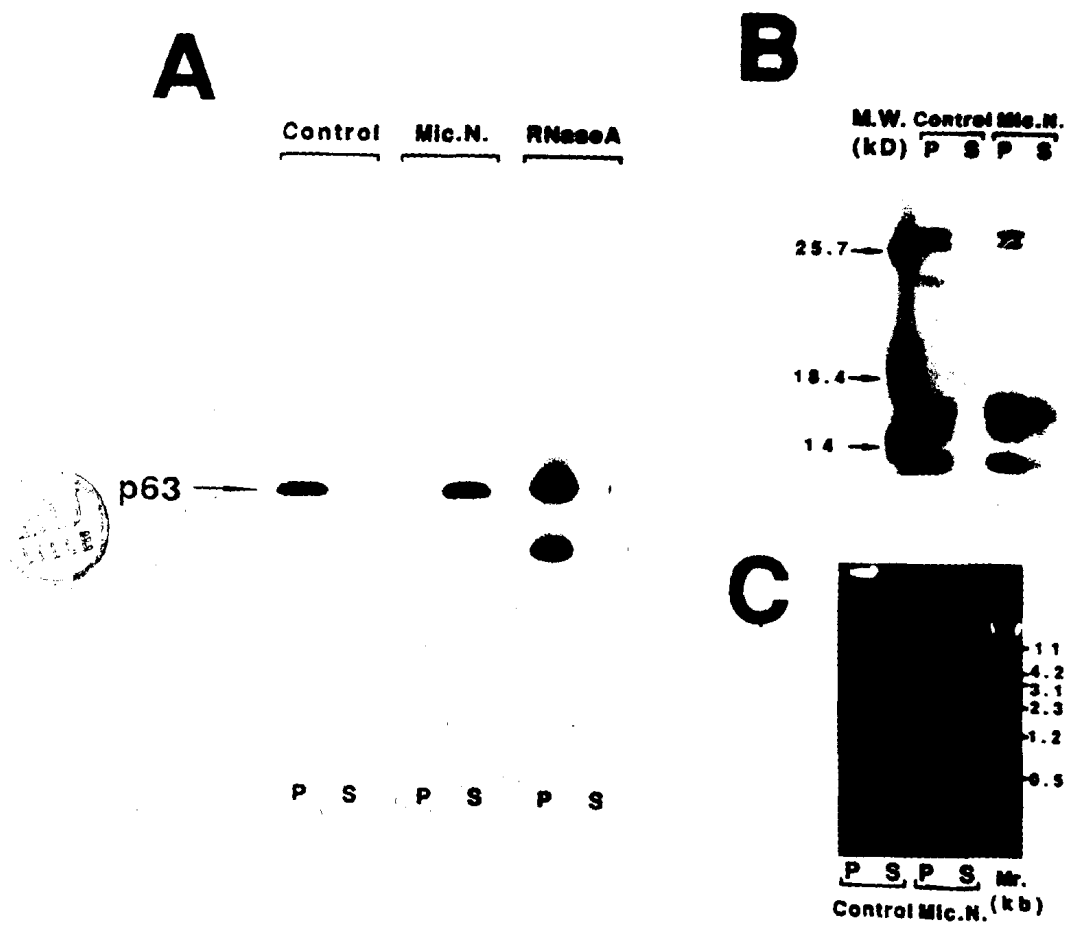
Solubilisation de la protéine Ets-1 murine à partir de noyaux isolés de thymocytes.

Les noyaux isolés sont incubés 5 minutes dans des tampons dont les salinités sont indiquées en molaire (de 0 à .6). Les noyaux résiduels (P) sont ensuite séparés des surnageants (S) par centrifugation, et chaque fraction est alors analysée par immunoprécipitation pour la présence de Ets-1.

Figure 22

4. Effet des modifications post-traductionnelles de Ets-1 sur son affinité pour l'ADN chromosomique:

Il nous restait cependant un point à confirmer: nous avons vu que, in vitro, les versions phosphorylées étaient incapables d'interagir avec l'ADN. Qu'en est-il dans la cellule? Des expériences de fractionnement cellulaire nous ont apporté la réponse: nous avons comparé la distribution des formes phosphorylées de Ets-1 dans les différentes fractions cellulaires obtenues avec celle observée pour la forme non phosphorylée. Nous avons préparé trois fractions. La première, appelée cytosolique brute, a été obtenue par simple éclatement des thymocytes en milieu hypotonique, suivi d'une centrifugation à 1000 g afin d'en séparer les noyaux. Ces noyaux ont été lavés dans la même solution, ce qui fournit la solution de lavage. Enfin, ces noyaux lavés ont constitué la dernière fraction, dite nucléaire. La Figure 24 illustre les résultats obtenus: les formes phosphorylées sont présentes principalement dans la fraction cytosolique brute, alors que les protéines Ets-1 non phosphorylées sont très majoritairement observées dans la fraction nucléaire. Nos précédentes expériences de fractionnement cellulaire nous ont appris à être très prudent dans l'interprétation de tels résultats. Une chose semble cependant acquise ici: dans les conditions de fractionnement utilisées, les événements de phosphorylation affectant Ets-1 modifient au moins son affinité pour l'ADN chromosomique puisque les versions phosphorylées et non phosphorylées sont distribuées de manière quasi exclusive entre les fractions nucléaires et les fractions cytosoliques brutes. L'interprétation la moins prudente serait de dire que la phosphorylation de Ets-1, en plus de la suppression de toute interaction avec l'ADN, entraînerait la délocalisation subcellulaire de ce produit. Une telle assertion, pour être confirmée, nécessiterait des expériences de localisation des différents produits in situ.



Solubilisation de la protéine Ets-1 murine à partir de noyaux isolés de thymocytes.

Panneau A: Les noyaux isolés sont incubés 1 heure en présence de nucléase de microcoque (Mic.Nuc.), de RNaseA (RNaseA) ou tel quel (Control). Les réactions sont arrêtées par une incubation supplémentaire de 15 minutes en présence de 5mM EDTA. Les noyaux résiduels (P) sont ensuite séparés des surnageants (S) par centrifugation, et chaque fraction est alors analysée par immunoprécipitation pour la présence de Ets-1.

Panneaux B et C: Ces différentes fractions sont analysées pour leur contenu en protéines totales par migration sur gel d'acrylamide et coloration au bleu de Coomassie, et pour leur contenu en ADN par migration sur gel d'agarose et visualisation à l'aide de bromure d'éthidium.

Figure 23

DISCUSSION

Control A23187 Control A23187 Control A23187



p73 —
p63 —

b | i | i | b | b | i | i | b | b | i | i | b
Crude Cyto. Nuclear wash Nuclei

Les protéines Ets-1 de la souris se distribuent de manière différentielle lors d'expériences de fractionnement cellulaire selon leur état de phosphorylation.

Des thymocytes murins ont été marqués (Control) puis stimulés par l'ionophore de calcium A23187 (A23187). Un fractionnement a alors été effectué et les fractions suivantes analysées par immunoprécipitation:

Crude cyto.: fraction cytosolique brute. Nuclear wash: fraction de lavage des noyaux. Nuclei: noyaux. p63 et p73 indiquent les formes non phosphorylées et phosphorylées de Ets-1, respectivement. i: immunoprécipitation réalisée avec le sérum spécifique de Ets-1. b: immunoprécipitation réalisée avec le même sérum préalablement bloqué par incubation en présence d'un excès de son peptide synthétique spécifique.

Le principal message qui ressort de ce que nous venons de présenter est sans doute le suivant: Ets-1 interagit avec l'ADN, et cette interaction est physiologiquement modulée par l'intermédiaire des fluctuations de la concentration intracellulaire en calcium.

Ceci ouvre un domaine d'investigation considérable: quelle activité biologique Ets-1 assure-t-elle sur l'ADN? L'observation d'une corrélation entre l'ouverture de la chromatine et la présence de Ets-1 va à l'encontre d'un rôle purement structural. Par contre, les phosphorylations rapides et transientes de Ets-1, directement responsables de la modulation de son affinité pour l'ADN, font penser à un éventuel rôle dans la régulation de l'expression génique en réponse à divers stimuli résultant en une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium.

Des résultats préliminaires sur Ets-1 purifiée semblent indiquer que l'activité d'interaction à l'ADN est intrinsèque à cette protéine. Cependant, rien n'exclut que d'autres facteurs puissent également intervenir, et s'assemblent ainsi en un complexe dont l'activité pourrait être modulée suivant les participations des différents éléments pouvant le constituer.

D'autre part, nous ne pouvons également pas exclure une éventuelle implication de Ets-1 dans la réplication de l'ADN. En effet, tous les systèmes décrits ici où les cellules entrent en mitose de manière relativement synchrone, présentent une expression accrue de l'expression de Ets-1.

L'observation du niveau élevé de Ets-1 dans les cellules lymphoïdes laisse cependant imaginer qu'une fonction plus spécifique à ce tissu pourrait impliquer Ets-1. Il est, par exemple, troublant de constater la corrélation entre l'état de maturation des lymphocytes B et l'expression de Ets-1. Tout aussi troublante d'ailleurs est l'observation de la complémentarité d'expression de Ets-2 dans ce même système.

Peut-être est-il sage de ne pas exclure tous ces résultats les uns

des autres, malgré leur apparente dispersion. Insistons sur le fait qu'un produit, aussi crucial soit-il, ne serait d'aucun effet sur la physiologie cellulaire si les autres facteurs avec lesquels il peut interagir n'étaient également présents. Ainsi, cette apparente pléiotropie fonctionnelle reflète peut-être une complexité d'interactions de Ets-1 avec divers autres produits cellulaires, lui permettant de participer à différentes facettes de la vie cellulaire.

L'étape suivante de l'approche décrite ici sera probablement la recherche de séquences nucléiques sur lesquelles Ets-1 pourrait plus spécifiquement interagir. Ceci permettrait alors de vérifier plusieurs hypothèses de fonctions pour Ets-1. Par exemple, la séquence spécifique, si elle existe, clonée à proximité d'un gène rapporteur, permet-elle une modification de l'expression de cette séquence en fonction de la présence de Ets-1? De même, cette séquence putative peut-elle modifier la réplication d'un plasmide rapporteur lorsque le niveau de Ets-1 varie? Enfin, la phosphorylation de Ets-1 a-t-elle, comme attendu, un effet sur ces différents systèmes?

Tout ceci représente en peu de mots un domaine d'investigation qui va s'élargissant, mais qui devrait permettre de mieux appréhender la (ou les) fonction (s) moléculaire (s) de Ets-1.

Une autre approche consisterait à rechercher les éventuels facteurs ayant la capacité d'interagir avec Ets-1, dans l'espoir de trouver parmi eux un produit déjà caractérisé par ailleurs, ce qui permettrait de cibler beaucoup plus simplement une des fonctions de Ets-1.

Quoiqu'il en soit, et comme toujours dans le domaine de la recherche, les quelques réponses que nous avons pu apporter ici amènent un nombre encore plus grand de questions, auxquelles nous nous efforcerons de répondre malgré tout!

BIBLIOGRAPHIE

- ALLISON,L.A., MOYLE,M., SHALES,M. and INGLES,C.J. (1985). Extensive homology among largest subunits of eukaryotic and prokaryotic RNA polymerases.
Cell **42** : 599-610.
- ANGEL,P., IMAGAWA,M., CHIU,R., STEIN,B., IMBRA,R.J., RAHMSDORF,H.J., JONAT,C., HERRLICH,P. and KARIN,M. (1987). Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor.
Cell **49** : 729-739.
- BADING,H., HANSEN,J. and MOELLING,K. (1987). Selective DNA binding of the human cellular Myb protein isolated by immunoaffinity chromatography using a monoclonal antibody.
Oncogene **1** : 395-401.
- BARBER,J.B. and VERMA,I.M. (1987). Modification of fos proteins: Phosphorylation of c-fos, but not v-fos, is stimulated by 12-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate and serum.
Mol. Cell. Biol. **7** : 2201-2211.
- BASU,M., FRICK,K., SEN-MAJUMDAR,A., SCHER,C.D. and DAS,M. (1985). EGF receptor-associated DNA-nicking activity is due to a M_r -100,000 dissociable protein.
Nature **316** : 640-641.
- BISTER,K., NUNN,M., MOSCOVICI,C., PERBAL,B., BALUDA,M.A. and DUESBERG,P.H. (1982). Acute leukemia viruses E26 and avian myeloblastosis virus have related transformation specific RNA sequences but different genetic structures, gene products and oncogenic properties.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79** : 3677-3681.
- BLANCHARD,J.M., PIECHACZYK,M., DANI,C., CHAMBARD,J.C., FRANCHI,A., POUYSSEGUR,J. and JEANTTEUR,P. (1985). *c-myc* gene is transcribed at high rate in G_0 arrested fibroblasts and is post-transcriptionally regulated in response to growth factors.
Nature **317** : 443-445.
- BOHMANN,D., BOS,T.J., ADMON,A., NISHIMURA,T., VOGT,P.K. and TJIAN,R. (1987). Human proto-oncogene *c-jun* encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1.
Science **238** : 1386-1392.

- BOULUKOS,K.E., POGNONEC,P., BEGUE,A., GALIBERT,F., GESQUIERE,J.C., STEHELIN,D. and GHYSDAEL,J. (1988). Identification in chicken of an evolutionarily conserved cellular *ets-2* gene (*c-ets-2*) encoding nuclear proteins related to the products of the *c-ets* oncogene. *EMBO J.* **7**: 697-705.
- BUSHMAN,F.D. and PTASHNE,M. (1988). Turning lambda Cro into a transcriptional activator. *Cell* **54** : 191-197.
- CAVALIERI,F., RUSCIO,T., TINOCO,R., BENEDICT,S., DAVIS,C and VOGT,P.K. (1985). Isolation of three new avian sarcoma viruses: ASV 9, ASV 17, and ASV 25. *Virology* **143** : 680-683.
- CEREDIG,R., DIALYNAS,D.P., McKEARN,T.J. and McDONALD,H.R. (1983). Precursors of T-cell growth factor producing cells in the thymus: Ontogeny, frequency and quantitative recovery in a subpopulation of phenotypically mature thymocytes defined by monoclonal antibody GK-1.5. *J. Exp. Med.* **158** : 1654-1671.
- CURRAN,T., Van BEVEREN,C., LING,N. and VERMA,I.M. (1985). Viral and cellular Fos proteins are complexed with a 39000 dalton cellular protein. *Mol. Cell. Biol.* **5** : 167-172.
- CHEN,J.H. (1985). The proto-oncogene *c-ets* is preferentially expressed in lymphoid cells. *Mol. Cell. Biol.* **5**: 2993-3000.
- CHEN,J.H. (1988). Complementary DNA clones of chicken proto-oncogene *c-ets*: sequence divergence from the viral oncogene *v-ets*. *Oncogene Res.* **2** : 371-384.
- CHIU,R., BOYLE,W.J., MEEK,J., SMEAL,T., HUNTER,T. and KARIN,M. (1988). The c-Fos protein interacts with c-Jun:AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. *Cell* **54** : 541-552.
- COCKROFT,S. and TAYLOR,J.A. (1987). Fluoroaluminates mimic guanosine 5'-[γ -thio]triphosphate in activating the phosphoinositide phosphodiesterase of hepatocyte membranes. *Biochem. J.* **241** : 409-414.

- DeFEO-JONES,D., SCOLNICK,E.M., KOLLER,R. and DHAR,R. (1983). *ras*-related gene sequences identified and isolated from *Saccharomyces cerevisiae*.
Nature **306** : 707-709.
- DICKSON,C. and PETERS,G. (1987). Potential oncogene product related to growth factors.
Nature **326** : 833.
- DOOLITTLE,R.F., HUNKAPILLER,M.W., HOOD,L.E., DEVARE,S.G., ROBBINS,K.C., AARONSON,S.A. and ANTONIADES,H.N. (1983). Simian sarcoma virus oncogene *v-sis* is derived from the gene (or genes) encoding a platelet derived growth factor.
Science **221** : 275-277.
- DOWNWARD,J., YARDEN,Y., MAYES,E., SRACE,G., TOTTY,N., STOCKWELL,P., ULLRICH,A., SCHLESSINGER,J. and WATERFIELD,M.D. (1984). Close similarity of epidermal growth factor receptor and *v-erbB* oncogene protein sequences.
Nature **307** : 521-527.
- DUTERQUE-COQUILLAUD,M., LEPRINCE,D., FLOURENS,A., HENRY,C., GHYSDAEL,J., DEBUIRE,B. and STEHELIN,D. (1988). Cloning and expression of chicken p54 cDNAs: the first p54^{c-ets} coding exon is located into the 40.0 kbp genomic domain unrelated to *v-ets*.
Oncogene Res. **2** : 335-344.
- FINKEL,T.H., Mc DUFFIE,M., KAPPLER,J.W., MARRACK,P. and CAMBIER,J.C. (1987). Both immature and mature T cells mobilize Ca²⁺ in response to antigen receptor crosslinking.
Nature **330** : 179-181.
- FORMAN,B.M., YANG,C.R., STANLEY,F., CASANOVA,J. and SAMUELS,H.H. (1988). *c-erbA* proto-oncogenes mediate thyroid hormone-dependent and -independent regulation of the rat growth hormone and prolactin genes.
Mol. Endoc. (in press).
- FUJIWARA,S., FISHER,R.J., SETH,A., BHAT,N.K., SHOWALTER,S.D., ZWEIG,M. and PAPAS,T.S. (1988). Characterization and localization of the products of the human homologs of the *v-ets* oncogene.
Oncogene **2** : 99-103.
- GELINAS,C. and TEMIN,H.M. (résultats non publiés). The product of the *v-rel* oncogene is a cell-specific transcriptional activator of certain promoters.

- GHYSDAEL,J., GEGONNE,A., POGNONEC,P., DERNIS,D., LEPRINCE,D. and STEHELIN,D. (1986a). Identification and preferential expression in thymic and bursal lymphocytes of a *c-ets* oncogene encoded Mr 54,000 cytoplasmic protein.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83** : 1714-1718.
- GHYSDAEL,J., GEGONNE,A., POGNONEC,P., BOULUKOS,K.B., LEPRINCE,D., DERNIS,D., LAGROU,C. and STEHELIN,D. (1986b). Identification in chicken macrophages of a set of proteins related to, but distinct from, the chicken cellular *c-ets*-encoded protein p54^{*c-ets*}.
EMBO J. **5** : 2251-2256.
- GILMORE,T.D. and TEMIN,H.M. (1986). Different localization of the product of the *v-rel* oncogene in chicken fibroblasts and spleen cells correlates with transformation by REV-T.
Cell **44** : 791-800.
- GILMORE,T.D. and TEMIN,H.M. (1988). *v-rel* proteins in the nucleus and in the cytoplasm transform chicken spleen cells.
J. Virol. **62** : 703-714.
- GISSELBRECHT,S., FICHELSON,S., SOLA,B., BORDEREAUX,D., HAMPE,A., ANDRE,C., GALIBERT,F. and TAMBOURIN,P. (1987). Frequent *c-fms* activation by proviral insertion in mouse myeloblastic leukaemias.
Nature, **329** : 259-261.
- GOLDBERG,Y., GLINEUR,C., GESQUIERE,J.C., RICOUART,A., SAP,J., VENNSTRÖM,B. and GHYSDAEL,J. (1988). Activation of protein kinase C or cAMP-dependent protein kinase increase phosphorylation of the *c-erb-A*-encoded thyroid hormone receptor and of the *v-erb-A* encoded protein.
EMBO. J **7** : 2425-2433.
- GREENBERG,M.E. and ZIFF,E.B. (1984). Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the *c-fos* proto-oncogene.
Nature **311** : 433-438.
- HESKETH,T.R., MOORE,J.P., MORRIS,J.D.H., TAYLOR,M.V., ROGERS,J., SMITH,G.A. and METCALFE,J.C. (1985). A common sequence of calcium an pH signals in the mitogenic stimulation of eucaryotic cells.
Nature **313** : 481-484.

- HUANG,K.S., WALLNER,B.P., MATTALIANO,R.J., TIZARD,R., BURNE,C., FREY,A., HESSION,C., McGRAY,P., SINCLAIR,L.K., CHOW,E.P., BROWNING,J.L., RAMACHANDRAN,K.L., TANG,J., SMART,J.E. and PEPINSKY,R.B. (1986). Two human 35 kd inhibitors of phospholipase A₂ are related to the substrate of pp60^{v-src} and of the epidermal growth factor receptor/kinase.
Cell **46** : 191-199.
- IGUCHI-ARIGA,S.M.M., ITANI,T., KIJU,Y. and ARIGA,H. (1987). Possible function of the *c-myc* product: Promotion of cellular DNA replication.
EMBO J. **6** : 2365-2371.
- IZUMO,S. and MAHDAVI,V. (1988). Thyroid hormone receptor alpha isoforms generated by alternative splicing differentially activate myosin HC gene transcription.
Nature **334** : 539-542.
- JOTEREAU,F.V. and Le DOUARIN,N.M. (1982). Demonstration of a cyclic renewal of the lymphocyte precursor cells in the quail thymus during embryonic and perinatal life.
J.Immunol. **129** : 1869-1877.
- KAMPS,M.P., BUSS,J.E. and SEFTON,B.M. (1985). Mutation of NH₂-terminal glycine of p60src prevents both myristoylation and morphological transformation.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82** : 4625-4628.
- KINGSTON,R.E., BALDWIN Jr,A.S. and SHARP,P.A. (1984). Regulation of heat shock protein 70 gene expression by *c-myc*.
Nature **312** : 280-282.
- KINGSTON,R., JENKINSON,E.J. and OWEN,J.T. (1985). A single stem cell can recolonize an embryonic thymus, producing phenotypically distinct T-cell populations.
Nature **317** : 811-813.
- KLEMPNAUER,K.H., GONDA,T.L. and BISHOP,J.M. (1982). Nucleotide sequence of the retroviral leukemia gene *v-myb* and its cellular progenitor *c-myb*: The architecture of a transduced oncogene.
Cell **31**: 453-463.
- KRUIJER,W., COOPER,J.A., HUNTER,T. and VERMA,I.M. (1984). Platelet-derived growth factor induces rapid but transient expression of the *c-fos* gene and protein.
Nature **312** : 711-716.

- LAMPH,W.W., WAMSLEY,P., SASSONE-CORSI,P. and VERMA,I.M. (1988). Induction of proto-oncogene *jun/AP-1* by serum and TPA. *Nature* **334** : 629-631.
- LECH,K., ANDERSON,K. and BRENT,R. (1988). DNA-bound Fos proteins activate transcription in yeast. *Cell* **52** : 179-184.
- LEPRINCE,D., GEGONNE,A., COLL,J., De TAISNE,C., SCHNEEBERGER,A., LAGROU,C. and STEHELIN,D. (1983). A putative second cell-derived oncogene of the avian leukemia retrovirus E26. *Nature* **306** : 395-397.
- LEPRINCE,D., DUTERQUE-COQUILLAUD,M., LI,R.P., HENRY,C., FLOURENS,A., DEBUIRE,B. and STEHELIN,D. (1988). Alternative splicing within the chicken *c-ets-1* locus: Implications for transduction within the E26 retrovirus of the *c-ets* proto-oncogene. *J. Virol.* **62** : 3233-3241.
- LUSCHER,B., KUENZEL,E.A., KREBS,E.G. and EISENMAN,R.N. (résultats non publiés). Casein kinase II and mitosis-specific phosphorylations of nuclear oncoproteins.
- MACARA,I.G., MARINETTI,G.V. and BALDUZZI,P.C. (1984). Transforming protein of avian sarcoma virus UR2 is associated with phosphatidylinositol kinase activity: Possible role intumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81** : 2728-2732.
- McDONALD,H.R. and NABHOLZ,M. (1986). T-cell activation. *Ann.Rev.Cell Biol.* **2** : 231-253.
- McGRATH,J.P., CAPON,D.J., GOEDDEL,D.V. and LEVINSON,A.D. (1984). Comparative biochemical properties of normal and activated human *ras* p21 protein. *Nature* **310** : 644-649.
- MAKI,Y. BOS,T.J., DAVIS,C., STARBUCK,M. and VOGT,P.K. (1987). Avian sarcoma virus 17 carries the *jun* oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84** : 2848-2852.
- MARTIN,P., HENRY,C., FERRE,F., DUTERQUE-COQUILLAUD,M., LAGROU,C., GHYSDAEL,J., DEBUIRE,B., STEHELIN,D. and SAULE,S. (1986). Transformation of quail embryo fibroblasts by a retrovirus carrying a normal human *c-myc* gene. *EMBO J.* **5** : 1529-1533.

- MAYER,B.J., HAMAGUCHI,M. and HANAFUSA,H. (1988). A novel viral oncogene with structural similarity to phospholipase C.
Nature **332** : 272-275.
- MROCZKOWSKI,B., MOSIG,G. and COHEN,S. (1984). ATP-stimulated interaction between epidermal growth factor receptor and supercoiled DNA.
Nature **309** : 270-273.
- MÜLLER,R., BRAVO,R., BURCKHARDT,J. and CURRAN,T. (1984). Induction of *c-fos* gene and protein by growth factors precedes activation of *c-myc*.
Nature **312** : 716-720.
- MÜLLER,R., BRAVO,R., MÜLLER,D., KURZ,C. and RENZ,M. (1987). Different types of modification in *c-fos* and its associated p39: Modulation of DNA binding by phosphorylation.
Onc. Res. **2** : 19-32.
- NUNN,M.F., SEEBURG,P.H., MOSCOVICI,C. and DUESBERG,P.H. (1983). Tripartite structure of the avian erythroblastosis virus E26 transforming gene.
Nature **306**: 391-395.
- PETERSON,T.A., YOCHER,J., BYERST,B., NUNN,M.F., DUESBERG,P.H., DOOLITTLE,R.S. and REED,S.I. (1984). A relationship between the yeast cell cycle genes CDC4 and CDC36 and the *ets* sequence of oncogenic virus E26.
Nature **309** : 556-558.
- RADKE,K., BEUG,H., KORNFELD,S. and 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.
- RAULET,D.H., GARMAN,R.D., SAITO,H. and TONEGAWA,S. (1985). Developmental regulation of T-cell receptor gene expression.
Nature **314** : 103-107.
- RAUSCHER,F.J., COHEN,D.R., CURRAN,T., BOS,T.J., VOGT,P.K., BOHMANN,D., TJIAN,R. and FRANZA,B.R. (1988). Fos-associated protein p39 is the product of the *jun* proto-oncogene.
Science **240** : 1010-1016.
- REDDY,E.S.P., RAO,V.N. and PAPAS,T.S. (1987). The *erg* gene: A human gene related to the *ets* oncogene.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84** : 6131-6135.

- RENZ,M., VERRIER,B., KURZ,C. and MÜLLER,R. (1987). Chromatin association and DNA binding properties of the *c-fos* proto-oncogene product.
Nucleic Acid Res. **15** : 277-292.
- ROUS,P. (1911). A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separatable from the tumor cells.
J.Exp.Med. **13**: 397-411.
- ROUSSEL,M., SAULE,S.,LAGROU,C., ROMMENS,C., BEUG,H., GRAF,T. and STEHELIN,D. (1979). Three new types of viral oncogene of cellular origin specific for haematopoietic cell transformation.
Nature **281** : 452-455.
- SAMBUCETTI,L.C. and CURRAN,T. (1986). The Fos protein complex is associated with DNA in isolated nuclei and binds to DNA cellulose.
Science **234** : 1417-1419.
- SANTORO,C., MERMOD,N., ANDREWS,P.C. and TJIAN,R. (1988). A family of human CCAAT-box-binding proteins active in transcription and DNA replication: Cloning and expression of multiple cDNAs.
Nature **334** : 218-224.
- SAP,J., MÜNOZ,A., DAMM,K., GOLDBERG,Y., GHYSDAEL,J., LEUTZ,A., BEUG,H. and VENNSTRÖM,B. (1986). The *c-erbA* protein is a high-affinity receptor for thyroid hormone.
Nature **324**: 635-640.
- SASSONE-CORSI,P., SISSON,J.C. and VERMA,I.M. (1988a). Transcriptional autoregulation of the proto-oncogene *fos*.
Nature **334** : 314-319.
- SASSONE-CORSI,P., LAMPH,W.W., KAMPS,M. and VERMA,I.M. (1988b). *fos*-associated cellular p39 is related to nuclear transcription factor AP-1.
Cell **54** : 553-560.
- SCHECHTER,A.L., STERN,,D.F., VAIDYANATHAN,L., DECKER,S.J., DREBIN,J.A., GREENE,M.I. and WEINBERG,R.A. (1984). The neu oncogene: An erb-B-related gene encoding a 185,000-M_r tumour antigen.
Nature **312** : 513-516.
- SCOLLAY,R., BARTLETT,P. and SHORTMAN,K. (1984). T cell development in the adult murine thymus: changes in the expression of the surface antigens Ly2, L3T4 and B2A2 during development from early precursor cells to emigrants. Immunol. Rev. **82** : 79-103.

- SETH,A., PRIEL,E. and Van De WOUDE,G.F. (1987). Nucleoside triphosphate dependent DNA-binding properties of Mos protein.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84** : 3560-3564.
- SHERR,C.J., RETTENMIER,C.W., SACCA,R.S., ROUSSEL,M.F., LOOK,A.T. and STANLEY,E.R. (1985). The *fms* proto-oncogene product is related to the receptor for the mononuclear phagocyte growth factor, CSF-1.
Cell **41** : 665-676.
- SPECTOR,D.H., VARMUS,H.E. and BISHOP,J.M. (1978). Nucleotide sequences related to the transforming gene of avian sarcoma virus are present in the DNA of uninfected vertebrates.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **75** : 4102-4106.
- STEHELIN,D., VARMUS,H.E., BISHOP,J.M. and VOGT,P.K. (1976). DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA.
Nature **260** :170-173.
- SUGIMOTO,Y., WHITMAN,M., CANTLEY,L.C. and ERIKSON,R.L. (1984). Evidence that the Rous sarcoma virus transforming gene product phosphorylates phosphatidylinositol and diacylglycerol.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81** : 2117-2121.
- TODA,T., UNO,I., ISHIKAWA,T., POWERS,S., KATAOKA,T., BROEK,D., CAMERON,S., BORACH,J., MATSUMOTO,K. and WIGLER,M. (1985). In yeast, Ras proteins are controlling elements of adenylate cyclase.
Cell **40** : 27-36.
- TODARO,G.J. and HUEBNER,R.J. (1972). The viral oncogene hypothesis: New evidence.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **69** : 1009-1015.
- TRUNEH,A., ALBERT,F., GOLSTEIN,P. and SCHMITT-VERHULST,A.M. (1985). Early steps of lymphocyte activation bypassed by synergy between calcium ionophores and phorbol ester.
Nature **313** : 318-320.
- TSIEN,R.Y.,POZZAN,T. and RINK,T.J. (1982). T-cell mitogens cause early changes in cytoplasmic free Ca^{2+} and membrane potential in lymphocytes.
Nature **295** : 68-71.

WAKELAM, M.J.O., DAVIES, S.A., HOUSLAY, M.D., MCKAY, I., MARSHALL, C.J. and HALL, A. (1986). Normal p21^{N-ras} couples bombesin and other growth factor receptors to inositol phosphate production. Nature 323 : 173-176.

WATSON, D.K., McWILLIAM-SMITH, M.J., NUNN, M.F., DUESBERG, P.H., O'BRIEN, S.J. and PAPAS, T.S. (1985). The *ets* sequence from the transforming gene of avian erythroblastosis virus, E26, has unique domains on human chromosomes 11 and 21: Both loci are transcriptionally active. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 : 7294-7298.

WONG, S.W., WAHL, A.F., YUAN, P.M., ARAI, N., PEARSON, B.E., ARAI, K.I., KORN, D., HUNKAPILLER, M.W. and WANG, T.S.F. (1988). Human DNA polymerase alpha gene expression is cell proliferation dependent and its primary structure is similar to both prokaryotic and eukaryotic replicative DNA polymerases. EMBO J. 7 : 37-47.

YARDEN, Y., ESCOBEDO, J.A., KUANG, W.-J., YANG-FENG, T.L., DANIEL, T.O., TREMBLE, P.M., CHEN, E.Y., ANDO, M.E., HARKINS, R.N., FRANCKE, U., FRIED, V.A., ULLRICH, A. and WILLIAMS, L.T. (1986). Structure of the receptor for platelet-derived growth factor helps define a family of closely related growth factor receptors. Nature 323 : 226-232.

ANNEXE

ARTICLE 1

publié dans les:

Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie.

Ph. POGNONEC, K. E. BOULUKOS, Anne GEGONNE, Manuella BAILLY, D. STEHELIN and J. GHYSDAEL (*INSERM U 186/CNRS UA 1160, Institut Pasteur, Lille, France*).

Identification and differential expression of the proteins encoded by the *C-ETS-1* and *C-ETS-2* proto-oncogenes.

E26 is a defective avian retrovirus that induces erythroblastosis and myeloblastosis in chickens. The translation product of this virus is a fusion protein encompassing three different domains : Δgag , *v-myb_E* and *v-ets* respectively (NUNN *et al.*, 1983). The Δgag domain comes from a deleted retroviral *gag* gene, whereas the *v-myb* and *v-ets* domains have been transduced from chicken cellular genes. Expression of *v-myb* is sufficient to induce myeloblast transformation, and the expression of *v-ets* is believed to be responsible for erythroblastosis.

Using probes derived from the *v-ets* domain, two cellular loci named *c-ets-1* and *c-ets-2* have been described in the human genome (WATSON *et al.*, 1985). Sera raised against synthetic peptides specific for each of these loci allowed us to characterize the *c-ets-1* and *c-ets-2* proteins. We found *c-ets-1* expressed as a major 55 kd, compound with a minor form with an apparent electrophoretic mobility of 60 kd, which corresponds to a phosphorylated form of the p55 product. *c-ets-2* is expressed as 60 and 64 kd proteins, which are also modified by phosphorylation.

Since we previously found the chicken *c-ets* protein to be expressed at high levels in lymphoid tissues, we performed a survey on different cell lines corresponding to various maturation stages in the B lymphoid lineage. We found that *c-ets-2* expression, both at RNA and protein levels, is predominant in immature B cells, and barely detectable in mature B cells. On the contrary, almost no *c-ets-1* RNA nor protein are detected in immature B cells, whereas they are easily detected in mature B cells. In B cell lines representing an intermediary stage of differentiation, both *c-ets-1* and *c-ets-2* RNA and proteins are expressed, at an intermediate level.

In the case of mature T cells purified from peripheral blood, the main *c-ets* product observed is *c-ets-1*. Interestingly, the level of *c-ets-1* expression is dramatically increased after stimulation of the T cells with PHA in the presence of IL₂. Furthermore, we analysed *c-ets* expression in macrophages isolated either from peripheral blood or from lung alveoli. In both cases, a high expression of *c-ets-2* is observed, whereas no *c-ets-1* expression is detected.

Thus *c-ets-1* and *c-ets-2* expression appears to be inversely regulated during B cell maturation. *c-ets-1* expression may play a role in mature B and T cell activation. The pattern of human *c-ets* expression we described here must be compared to previous results from other laboratories showing a possible involvement of *c-ets-1* in acute monocytic leukaemia and lymphoma (ROVIGATTI *et al.*, 1986; SACCHI *et al.*, 1986).

References

- NUNN, M. F., SEEBURG, P.H., MOSCOVICI, C. & DUESBERG, P.H. (1983) *Nature (London)* **306**, 391-395.
 ROVIGATTI, U., WATSON, D.K. & YUNIS, J.J. (1986) *Science (Washington)* **232**, 398-400.
 SACCHI, N., WATSON, D.K., GUERTS VAN KESSEL, A.H.M., HAGEMELER, A., KERSEY, J., DRABKIN, H.D., PATTERSON, D. & PAPAS, T.S. (1986) *Science (Washington)* **231**, 379-382.
 WATSON, D.K., MC WILLIAMS-SMITH, M.J., NUNN, M.F., DUESBERG, P.H., O'BRIEN, S.J. & PAPAS, T.S. (1985) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **82**, 7294-7298.

ARTICLE 2

publié dans:
EMBO Journal.

Mitogenic stimulation of thymocytes results in the calcium-dependent phosphorylation of c-ets-1 proteins

P. Pognonec, K.E. Boulukos, J.C. Gesquière¹,
D. Stéhelin and J. Ghysdael

INSERM U 186/CNRS UA 041160 and ¹Service de Chimie des
Biomolécules, Institut Pasteur, 1 rue Calmette, 59019 Lille, France

Communicated by D. Stéhelin

Human, murine and chicken c-ets-1 proteins migrate in SDS–polyacrylamide gels as multiple species. We show here that most if not all of this heterogeneity is due to phosphorylation events occurring predominantly on serine and to a lesser extent on threonine residues. These phosphorylations can be specifically and rapidly stimulated by treatment with the calcium ionophore A23187 or abolished by lowering the extracellular calcium concentration to <0.1 μM. The products encoded by c-ets-2 are also phosphorylated in a Ca²⁺-dependent manner, indicating that these modifications have been conserved in the products encoded by different members of the same gene family. In thymocytes, where the expression of c-ets-1 is elevated as compared with other cell types, c-ets-1 protein phosphorylation occurs after stimulation with mitogenic doses of concanavalin A, is short lived and is strictly dependent upon extracellular Ca²⁺ sources. This suggests that the c-ets-1 gene product may play a role in the Ca²⁺-mediated early events linked to T-cell activation.

Key words: c-ets-1/protein phosphorylations/proto-oncogene

Introduction

The importance of the cellular progenitors of retroviral transforming genes in normal cell physiology is supported by the identity of certain proto-oncogene products with either growth factors (Doolittle *et al.*, 1983), morphogenes (Rijsewisk *et al.*, 1987) or receptors to hormone or growth factors (Downward *et al.*, 1984; Sherr *et al.*, 1985; Sap *et al.*, 1986). As might be expected for cellular regulators, proto-oncogene expression is subjected to multiple controls at both transcriptional (Greenberg and Ziff, 1984) and post-transcriptional levels (Knight *et al.*, 1985; Piechaczyk *et al.*, 1985). In addition, regulation of the biochemical function of proto-oncogene products at the post-translational level is also of fundamental importance (Cooper *et al.*, 1986; Hunter, 1987). The identification of the post-translational modifications of proto-oncogene products and the determination of the factors regulating these modifications may thus shed light on the physiological functions of these proteins.

The E26 retrovirus induces a mixed erythroid/myeloid leukemia in chickens and transforms myeloblasts in culture (Graf *et al.*, 1979; Moscovici *et al.*, 1981; Radke *et al.*, 1982). Its genome encompasses three different genetic elements: Δgag, derived from the helper virus, and v-myb_E and v-ets, both transduced from the chicken genome (Le-

prince *et al.*, 1983; Nunn *et al.*, 1983). These genetic elements are expressed as part of a single fusion protein of 135 kd, p135^{gag-myb-ets} (Beug *et al.*, 1982). Using an antiserum to a portion of the v-ets-encoded domain of p135^{gag-myb-ets}, we previously identified two sets of v-ets-related cellular proteins: first, a 54-kd protein (p54^{c-ets-1}) highly related to the v-ets-encoded domain of p135^{gag-myb-ets}, which represents the main translation product of the chicken c-ets-1 proto-oncogene, and which is preferentially expressed in lymphoid cells (Ghysdael *et al.*, 1986a); second, a set of proteins of 58–64 kd (p58–64^{c-ets-2}), expressed at elevated levels in chicken macrophages (Ghysdael *et al.*, 1986b), which represent the translation products of the chicken c-ets-2 gene (Boulukos *et al.*, 1988). Mammalian genomes contain several genes related to v-ets, including c-ets-1 and c-ets-2 (Watson *et al.*, 1985), and erg (Rao *et al.*, 1987; Reddy *et al.*, 1987). We previously noticed that in addition to p54^{c-ets-1}, thymocytes and bursal lymphocytes express low levels of higher molecular weight proteins related to p54^{c-ets-1} but distinct from p58–64^{c-ets-2} proteins (Ghysdael *et al.*, 1986a).

We demonstrate here that these slow migrating species result from the phosphorylation of p54^{c-ets-1}, mainly on serine residues. Furthermore, we show that the degree of phosphorylation of c-ets-1 proteins is modulated by the cytosolic-free calcium concentration ([Ca²⁺]_i). We also identify the human and mouse c-ets-1 proteins and show that they are also subjected to Ca²⁺-dependent phosphorylation modifications. Since the increase in [Ca²⁺]_i following the polyclonal stimulation of thymocytes with mitogenic doses of concanavalin A (Con A) is sufficient to induce a high phosphorylation of the c-ets-1 proteins, we suggest that these modifications modulate the activity of c-ets-1 protein during the early events of T-cell activation.

Results

Minor components with slower electrophoretic mobility are phosphorylated forms of p54^{c-ets-1}

The ets-specific antiserum used in this study was raised against a 56-amino-acid polypeptide corresponding to part of the carboxy-terminal v-ets-encoded domain of the 135-kd transforming protein of avian leukemia virus E26 (Ghysdael *et al.*, 1986a). This polypeptide is part of the region highly homologous between the products encoded by the c-ets-1 and c-ets-2 genes (Watson *et al.*, 1985; Boulukos *et al.*, 1988). As shown in Figure 1, this serum specifically immunoprecipitates a major 54-kd protein (p54^{c-ets-1}) as well as lower amounts of products of apparent mol. wt 62 and 66 kd from lysates of L-[³⁵S]methionine-labelled chicken thymocytes. The same products are detected by Western blot analysis of chicken thymocyte extracts indicating that the heterogeneity observed after metabolic labelling does not result from a tissue culture artifact, but reflects the physiological situation in the organ. These higher molecular

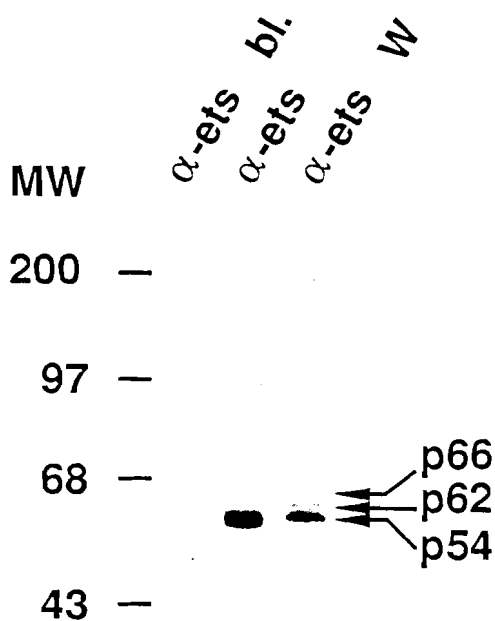


Fig. 1. Western blot and immunoprecipitation analyses of thymocytes lysates. Thymocytes (2×10^7 cells) were labelled for 1 h at 37°C in methionine-free medium supplemented with 5% dialysed calf serum and $250 \mu\text{Ci/ml}$ of L-[^{35}S]methionine. Serum used in the immunoprecipitations were as follows: α -ets bl., L-[^{35}S]methionine-labelled lysate with the anti-ets serum blocked with an excess of its bacterial immunogen; α -ets, L-[^{35}S]methionine-labelled lysate with the anti-ets serum; α -ets W, western blot analysis of a thymus lysate using the anti-ets serum.

weight species do not correspond to the previously described $p58\text{-}64^{c\text{-ets-}2}$ proteins since the two-dimensional tryptic peptide maps of these species are different from those of $p58\text{-}64^{c\text{-ets-}2}$, but indistinguishable from that of $p54^{c\text{-ets-}1}$ (data not shown). These results therefore suggest that these products represent post-translational modifications of $p54^{c\text{-ets-}1}$.

The results of Figure 2, panel A, show immunoprecipitation analyses of chicken thymocyte lysates using the anti-ets serum after metabolic labelling with [^{32}P]orthophosphate. Three major species of 62, 66 and 72 kd are detected (indicated by grey arrows) which comigrate with the slow-migrating forms detected after L-[^{35}S]methionine labelling. The 72-kd phosphoprotein corresponds to a species which is detected in the L-[^{35}S]methionine analysis only after overexposure of the autoradiogram. Two lines of evidence indicate that all of these phosphoproteins represent ets-specific proteins: first, their immunoprecipitation is abolished in the presence of an excess of the bacterial immunogen used to raise the anti-ets serum (Figure 2) and second, partial digestion with V8 protease of each of these proteins generates a similar phosphopeptide pattern (data not shown). The existence of several distinct phosphorylated species together with the fact that the ^{32}P to ^{35}S signal intensity ratios of the c-ets-1 proteins show an inverse relation to their electrophoretic mobility suggests that phosphorylation is solely responsible for the slower electrophoretic mobility of the p62–72 species. Consistent with this hypothesis, treatment of the immune complex containing c-ets-1 proteins with acid phosphatase results in their complete dephosphorylation (data not shown) and in the disappearance of the slow-migrating

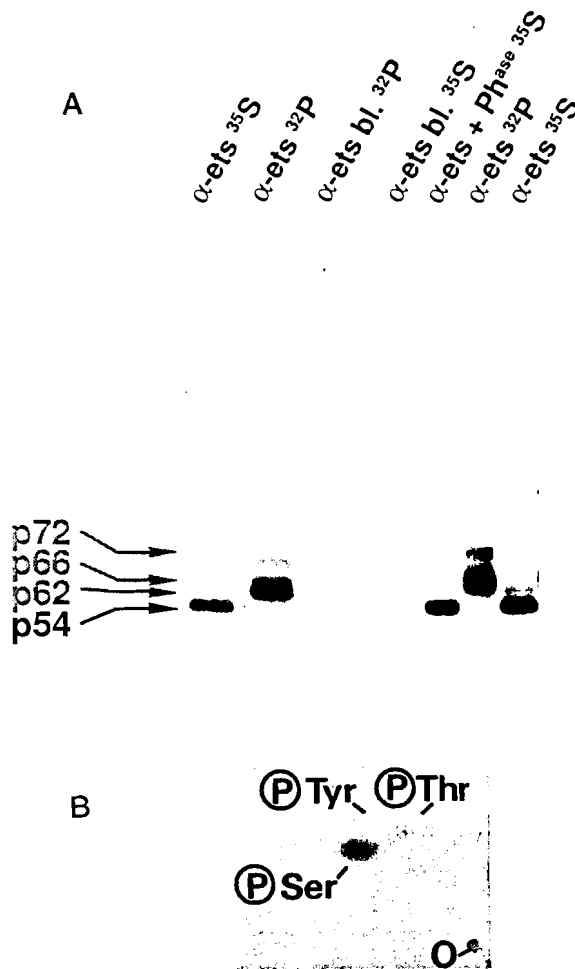


Fig. 2. Analysis of the phosphorylated forms of p54. **Panel A:** α -ets ^{35}S , L-[^{35}S]methionine-labelled thymocytes immunoprecipitated with the anti-ets serum; α -ets ^{32}P , ^{32}P -orthophosphate-labelled thymocytes immunoprecipitated with the anti-ets serum; α -ets bl. ^{32}P , ^{32}P -orthophosphate-labelled thymocytes immunoprecipitated with the anti-ets serum blocked with an excess of its antigen; α -ets bl. ^{35}S , L-[^{35}S]methionine-labelled thymocytes immunoprecipitated with the anti-ets serum blocked with an excess of its bacterial immunogen; α -ets + Ph ^{35}S , L-[^{35}S]methionine-labelled thymocytes immunoprecipitated with the anti-ets serum followed by an acid phosphatase treatment of the immunoprecipitate. Grey arrows indicate the three phosphorylated forms. The two parts of the panel are from two different gels. **Panel B:** phosphoamino-acid analysis of the phosphorylated forms of p54. O, origin; P Ser, marker phosphoserine; P Thr, marker phosphothreonine; P Tyr, marker phosphotyrosine.

species but does not affect the migration of $p54^{c\text{-ets-}1}$ (Figure 2, panel A and Figure 3, panel C). Phosphoamino-acid analysis of a pool of the three major phosphorylated c-ets-1 proteins shows that most of the phosphate is in the form of phosphoserine with trace levels of phosphothreonine (Figure 2, panel B).

We conclude from these results that most, if not all, of the electrophoretic heterogeneity of the c-ets-1 proteins in SDS–polyacrylamide gels is due to multiple phosphorylation events.

p54^{c-ets-1} can be hyper-phosphorylated upon elevation of $[\text{Ca}^{2+}]$;

In order to approach the nature of the kinase(s) involved in $p54^{c\text{-ets-}1}$ phosphorylations, we tested the effect of several



Fig. 3. Effect of different agents on p54 phosphorylation. Each immunoprecipitation was performed with the anti-*ets* serum, on chicken thymocytes labelled for 1 h with L-[³⁵S]methionine after the following treatments: Control, no treatment; TPA, treatment with 160 nM TPA for 5 min; IBMX, treatment with 125 μ M IBMX for 5 min; Forsk., treatment with 10 μ M forskolin for 5 min; A23187, treatment with 2 μ M A23187 for 5 min; EGTA-A23187, treatment with 5 mM EGTA 1 min before adding A23187 at 2 μ M for 5 min; CoCl₂, treatment with 2 mM CoCl₂ for 10 min followed by A23187 at 2 μ M for 10 min; A23187-Ph^{os}, treatment with 2 μ M A23187 for 5 min; immunoprecipitate was further treated with 1 unit/ml potato acid phosphatase. This figure is a composite of four different experiments (A–D).

pharmacological agents known to activate different protein kinases. Treatment of chicken thymocytes with either 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) or forskolin and isobutyl-methyl-xanthine (IBMX) does not affect the phosphorylation level of p54^{*c-ets-1*} nor the migration pattern of L-[³⁵S]methionine-labelled *c-ets-1* proteins, indicating that p54^{*c-ets-1*} phosphorylation does not depend on the activation of either protein kinase C or c-AMP-dependent protein kinase(s) (Figure 3, panel A). In contrast, treatment of thymocytes with 2 μ M of the calcium ionophore A23187 considerably influences the phosphorylation and the electrophoretic mobility of L-[³⁵S]methionine-labelled *c-ets-1* proteins. Two distinct phosphorylation events appear to occur. The first event results in a dramatic increase of the phosphorylation of the 66-kd *c-ets-1* protein (Figure 3, panel B). This increase is paralleled in L-[³⁵S]methionine labelling analysis by the complete disappearance of p54^{*c-ets-1*} and the appearance of a major 66-kd protein (Figure 3, panel A). Treatment of immunoprecipitates containing the L-[³⁵S]methionine-labelled 66-kd species with acid phosphatase results in its complete conversion into p54^{*c-ets-1*} (Figure 3, panel C). We conclude from these data that treatment of thymocytes with A23187 results in the phosphorylation of most of p54^{*c-ets-1*} to generate a species of 66 kd. The second event is the slight increase of the level of p72^{*c-ets-1*} phosphoprotein as shown by the analysis of both [³²P]orthophosphate and L-[³⁵S]methionine-labelled lysates. Observation of this phenomenon with L-[³⁵S]methionine-labelled proteins requires an over-exposure of the gel (Figure 3, panel D). It therefore appears that probably only a small proportion of the *c-ets-1* proteins is subjected to additional phosphorylation events distinct from those generating p66. The stimulatory effect of A23187 is completely inhibited by a short (30 s) pretreatment with either 2 mM cobalt (Co²⁺),

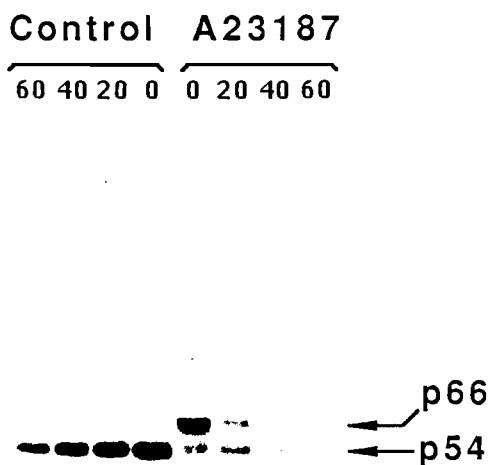


Fig. 4. Determination of the half-life of p54 and of the phosphorylated form of p54. Thymocytes were treated as indicated in Materials and methods. Chase times are indicated in minutes.

a Ca²⁺ competitor, or 5 mM EGTA, a Ca²⁺ chelator (Figure 3, panel A) demonstrating the actual role of Ca²⁺ in the A23187-induced phosphorylation of p54^{*c-ets-1*}.

We conclude from these results that p54^{*c-ets-1*} is modified by multiple Ca²⁺-dependent phosphorylation events. In steady-state conditions, only a few percent of the molecules appear to be phosphorylated, suggesting a regulatory role for these modifications. Consistent with such a hypothesis, pulse-chase experiments indicate that the half-life of p66, which is an approximation of the global phosphate turn-over on this protein, is ~10 min, much shorter than that of p54^{*c-ets-1*}, which is ~45 min (Figure 4).

Mouse and human *c-ets-1* proteins are phosphorylated in a Ca²⁺-dependent manner

The use of a peptide antiserum raised against an amino acid sequence specific to the human *c-ets-1* gene allowed us to identify the human and mouse *c-ets-1* products. This antiserum specifically immunoprecipitates in human cells two proteins of 55 and 60 kd (Hu-p55^{*c-ets-1*} and Hu-p60^{*c-ets-1*}) and in mouse lymphoid cells one major protein of 63 kd (Mo-p63^{*c-ets-1*}), respectively (Figure 5, panel A). Two-dimensional analyses of the L-[³⁵S]methionine-labelled tryptic peptides of these proteins show that they are highly related one to the other and to the chicken p54^{*c-ets-1*} protein (Figure 5, panel B).

The results of Figure 6 show that both the human and mouse *c-ets-1* proteins are hyper-phosphorylated by treatment with the Ca²⁺ ionophore A23187 and that this increase in phosphorylation is accompanied by a concomitant decrease in electrophoretic mobility, bringing the mouse *c-ets-1* protein to an apparent mol. wt of 73 kd and the human protein to an apparent mol. wt of 60 kd. These species correspond to the major products obtained after [³²P]orthophosphate labelling of murine and human cells, respectively (Figure 6). In addition to a major phosphorylated species of 60 kd, an additional 70-kd phosphoprotein is observed in human cells, which may be the counterpart of the 72-kd

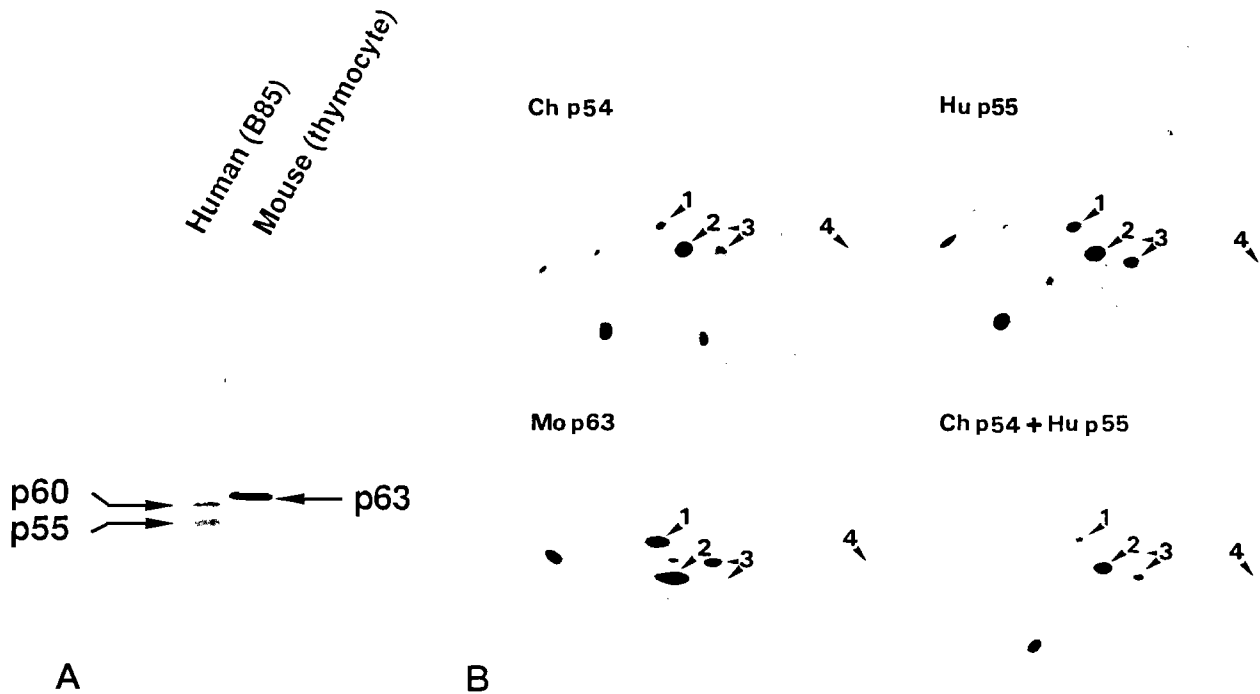


Fig. 5. Characterization of the human and murine *c-ets-1* encoded products. **Panel A:** Human (B85), L-[³⁵S]methionine-labelled human B-cell line B85; Mouse (thymocyte), L-[³⁵S]methionine-labelled murine thymocytes. Both were immunoprecipitated with an anti-*ets-1* serum. **Panel B:** two dimensional L-[³⁵S]methionine-labelled tryptic peptides analyses. Ch p54, chicken p54^{c-ets-1}; Mo p63, murine p63^{c-ets-1}; Hu p55, human p55^{c-ets-1}; Ch p54 + Hu p55, a mixture of the chicken p54^{c-ets-1} protein and of the human p55^{c-ets-1} samples. The four major common peptides are indicated by arrows. The small arrow head on peptide three corresponds to a more oxidized form that is not always observed.

product observed in chicken cells. Similar to the results obtained with the chicken *c-ets-1* proteins, the low mobility in gels of the mouse 73-kd and human 60-kd phosphorylated species can be ascribed solely to phosphorylation since their dephosphorylation with acid phosphatase leads to their conversion into the 63-kd and 55-kd species, respectively (data not shown).

c-ets-2 proteins are also hyper-phosphorylated after treatment with the calcium ionophore A23187

We demonstrated previously that the chicken p60^{c-ets-2} and p64^{c-ets-2} species are phosphorylated versions of the p58^{c-ets-2} and p62^{c-ets-2} primary translation products (Boulukos *et al.*, 1988) (Figure 7). The results of Figure 7 show that treatment of chicken macrophages with A23187 results both in an increased phosphorylation of p60^{c-ets-2} and p64^{c-ets-2} which is paralleled in L-[³⁵S]methionine-labelled cells by a considerable increase in the level of p60^{c-ets-2} and p64^{c-ets-2} species at the expense of p58^{c-ets-2} and p62^{c-ets-2}. Similar results were obtained for the products encoded by the human and murine *c-ets-2* genes (data not shown). These results therefore indicate that both *c-ets-1*- and *c-ets-2*-encoded proteins are hyper-phosphorylated in a Ca²⁺-dependent manner.

Polyclonal stimulation induces hyper-phosphorylation of chicken p54^{c-ets-1} and murine p63^{c-ets-1}

The activation of several membrane transduction systems in quiescent lymphocytes leads to rapid modifications of phosphatidyl inositol turn-over, pH and [Ca²⁺]_i (Rosoff *et al.*, 1987). These activation pathways can be mimicked by

polyclonal mitogenic lectins, such as Con A. Specifically, Con A treatment of mouse thymocytes results in the increase of the [Ca²⁺]_i from a steady-state level of 100 to ~300 nM within 1 min (Tsien *et al.*, 1982; Hesketh *et al.*, 1985).

The results of Figure 8, panel A show that a 5-min treatment of mouse thymocytes with a mitogenic dose of Con A leads to a considerable increase in the phosphorylation of the mouse *c-ets-1* protein, as shown by the increased level of the 73-kd component at the expense of the p63 form. A similar treatment of chicken thymocytes also results in the stimulation of the phosphorylation of p54^{c-ets-1}, although to a much lower extent than that observed after A23187 treatment. The stimulated phosphorylation is transient, since the effect of Con A on p54^{c-ets-1} phosphorylation is barely detectable when chicken thymocytes are incubated throughout the labelling period in the presence of the lectin (Figure 8, panel B).

Extracellular Ca²⁺ is required for *c-ets-1* protein phosphorylation

Experimental evidence indicates that the increase of [Ca²⁺]_i by Con A treatment of mouse thymocytes results both from a transient component generated by mobilization of intracellular Ca²⁺ stores and a persistent component which results from a net entry of extracellular Ca²⁺ across the plasma membrane (Zilberman *et al.*, 1987). The results of Figure 8, panel C show that lowering [Ca²⁺]_e to <0.1 μM with a short EGTA treatment prior to the addition of Con A to chicken thymocytes suppresses the Con A-induced phosphorylation of p54^{c-ets-1}. Furthermore, the presence of EGTA throughout the labelling period results in a complete

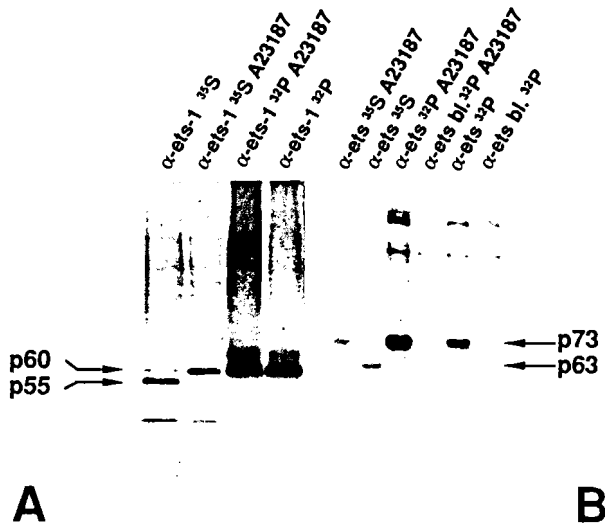


Fig. 6. Post-translational modifications of the human and murine *c-ets-1* proteins. **Panel A:** α -*ets-1* ^{35}S , L- ^{35}S methionine-labelled human B-cell line B85 immunoprecipitated with an anti-human *ets-1* serum; α -*ets-1* ^{35}S A23187, L- ^{35}S methionine-labelled human B-cell line B85 immunoprecipitated with an anti-human *ets-1* serum after a 5-min treatment with 2 μM A23187; α -*ets-1* ^{32}P A23187, ^{32}P -orthophosphate-labelled human B-cell line B85 immunoprecipitated with an anti-human *ets-1* serum, after a 5-min treatment with 2 μM A23187; α -*ets-1* ^{32}P , ^{32}P -orthophosphate-labelled human B-cell line B85 immunoprecipitated with an anti-human *ets-1* serum.

Panel B: α -*ets* ^{35}S A23187, L- ^{35}S methionine-labelled mouse thymocytes immunoprecipitated with the anti-*ets* serum, after a 5-min treatment with 2 μM A23187; α -*ets* ^{35}S , L- ^{35}S methionine-labelled mouse thymocytes immunoprecipitated with the anti-*ets* serum; α -*ets* ^{32}P A23187, ^{32}P -orthophosphate-labelled mouse thymocytes immunoprecipitated with the anti-*ets* serum after a 5-min treatment with 2 μM A23187; α -*ets* bl. ^{32}P A23187, ^{32}P -orthophosphate-labelled mouse thymocytes immunoprecipitated with the anti-*ets* serum blocked with an excess of its bacterial immunogen, after a 5-min treatment with 2 μM A23187; α -*ets* ^{32}P , ^{32}P -orthophosphate-labelled mouse thymocytes immunoprecipitated with the anti-*ets* serum; α -*ets* bl. ^{32}P , ^{32}P -orthophosphate-labelled mouse thymocytes immunoprecipitated with the anti-*ets* serum blocked with an excess of its bacterial immunogen.

inhibition of $p54^{c-ets-1}$ phosphorylation. These results together with those of Figure 4 indicate that the Ca^{2+} -dependent phosphorylations of $p54^{c-ets-1}$ in both untreated thymocytes and after mitogenic lectin stimulation are strictly dependent upon extracellular Ca^{2+} sources. Further evidence for the independence of these phosphorylation events from the mobilization of intracellular Ca^{2+} stores comes from the observation that treatment of chicken thymocytes with G protein function activator such as the GTP analog AlF_4^- (Cockcroft and Taylor, 1987) does not affect the steady-state level of $p54^{c-ets-1}$ phosphorylation (Figure 8, panel C).

Discussion

Two lines of evidence indicate that the slow-migrating chicken *c-ets-1* proteins observed in SDS-polyacrylamide gels result mainly, if not solely, from phosphorylations of $p54^{c-ets-1}$. First, these species incorporate ^{32}P -orthophosphate in the form of phosphoserine and phosphothreonine after metabolic labelling with ^{32}P -orthophosphate. Second, acid phosphatase treatment of these species results in their

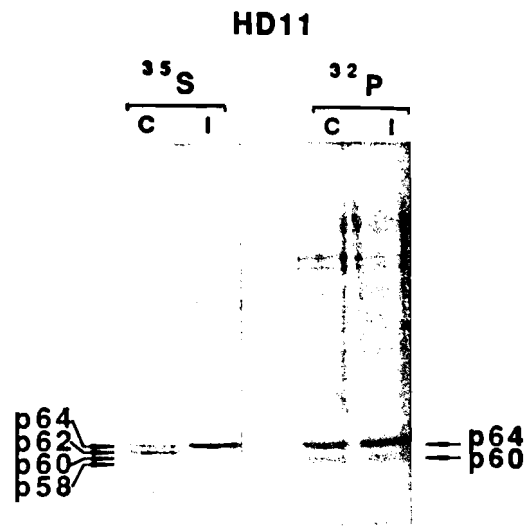


Fig. 7. Ca^{2+} -dependent phosphorylation of chicken *c-ets-2* proteins. Cells from the chicken macrophage cell-line HD11 were labelled for 1 h either with L- ^{35}S methionine or ^{32}P -orthophosphate and immunoprecipitations were performed with the anti-*ets* serum. Cell treatments were as follows: I, treatment with 2 μM A23187 for 5 min at the end of the labelling period; C, no treatment.

exclusive conversion into $p54^{c-ets-1}$. We also identify the human and mouse *c-ets-1* proteins as multiple species in SDS-polyacrylamide gels. This heterogeneity is likewise attributed to serine phosphorylation of Hu- $p55^{c-ets-1}$ and Mo- $p63^{c-ets-1}$. The steady-state level of phosphorylation of $p54^{c-ets-1}$ protein as well as mammalian *c-ets-1* proteins in various cell types indicates that only a small proportion of the molecules are modified.

Several lines of evidence indicate that *c-ets-1* expression correlates with the proliferation status of thymocytes and mature T lymphocytes. First, expression of Mo- $p63^{c-ets-1}$ in thymocytes does not correlate with their maturation state as defined on the basis of the expression of surface antigen Ly2 and L3T4 (unpublished observation in collaboration with R. Mc Donald, ISREC, Switzerland). Second, Mo- $p63^{c-ets-1}$ expression is higher in a blast-enriched thymocyte population than in the total thymocyte population. Third, mitogenic stimulation of mature T lymphocytes is accompanied by an increase in both the *c-ets-1* RNA and *c-ets-1* protein levels (unpublished data). Proliferation of mature T lymphoid cells is dependent upon the activation of the antigen and IL2 receptors. These activation pathways can be replaced, in tissue culture, by the combination of TPA and a Ca^{2+} ionophore (Truneh *et al.*, 1985; McDonald and Nabholz, 1986). The nature of the molecular events induced by these agents in peripheral T lymphocytes and thymocytes has not yet been characterized in detail but clearly involves the rapid phosphorylation of proteins by protein kinase C and Ca^{2+} -dependent protein kinases (Chaplin *et al.*, 1980; Casnellie and Lamberts, 1986). Increase in Ca^{2+} levels occurs both after the activation of the antigen receptor (Imboden *et al.*, 1985; Finkel *et al.*, 1987) and the IL2 receptor (Rossio *et al.*, 1986). In mouse thymocytes, the polyclonal mitogen Con A is known to quickly increase the $[\text{Ca}^{2+}]_i$, though less efficiently than A23187 (Tsien *et al.*, 1982). In

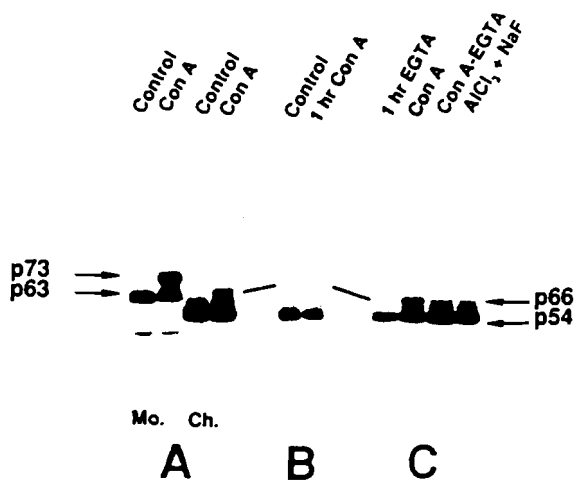


Fig. 8. Analysis of the chicken $p54^{c-ets-1}$ and murine $p63^{c-ets-1}$ protein phosphorylations after polyclonal mitogenic stimulation with Con A. Chicken (Ch.) or murine (Mo.) thymocytes were labelled with L-[35 S]methionine for 1 h and treated as follows. **Panel A:** control, no treatment; A23187, treatment with A23187 at $2 \mu\text{M}$ for 5 min; Con A, 5-minute treatment with $10 \mu\text{g/ml}$ of Con A. **Panel B:** 1 h Con A, chicken thymocytes treated with Con A at $10 \mu\text{g/ml}$ throughout the labelling period. **Panel C:** 1 h EGTA, chicken thymocytes treated with 5 mM EGTA throughout the labelling period; Con A-EGTA, treatment for 3 min with 5 mM EGTA followed by a 5-min treatment with $10 \mu\text{g/ml}$ of Con A; $\text{AlCl}_3 + \text{NaF}$, treatment for 30 min with AlCl_3 $20 \mu\text{M}$ + NaF 10mM during the second half of the labelling period. For clarity of the presentation, the $p54^{c-ets-1}$ proteins have been aligned, but because of different migration conditions, the phosphorylated forms have different mobilities. This figure is a composite of four different experiments (A–D).

this process, external Ca^{2+} is absolutely required for maximum $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase, and different Ca^{2+} influx mechanisms are implied (Rosoff *et al.*, 1987). We demonstrated that the increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ generated in thymocytes by mitogenic doses of Con A is sufficient to induce the phosphorylation of $c-ets-1$ proteins. The lectin induced phosphorylation is not as complete as the response obtained after A23187 treatment. It must be kept in mind, however, that thymocytes are a heterogeneous population, and that only some of the cells are responsive to lectin stimulation (Whitesell *et al.*, 1977), in contrast to the response to A23187, which is without any cell specificity.

These phosphorylations are strictly dependent on extracellular Ca^{2+} sources as shown by the inhibitory effect of both EGTA and Co^{2+} . In order to determine if intracellular stores could be implied in this process, we used $[\text{AlF}_4]^-$ as a phosphatidylinositol-phosphodiesterase (PPI-pde) activator (Cockcroft and Taylor, 1987). PPI-pde is responsible for the generation of two intracellular second messengers, diacylglycerol (DAG) and inositol triphosphate (InsP_3), the latter acting as an intracellular second messenger for the liberation of Ca^{2+} from internal stores (Dawson *et al.*, 1985). We did not notice any modifications on the migration pattern of $p54^{c-ets-1}$ protein by treatment known to increase the InsP_3 concentration. In addition, no effect has been observed with the use of TPA, a DAG analog known to activate protein kinase C. Activation of T lymphocytes appears therefore to lead to both an increase in $c-ets-1$ gene expression and an increased Ca^{2+} -dependent phosphorylation of its product. Since EGTA has an inhibitory

69

effect on thymocyte activation/proliferation induced by either Con A or a combination of TPA and a Ca^{2+} ionophore (Tsien *et al.*, 1982; Truneh *et al.*, 1985), our results suggest that the $c-ets-1$ gene products may play a role in the Ca^{2+} -mediated early events linked to T-cell activation.

We observed that the $c-ets-2$ -encoded proteins are also phosphorylated in a Ca^{2+} -dependent manner. The fact that the products encoded by distinct members of the ets -gene family are both modified by Ca^{2+} -dependent phosphorylation events suggests an important role for these modifications in the functions of these products. The phosphorylation of the $c-ets-1$ and $c-ets-2$ proteins of various animal species are accompanied by dramatic changes in their electrophoretic mobility, suggesting that these modifications induce important conformational changes of these proteins. These changes could play a role in the modulation of the as yet undefined functions of the products encoded by $c-ets-1$ and $c-ets-2$ and possibly other members of the ets -gene family. Further experiments are required to analyse whether the phosphorylations of $c-ets-1$ - and $c-ets-2$ -encoded products occur in the conserved domains of these molecules.

Materials and methods

Thymocytes preparation and cell lines

Animals were anaesthetized with ether and killed with CO_2 . Thymus was rapidly removed, and dissociated by squeezing on nylon mesh in phosphate or methionine-free Eagle's medium (depending on the type of labelling performed) supplemented with 5% dialysed calf serum. The calcium concentration of these media is 1.8 mM. The human B lymphoid cell line B85 was generously provided by Dr H. Blomhoff, the Norwegian Radium Hospital, Oslo.

Cell labelling and pharmacological treatments

L-[35 S]methionine cell labelling, immunoprecipitation analyses and peptide mapping have been described previously (Ghysdael *et al.*, 1986b). [32 P]orthophosphate labelling was performed for 1 h in a phosphate-free medium at an isotopic concentration of 3 mCi [32 P]orthophosphate/ml culture medium.

All the chemicals were purchased from SIGMA. A23187 ($2 \mu\text{M}$), Con A ($10 \mu\text{g/ml}$), PHA (0.5%), TPA (0.16 to $1 \mu\text{M}$), forskolin ($10 \mu\text{M}$) and IBMX ($125 \mu\text{M}$) were added for 1–10 min as indicated in the text after a 1-h labelling period. AlCl_3 and NaF were added to final concentrations of $20 \mu\text{M}$ and 10mM , respectively during the last 30 min of the labelling period. EGTA and cobalt salts were used at 5 and 2 mM respectively, 5 min before the addition of any stimulatory agent, or before the addition of isotope as indicated.

Phosphatase treatment

After the last wash in TNE (Tris-HCl 10mM pH 7.4, NaCl 150mM , EDTA 1mM) of the protein A-Sepharose immune complex, the pellet was directly treated with $3 \mu\text{l}$ of acid phosphatase from potato (Sigma), corresponding to a final concentration of 1 unit/ml. Incubation was performed at 37°C for 45 min. After this treatment, the pellet was directly boiled in the SDS-PAGE loading buffer.

Pulse-chase experiments

Chicken thymocytes were labelled with L-[35 S]methionine for 1 h, and half of them were stimulated with $2 \mu\text{M}$ A23187 for 5 min. Stimulated and control thymocytes were then rinsed once. An aliquot was lysed immediately (pulse labelling) and the remaining cells were incubating with a 1000 times excess of cold methionine for the indicated times (chase), before lysis. Immunoprecipitation analyses were performed on the same amount of acid-insoluble radioactive counts of each lysate.

Anti-ets-1-serum

The Hu- $c-ets-1$ -specific peptide Y-V-R-D-R-A-D-L-N-K-D-K was synthesized by the solid phase method according to Merrifield *et al.* (1982). The C-terminal amino-acid was Boc-Lys (chloro-Z) coupled to chloromethylpolystyrene. N - α -Boc protection was used and trifunctional amino acids were protected as follows: Tyr (dichlorobenzyl), Arg (tosyl),

Asp (*O*-benzyl) and Lys (chloro-Z). The purified peptide was coupled to a tetanus toxoid suspension essentially as previously described (Boulukos *et al.*, 1988).

Zilberman, Y., Howe, L.R., Moore, J.P., Hesketh, T.R. and Metcalf, J.C. (1987) *EMBO J.*, **6**, 957–962.

Received on January 5, 1988; revised on January 25, 1988

Acknowledgements

This work was supported by funds from the Institut National de Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Institut Pasteur de Lille and Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC).

References

- Beug, H., Hayman, M.J. and Graf, T. (1982) *EMBO J.*, **1**, 1069–1073.
- Boulukos, K.E., Pognonec, P., Bègue, A., Galibert, F., Gesquière, J.C., Stéhelin, D. and Ghysdael, J. (1988) *EMBO J.*, **7**, 697–705.
- Casnellie, J.E. and Lamberts, R.J. (1986) *J. Biol. Chem.*, **261**, 4921–4925.
- Chaplin, D.D., Wedner, H.J. and Parker, C.W. (1980) *J. Immunol.*, **124**, 2390–2398.
- Cockcroft, S. and Taylor, J.A. (1987) *Biochem. J.*, **241**, 409–414.
- Cooper, J.A., Gould, K.L., Cartwright, C.A. and Hunter, T. (1986) *Science*, **231**, 1431–1434.
- Dawson, A.P. (1985) *FEBS Lett.*, **185**, 147–150.
- Doolittle, R.F., Hunkapiller, M.W., Hood, L.E., Devare, S.G., Robbins, E.C., Aaronson, S.A. and Antoniades, H.N. (1983) *Science*, **221**, 275–277.
- Downward, J., Yarden, Y., Mayes, E., Scraze, G., Totty, N., Stockwell, P., Ullrich, A., Schlessinger, J. and Waterfield, M.D. (1984) *Nature*, **307**, 521–525.
- Finkel, T.H., McDuffie, M., Kappler, J.W., Marrack, P. and Cambier, J.C. (1987) *Nature*, **330**, 179–181.
- Ghysdael, J., Gegonne, A., Pognonec, P., Dernis, D., Leprince, D. and Stéhelin, D. (1986a) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 1714–1718.
- Ghysdael, J., Gegonne, A., Pognonec, P., Boulukos, K.E., Leprince, D., Lagrou, C. and Stéhelin, D. (1986b) *EMBO J.*, **5**, 2251–2256.
- Graf, T., Oker-Blom, N., Todorov, T.G. and Beug, H. (1979) *Virology*, **99**, 431–436.
- Greenberg, M.E. and Ziff, E.B. (1984) *Nature*, **311**, 433–438.
- Hesketh, T.R., Moore, J.P., Morris, J.D.H., Taylor, M.V., Rogers, J., Smith, G.A. and Metcalf, J.C. (1985) *Nature*, **313**, 481–484.
- Hunter, T. (1987) *Cell*, **49**, 1–4.
- Imboden, J.B., Weiss, A. and Stobo, J.D. (1985) *J. Immunol.*, **134**, 663–665.
- Leprince, D., Gegonne, A., Coll, J., de Taisne, C., Schneeberger, A., Lagrou, C. and Stéhelin, D. (1983) *Nature*, **306**, 395–397.
- Knight, E., Jr., Anton, E.D., Fahey, D., Friedland, B.K. and Jonak, G.J. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 1151–1154.
- McDonald, H.R. and Nabholz, M. (1986) *Annu. Rev. Cell Biol.*, **2**, 231–253.
- Merrifield, R.B., Visioli, L.D. and Boman, M.G. (1982) *Biochemistry*, **21**, 5020–5031.
- Moscovici, C., Samarut, J., Gazzolo, L. and Moscovici, M.G. (1981) *Virology*, **113**, 765–768.
- Nunn, M.F., Seeberg, P.H., Moscovici, C. and Duesberg, P.H. (1983) *Nature*, **306**, 391–395.
- Piechaczyk, M., Yang, J.Q., Blanchard, J.M., Jeanteur, P. and Marcu, K.B. (1985) *Cell*, **42**, 589–597.
- Radke, K., Beug, H., Kornfeld, S. and Graf, T. (1982) *Cell*, **31**, 643–653.
- Rao, V.N., Papas, T.S. and Reddy, E.S.P. (1987) *Science*, **237**, 635–639.
- Reddy, E.S.P., Rao, V.N. and Papas, T.S. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 6131–6135.
- Rijsewisk, F., Schuermann, M., Wagenaar, E., Parren, P., Weigel, D. and Nüsse, R. (1987) *Cell*, **50**, 649–657.
- Rosoff, P.M., Burakoff, S.J. and Greenstein, J.L. (1987) *Cell*, **49**, 845–853.
- Rossio, J.L., Ruscetti, F.W. and Farrar, W.L. (1986) *Lymphokine Res.*, **5**, 163.
- Sap, J., Munoz, A., Damm, K., Golberg, Y., Ghysdael, J., Leutz, A., Beug, H. and Vennström, B. (1986) *Nature*, **324**, 635–640.
- Sherr, C.J., Rettenmier, C.W., Sacca, R., Roussel, M.F., Lookand, A.T. and Stanley, E.R. (1985) *Cell*, **41**, 665–676.
- Truneh, A., Albert, F., Golstein, P. and Schmitt-Verhulst, A.-M. (1985) *Nature*, **313**, 318–320.
- Tsien, R.Y., Poozan, T. and Rink, T.J. (1982) *Nature*, **295**, 68–70.
- Watson, D.K., McWilliams-Smith, M.J., Nunn, M.F., Duesberg, P.H., O'Brien, S.J. and Papas, T.S. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 7294–7298.
- Whitesell, R.R., Hoffman, L.H. and Regen, D.M. (1977) *J. Biol. Chem.*, **252**, 3533–3537.

ARTICLE 3

soumis à:
EMBO Journal.

TITLE PAGE

**The c-ets-1 protein interacts with DNA in a
phosphorylation dependent manner**

P.Pognonec, K.E.Boulukos and J.Ghysdael.

INSERM U 186/CNRS UA 041160, Institut Pasteur, 1 rue Calmette, 59019
Lille, France.

Running Title: c-ets-1 protein DNA binding activity.

Key words: c-ets-1/DNA binding/phosphorylation/proto-oncogene.

ABSTRACT

The c-ets-1 proto-oncogene is expressed at high levels in proliferating lymphoid cells. We show here that the chicken and murine c-ets-1 proteins are predominantly localized in the cell nucleus. Over 90% of the c-ets-1 protein can be released from isolated thymocyte nuclei by treatment with low salt buffer. Release from nuclei is also observed after treatment with micrococcal nuclease, but not with RNaseA, in conditions where digestion of only a minor fraction of chromatin occurs. c-ets-1 proteins exhibit DNA binding activity, suggesting that the association to chromatin is mediated at least in part by association to DNA. Mitogenic stimulation of thymocytes is accompanied by the rapid calcium-dependent phosphorylation of c-ets-1 proteins. We show here that these phosphorylation events abolish the ability of c-ets-1 proteins to bind to DNA in vitro and reduce their affinity for chromatin, lending further support to the importance of these modifications in the regulation of c-ets-1 proteins function.

INTRODUCTION.

E26 is an acutely oncogenic avian retrovirus that causes a mixed myeloid/erythroid leukemia in chicken and transforms myeloblasts and erythroblasts in tissue culture (Graf et al., 1979; Moscovici et al., 1981; Radke et al., 1982). The oncogenicity of E26 results from the expression of two cell-derived oncogenes, v-myb and v-ets (Roussel et al., 1979; Leprince et al., 1984; Nunn et al., 1984) as part of a 135 kD gag fusion protein (p135 gag-myb-ets), localized in the nucleus of transformed cells (Klempnauer et al., 1984). Several cellular genes have been described that display similarity to the v-ets oncogene of avian leukemia virus E26. These include c-ets-1, the cellular progenitor of v-ets (Gegonne et al., 1987; Chen, 1988; Duterque-Coquillaud et al., 1988; Leprince et al., 1988), c-ets-2 (Watson et al., 1986; Boulukos et al., 1988) and the more distantly related c-erg gene (Reddy et al., 1987). The major translation products of the chicken and human c-ets-1 genes are proteins of 54 kD (ch-p54 c-ets-1) and 55 kD (hu-p55 c-ets-1), respectively (Chen, 1985; Ghysdael et al., 1986a; Pognonec et al., 1988). Strong amino-acid sequence similarity between the c-ets-1 and c-ets-2 proteins is limited to two regions of 96 and 175 residues located in their amino- and carboxy-terminal domains, respectively (Boulukos et al., 1988). Both c-ets-1 and c-ets-2 belong to the class of genes whose expression is induced shortly after activation of signal transduction systems linked to specific cell surface receptors. The nature of the ligand-receptor interactions resulting in induced expression of c-ets-1 and c-ets-2 appears, however, to be distinct for each gene. Prominent levels of c-ets-1 protein are found in proliferating B and T lymphoid cells, in contrast to a low level of expression in quiescent lymphoid cells (Chen, 1985; Ghysdael et al., 1986a). Antigenic and mitogenic stimulation of these cells leads, within minutes, to the calcium-dependent phosphorylation of c-ets-1 proteins (Pognonec et al., 1988) followed, a few hours later, by an increase in c-ets-1 RNA level

(Kaufmann et al., 1987; our unpublished data). These results suggest a role for the c-ets-1 gene products in the early events which are involved in the induction of proliferation and functional activation of lymphoid cells and possibly other cell types. Conversely, activation of mature cells of the myelomonocytic lineage is accompanied by the rapid and transient expression of c-ets-2 while leaving that of c-ets-1 unaffected (Ghysdael et al., 1986b; Boulukos et al., in preparation).

The cellular target(s) of the products encoded by the members of the c-ets gene family are not yet known. We and others previously demonstrated the c-ets-2 gene products to be nuclear proteins (Boulukos et al., 1988; Fujiwara et al., 1988). We report here that chicken and murine c-ets-1 gene products are chromatin-associated nuclear proteins that exhibit DNA binding activity in vitro. Finally, we show that the Ca⁺⁺-dependent phosphorylation of c-ets-1 proteins loosens both their affinity for nuclear structures and for DNA in vitro.

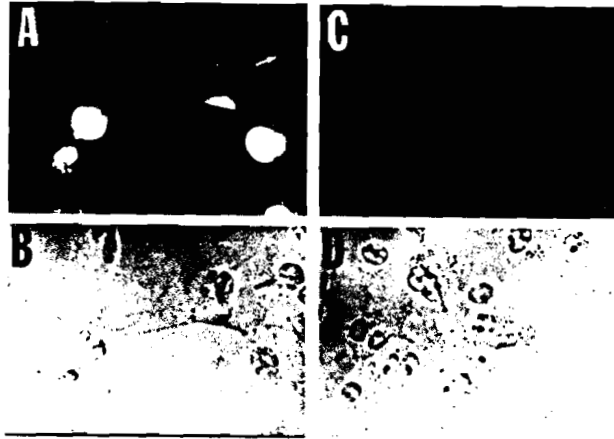


Figure 1

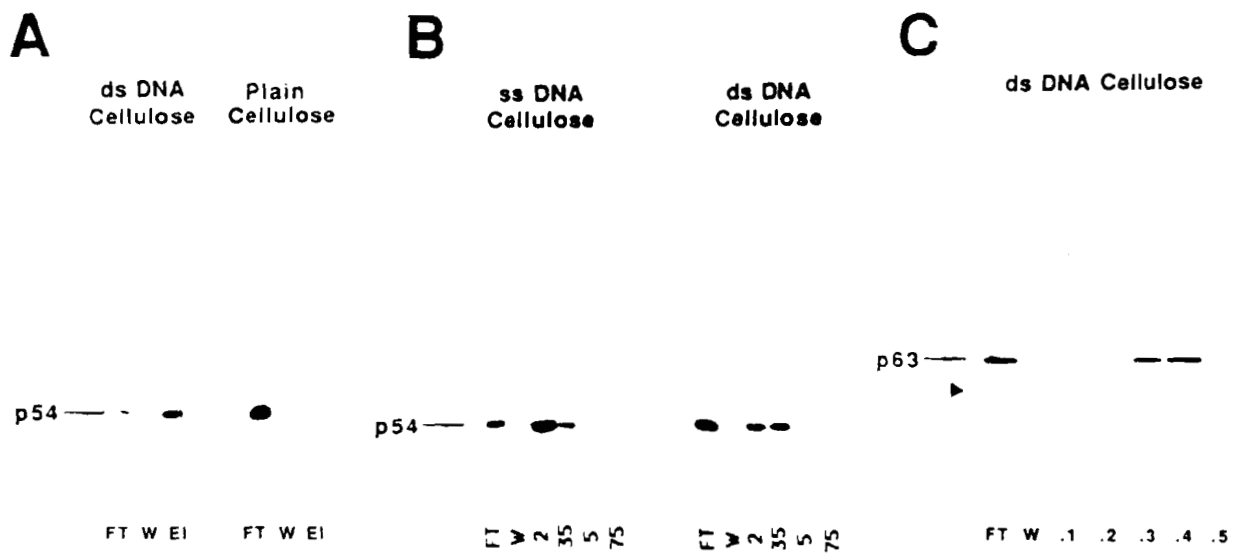


Figure 2

RESULTS.

c-ets-1 proteins are mainly localized in the nucleus.

Subcellular fractionation studies involving lysis of lymphoblastoid cell-lines in low salt buffers followed by differential centrifugation have shown both the avian and human *c-ets-1* proteins to be predominantly present in the cytosolic fraction (Ghysdael et al., 1986a; Fujiwara et al., 1988). Since subcellular fractionation procedures can produce artificial redistribution of proteins and in view of the fact that we recently demonstrated the *c-ets-2* gene products to be nuclear proteins (Boulukos et al., 1988), we decided to reinvestigate the intracellular localization of ch-p54 *c-ets-1* by immunofluorescence analysis using specific *ets* antisera. Monkey COS1 cells were transfected with a cDNA encoding ch-p54 *c-ets-1* inserted into pKCR3, an SV40-based expression vector. In this system, high expression of plasmid-derived proteins is limited to a small percentage of transfected cells therefore allowing a clear visualization of the subcellular localization of these proteins. As shown in figure 1, panel A, the use of an anti *ets* serum raised against a bacterially expressed protein resulted in an intense nuclear fluorescence in ch-p54 *c-ets-1* expressing cells. We reproducibly observed that about 5% of ch-p54 *c-ets-1* expressing cells also display an intense fluorescence staining in the cytoplasm. Whether this cytoplasmic fluorescence is related to a particular physiological status of transfected cells (e.g. their position in the cell cycle) or results from a cytotoxic effect related to the transfection procedure has not been investigated here.

We conclude from this experiment that chicken ch-p54 *c-ets-1*, like *c-ets-2* gene products, is mainly localized in the cell nucleus.

c-ets-1 proteins bind to DNA in vitro.

The localization of ch-p54 *c-ets-1* in the nucleus prompted us to investigate its ability to bind to DNA in vitro. Thymocytes from 10-day-old chicken which we previously showed to express high levels of *c-ets-1*, were metabolically labelled with L [³⁵S] methionine and lysed in TDT buffer, as described in Materials and Methods. The lysate adjusted to 50 mM NaCl at a pH of 7.4 was then applied to a native calf-thymus DNA cellulose column equilibrated in TDT buffer. Since ch-p54 *c-ets-1* has a pI of 5.25 (our unpublished observations) the protein is expected to be negatively charged in this buffer, thus reducing the possibility of non-specific binding to DNA. After 45 min of incubation at 4°C, the flow-through fraction was collected and, after extensive washing with TDT buffer, bound proteins were eluted with TDT buffer adjusted to 1 M NaCl. Equivalent amounts of flow-through, wash and elution fractions were then analysed for their *c-ets-1* proteins content by immunoprecipitation and SDS/PAGE. As shown in Fig2 panel A, approximately 60% of p54 *c-ets-1* was retained on double-stranded DNA cellulose. Since no binding of ch-p54 *c-ets-1* was observed using plain cellulose (Figure 2, panelA), we conclude that the retention of ch-p54 *c-ets-1* by DNA cellulose is specific to DNA.

In order to analyse the binding of ch-p54 *c-ets-1* to single-stranded DNA, the same experiment was performed using a single-stranded DNA cellulose column. As a control, the same amount of lysate was loaded in parallel on a double-stranded DNA cellulose column. To compare the respective retention capacity of each type of DNA, proteins bound to each column were eluted with a discontinuous salt gradient. The results of Figure 2 panel B indicate that ch-p54 *c-ets-1* is also retained by single-stranded DNA. However, binding to single-stranded DNA appears to

be of lower affinity than to double stranded DNA since ch-p54 c-ets-1 is eluted from the latter at an approximately 100 mM higher salt concentration than that required for single-stranded DNA (about 300mM NaCl versus 200mM). In order to verify that the ability of c-ets-1 proteins to bind DNA in vitro was not restricted to ch-p54 c-ets-1, we performed the same experiment with the murine 63 kD c-ets-1 protein (mu-p63c-ets-1 Pognonec et al.,1988) obtained from thymocytes. The results of Figure 2 panel C demonstrate that, as expected, mu-p63c-ets-1 is also retained on double stranded-DNA cellulose columns, and is eluted from these columns at NaCl concentration of about 300-400 mM. The 55 kD protein which is specifically immunoprecipitated by the ets antiserum from murine thymocyte lysates (arrowhead in Figure 2 panel C) is structurally related to mu-p63c-ets-1 as evidenced by 2D tryptic analyses (unpublished observation). The origin of this protein is under investigation.

Phosphorylation of c-ets-1 proteins results in loss of affinity for DNA.

We previously reported that ch-p54 c-ets-1 is extensively modified by Ca⁺⁺-dependent phosphorylation events to generate species that migrate as multiple forms of apparent molecular weight 56-66 kD in SDS polyacrylamide gels (Pognonec et al., 1988 and Figures 2 and 3). The results of Figure 2 show that whereas the phosphorylated forms of ch-p54 c-ets-1 are detected in the flow-through fraction, these species appear to be absent from the high salt elution fraction, suggesting that the ability of c-ets-1 proteins to interact with DNA could be modulated by their phosphorylation status. To eliminate the possibility that this observation merely reflects the action of non-specific phosphatases during the chromatographic procedure, we took advantage of the fact that rapid and essentially complete phosphorylation of c-ets-1 proteins can be obtained

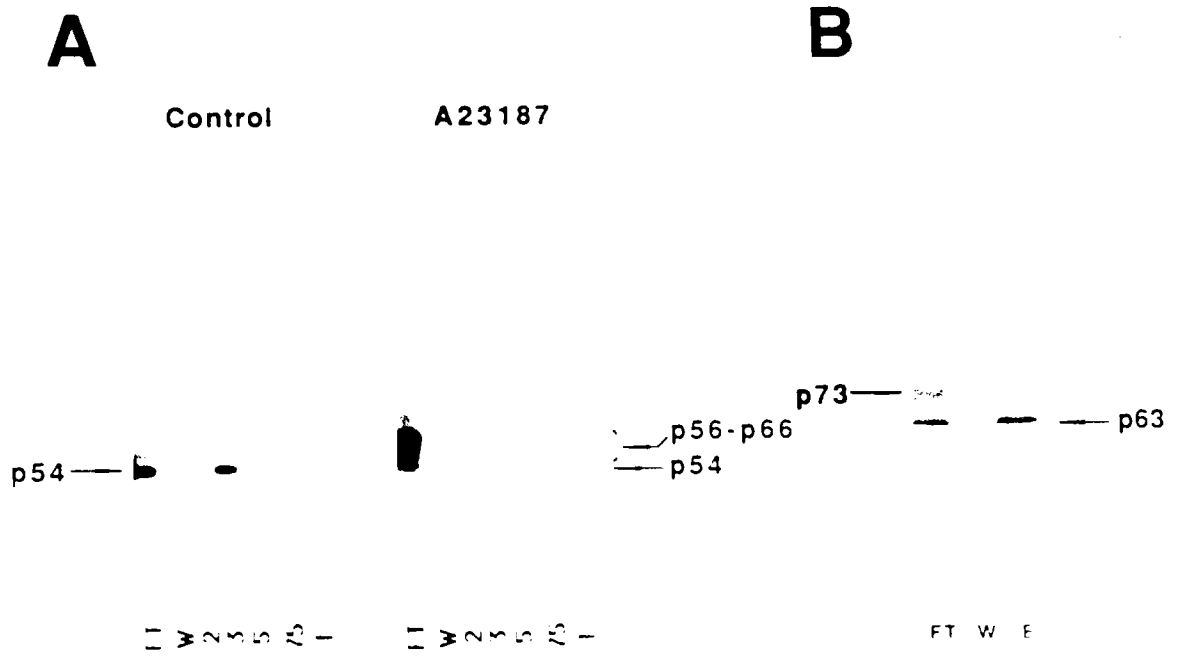


Figure 3

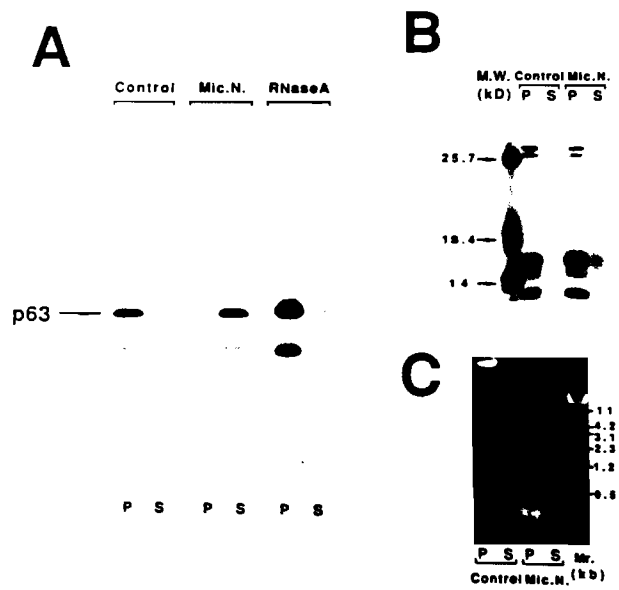


Figure 4

in cells after treatment with a calcium ionophore (Pognonec et al., 1988). In the experiment of figure 3 panel A, we therefore compared the chromatographic behaviour on DNA cellulose column of c-ets-1 proteins obtained from either untreated thymocytes or thymocytes treated for 5 min with 2 μ M of the calcium ionophore A23187. In accordance with the results of figure 2, we found most of ch-p54 c-ets-1 to bind to DNA cellulose and to elute at salt concentration of about 0.3 M NaCl. In contrast, the phosphorylated forms of the ch-c-ets-1 protein were recovered in the flow-through and wash fractions (figure 3 panel A). The only c-ets-1 protein species found in the eluate fraction of A23187-treated cell lysates is a small amount of unphosphorylated ch-p54 c-ets-1. The experiment of Figure 3, panel B demonstrates that the murine c-ets-1 protein also binds to DNA in vitro, but only in its unphosphorylated state. In this experiment, equivalent amounts of lysates from untreated and A23187-treated murine thymocytes were mixed, and the ratio of the unphosphorylated mu-p63c-ets-1 was compared to that of its phosphorylated 73 kD form (Pognonec et al., 1988) in both the flow-through and the 0.5 M NaCl elution fractions. It clearly appears that a substantial proportion of only the non-phosphorylated form of mu-c-ets-1 protein is observed in the high salt elution fraction, whereas all of the phosphorylated forms are recovered in the flow-through fraction (Figure 2, panel C).

These results unambiguously demonstrate that the Ca⁺⁺-mediated phosphorylation of c-ets-1 proteins abolishes their ability to bind to DNA in vitro.

c-ets-1 proteins are associated with DNA in cells.

To analyze whether the observed affinity of c-ets-1 proteins for DNA in vitro reflects their association with DNA in cells, mouse thymocyte

nuclei were incubated with micrococcal nuclease or left untreated, as a control. Proteins released by this treatment were separated from residual nuclei by centrifugation and the supernatant and pellet fractions were both analyzed for DNA, total proteins and c-ets-1 protein content. In the digestion conditions used in this experiment, only a fraction of total chromatin was released from nuclei by nuclease treatment as evidenced by the small amount of DNA and core histones proteins and the absence of H1 in the supernatant fraction (Figure 4, panel B and C). In contrast, whereas the association of mu-p63c-ets-1 with nuclei was not affected in the untreated control sample, over 80 % of it was released from nuclei incubated with 100 units of micrococcal nuclease (Figure 4, panel A compare Control and Mic.N. lanes). No mu-p63c-ets-1 was released into the supernatant fraction after treatment of nuclei with 20µg of RNaseA (Figure 2, panelA).

The association of mu-p63c-ets-1 with thymocyte nuclei was also found to be highly sensitive to salt treatment. In the experiment of Figure 5, mouse thymocyte nuclei were incubated either in low salt buffer or in low salt buffer containing increasing amounts of NaCl. After centrifugation, the c-ets-1 protein content of the supernatant and residual nuclei was analyzed by immunoprecipitation. Whereas no protein was released from nuclei in the absence of added salt, more than 90 % of it was extracted by NaCl concentration over 200 mM.

We conclude from these experiments that the association of mu-p63 c-ets-1 with thymocytes nuclei is dependent upon the integrity of chromatin DNA and is unlikely to involve nuclear matrix structures.

Phosphorylated c-ets-1 proteins display a reduced affinity for nuclei.

Since the calcium-dependent phosphorylation of both ch-p54 c-ets-1 and mu-p63 c-ets-1 results in the loss of affinity for DNA in vitro, we next



Figure 5

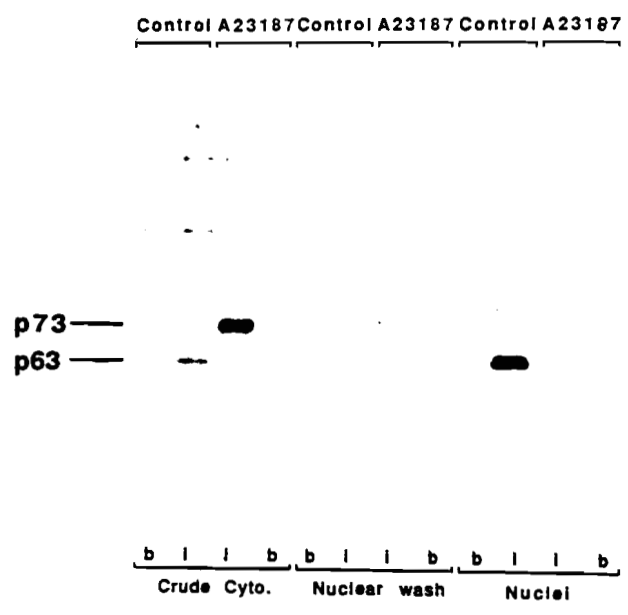


Figure 6

analyzed whether these modifications would also affect the affinity of c-ets-1 proteins for nuclear structures. The specific and reproducible loss, during nuclei preparation (Fig 4 and 5), of the few percent of these forms normally present in thymocytes (Pognonec et al., 1988) led us to believe that this would be the case. To investigate this point further, we compared the association of c-ets-1 proteins with nuclear structures either in untreated mouse thymocytes or thymocytes treated with the calcium ionophore A23187, a treatment that results in the phosphorylation of most of the c-ets-1 protein population. The results of Figure 6 clearly shows that in subcellular fractionation studies, most of the non-phosphorylated c-ets-1 protein is predominantly found in the nuclear fraction whereas most, if not all, of the phosphorylated forms are found in the cytosolic fraction. This differential behaviour is not due to some irreversible effect of ionophore treatment on the structure of nuclei since similar results were obtained using thymocyte population treated with a pulse of A23187 followed by treatment with EGTA, a condition which results in a close to equimolar content of phosphorylated and unphosphorylated c-ets-1 proteins in cells (our unpublished results).

DISCUSSION.

The results reported here indicate that, in line with our previous results for the c-ets-2 gene products, the c-ets-1 proteins are predominantly nuclear. This conclusion is based on immunofluorescence studies performed in cells transfected with a c-ets-1 cDNA expression vector construct and subcellular fractionation experiments on mouse thymocytes, where expression of c-ets-1 is particularly prominent. Previous subcellular fractionation analyses have suggested the c-ets-1 proteins to be predominantly cytosolic (Ghysdael et al., 1986b; Fujiwara et al., 1988). The conditions used in these experiments were those standardly employed to analyze the p135 gag-myb-ets transforming protein in nuclei from E26 transformed cells. It involved lysis of the cells in hypotonic buffers followed by readjustment of isotonicity before separation of the subcellular fractions by differential centrifugation. These conditions were obviously not suitable for the c-ets-1 proteins which are easily extracted from nuclei in the presence of low salt concentrations (Figure 5). These results, together with the fact that both the AMV v-myb and the c-myb genes products (Klempnauer et al., 1986) appear to be more tightly associated to nuclear structures than the c-ets-1 proteins, also suggest that most of the association of p135 gag-myb-ets with nuclear structures in E26-transformed cells is mediated by the v-myb-encoded domain of the molecule. Since both c-ets-1 and c-ets-2 proteins are nuclear, it is likely that the determinants which lead to their accumulation in the nucleus reside in their domains of strong similarity. The most conserved region between c-ets-1 and c-ets-2 proteins is found in their carboxyterminal domain (Boulukos et al., 1988). Within this domain lies a highly conserved region of basic aminoacid residues (³⁷⁶ GKRKNKPK in ch-p54 c-ets-1 and ⁴¹⁴ GRRKNKPK in ch-p58-64 c-ets-2) bracketed by aminoacids (gly/pro) that promote bending of the polypeptide backbone. These features are very similar to those of the

minimal aminoacid sequence which confers nuclear localisation to SV40 large T antigen (Kalderon et al., 1984a; Kalderon et al., 1984b). Computer-assisted conformational analyses predict this region of c-ets-1 and c-ets-2 proteins to be part of a loop extending out of the surface of the proteins. This supports the idea that transport of c-ets-1 and c-ets-2 proteins to the nucleus could involve an active carrier-mediated process similar to that proposed for SV40 large T antigen and some other nuclear proteins (Goldfarb et al., 1986).

The c-ets-1 protein is able to bind to DNA in vitro. This property is likely to reflect a real association with DNA in cells since the c-ets-1 protein is released from thymocyte nuclei after treatment with micrococcal nuclease but not after RNaseA treatment. Furthermore, in thymocyte nuclei, the c-ets-1 protein appears to be associated with a fraction of the chromatin especially sensitive to micrococcal nuclease digestion. This suggest that the c-ets-1 protein might be preferentially associated with chromatin regions engaged in either DNA replication or gene transcription.

Our results do not answer the question as to whether the interaction of c-ets-1 protein with DNA is an intrinsic property of the molecule or rather depends upon the association with another factor. Additional experiments using highly purified preparations of c-ets-1 proteins are required to solve this issue.

The avian and mammalian c-ets-1 proteins are post-translationally modified by extensive calcium-dependent phosphorylation events within one minute after treatment of thymocytes with mitogens, suggesting a role for these proteins in the Ca^{2+} -mediated early events of T cell activation (Pognonec et al., 1988). We found these modifications to drastically inhibit the ability of the chicken and mouse c-ets-1 proteins both to bind to DNA in vitro and to remain associated with nuclear structures. This suggests that these phosphorylation events could be an important determinant in the modulation of the activity of the c-ets-1

protein at the chromatin level in response to the $[Ca^{2+}]_i$ increase resulting from the activation of specific membrane receptors by their ligand.

MATERIALS AND METHODS

Thymocyte preparation and cell culture:

6 to 10-day old chicken and 4 to 6-week old mouse thymuses were prepared as previously described (Pognonec et al., 1988). COS1 cells were grown at 37°C in Dulbecco MEM supplemented with 5% foetal calf serum in a 5% CO₂ water saturated atmosphere. The cells were labelled and treated when indicated with the calcium ionophore A23187, as described previously (Pognonec et al., 1988).

Immunofluorescence studies:

Immunofluorescence analyses were performed as described previously (Boulukos et al., 1988). Briefly, COS1 cells were fixed in 3.5% paraformaldehyde for 20 min at room temperature 48 h after transfection, quenched in 0.15 M ethanolamine and permeabilized with 0.2% Nonidet P40.

After 1 h of incubation with either a control non immune rabbit serum or a standart rabbit ets-antiserum to a bacterially expressed ets protein (Ghysdael et al., 1986a), cells were washed and incubated with FITC-conjugated swine anti-rabbit immunoglobulins. After further washing, immunofluorescence was examined using a Zeiss epifluorescence microscope.

DNA binding experiments:

L-[³⁵S] methionine labelled thymocytes (about 3X10⁸ cells) were resuspended in 2.25 ml of TDT buffer (10 mM Tris-HCl, pH7.4; 1mM dithiothreitol; 0.1% Triton X100; 1 mM EDTA; 10µg/ml Leupeptine; 100µg/ml PMSF; 1% Aprotinin). After 10 min of swelling on ice, this preparation was homogenized in a Dounce homogenizer by 10 strokes of a tightly fitted pestle. Nuclei were then pelleted at 1,000 g for 5 min. The supernatant was further clarified by centrifugation at 100,000 g at 4°C for 20 min. The nuclear pellet was resuspended in 250 µl of TDT buffer

adjusted to 0.5 M NaCl, incubated for 5 min in ice, and clarified by 10 min of centrifugation at 12,000 g. The nuclear extract was then pooled with the first supernatant, therefore adjusting the final salt concentration to 50 mM NaCl. An aliquot of this preparation was then loaded on double-stranded or single-stranded DNA cellulose columns preequilibrated in 50 mM NaCl-TDT buffer, and the mixture was gently rotated at 4°C for 45 min. The flow-through was then collected, the column extensively washed in 50 mM NaCl-TDT buffer, and finally eluted with the indicated salt-TDT buffers. Equivalent amounts of each fraction were adjusted to RIPA buffer conditions and immunoprecipitated as previously described (Ghysdael et al., 1986a). Immunoprecipitated proteins were resolved by electrophoresis on 10% SDS-polyacrylamide gels.

Nuclei preparation, salt extraction and nuclease treatment:

L-[³⁵S] methionine-labelled murine thymocytes (approximately 3×10^8 cells) were allowed to swell on ice in 2 ml of ice cold buffer A for 10 min (buffer A: Hepes 20 mM, pH 7.4; KCl 5mM; MgCl₂ 0.5 mM; dithithreitol 0.5 mM). This preparation was then homogenized in a Dounce homogenizer by 10 strokes of a tightly fitted pestle and nuclei pelleted by a 5 min centrifugation at 1,000 g. Nuclei were resuspended in 2 ml of buffer B (Hepes 50 mM, pH7.4; sucrose 10%), and either used immediately or stored frozen in liquid nitrogen.

For nuclease experiments, thawed nuclei were resuspended in 100µl of digestion buffer (Tris-HCl 5 mM, pH 7.4; NaCl 40 mM; CaCl₂ 1mM; MgCl₂ 1 mM) at 4°C, and 0 or 100 units of micrococcal nuclease or 20µg of boiled RNaseA were added for 1h. The reactions were terminated by adjusting the buffer concentration to 5 mM EDTA, and samples were incubated for an additional 15 min on ice. The volume was then completed to 300 µl using digestion buffer adjusted to 0.5 mM EDTA. Residual nuclei were recovered by a 10 sec centrifugation at 12,000 g, and lyzed in 600µl of RIPA buffer, whereas the supernatant was adjusted to RIPA buffer conditions using a

2X concentrated RIPA solution. Aliquots of both lysates were collected for total protein and DNA analyses, before clarification by a 10 min centrifugation at 12,000 g. These cleared supernatants were then analyzed by immunoprecipitation.

DNA was analyzed on 1% agarose gel in borate buffer after proteinase K/SDS and phenol extraction. Total proteins were resolved on a 15% SDS-polyacrylamide gel.

For salt extraction experiments, nuclei were suspended in 200 μ l of buffer A, adjusted to the indicated NaCl concentration. After a 5 min incubation on ice, residual nuclei were separated from the supernatant fraction by centrifugation for 10 sec at 12,000 g. Both the supernatants and the residual nuclei fractions were adjusted to RIPA conditions, clarified by centrifugation at 12,000 g for 10 min at 4°C, and analyzed by immunoprecipitation.

Fractionation experiments:

L-[³⁵S] methionine labelled murine thymocytes (approximately 3X10⁸ cells) were lysed in 2 ml of ice cold buffer A for 10 min. The cell suspension was centrifuged for 5 min at 1,000 g, and the supernatant collected as the crude cytosolic fraction. The nuclear pellet was resuspended in 2 ml of buffer A in a Dounce homogenizer by 10 strokes of a tightly fitted pestle. This preparation was centrifuged for 5 min at 1,000 g, and the supernatant collected as the wash fraction. Both crude cytosolic and wash fractions were adjusted to RIPA conditions, and nuclei lysed in the same volume of RIPA buffer. After clarification by centrifugation at 100,000 g for 20 min, equivalent amounts of each fraction were immunoprecipitated with the indicated sera.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are indebted to Drs. J. Rommelaere and D. Stehelin for critical reading of this manuscript. This work was supported by funds from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Institut Pasteur de Lille, and Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC).

REFERENCES

- Boulukos,K.E., Pognonec,P., Begue,A., Galibert,F., Gesquiere,J.C., Stehelin,D. and Ghysdael,J. (1988) *EMBO J.*, **7**, 697-705.
- Chen,J.H. (1985) *Mol. Cell. Biol.*, **5**, 2993-3000.
- Chen,J.H. (1988) *Oncogene Res.* **2**,, 371-384.
- Duterque-Coquillaud,M., Leprince,D., Flourens,A., Henry,C., Ghysdael,J., Debuire,B. and Stehelin,D. (1988) *Oncogene Res.*, **2**, 335-344.
- Fujiwara,S., Fisher,R.J., Seth,A., Bhat,N.K., Showalter,S.D., Zweig,M. and Papas,T.S. (1988) *Oncogene*, **2**, 99-103.
- Gegonne,A., Leprince,D., Duterque-Coquillaud,M., Vandebunder,B., Flourens,A., Ghysdael,J., Debuire,B. and Stehelin,D. (1987) *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 806-812.
- Ghysdael,J., Gegonne,A., Pognonec,P., Dernis,D., Leprince,D. and Stehelin,D. (1986a) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 1714-1718.
- Ghysdael,J., Gegonne,A., Pognonec,P., Boulukos,K.E., Leprince,D., Lagrou,C. and Stehelin,D. (1986b) *EMBO J.*, **5**, 2251-2256.
- Goldfarb,D.S., Garipey,J., Schoolnick,G and Kornberg,R.D. (1986) *Nature* **322**, 641-644.
- Graf,T., Oker-Blom,N., Todorov,T.G and Beug,H. (1979) *Virology* **99**, 431-436.
- Kalderon,D., Richardson,W.D., Markham,A.T. and Smith,A.E. (1984a) *Nature* **311**, 33-38.
- Kalderon,D., Roberts,B.L., Richardson,W.D. and Smith,A.E. (1984b) *Cell*, 499-509.
- Kaufman,Y., Silverman,T., Levi,B. and Ozato,K. (1987) *J. Exp. Med.* **166**, 810-815.
- Klempnauer,K.H. and Sippel,A.E. (1986) *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 62-69.
- Leprince,D., Gegonne,A., Coll,J., Schneeberger,A., Lagrou,C. and Stehelin,D. (1983) *Nature* **306**, 395-397.
- Moscovici,C.,Samarut,J.,Gazzolo,L and Moscovici,M.G. (1981) *Virology* **113**, 765-768.

Nunn,M.F., Seeberg,P.H., Moscovici,C. and Duesberg,P.H. (1983) *Nature* **306**, 391-395.

Pognonec,P., Boulukos,K.E., Gesquiere,J.C., Stehelin,D. and Ghysdael,J. (1988) *EMBO J.* **7**, 977-983.

Radke,K.,Beug,H.,Kornfeld,S. and Graf,T. (1982) *Cell* **31**, 643-653.

Rao,V.N.,Papas,T.S.,Reddy,E.S.P. (1987) *Science* **237**, 635-639.

Reddy,E.S.P., Rao,V.N. and Papas,T.S. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa*, **84**, 6131-6135.

Roussel,M., Saule,S., Lagrou,C., Rommens,C., Beug,H., Graf,T. and Stehelin,D. (1979) *Nature* **281**, 453-455.

Watson,D.K., Mc Williams-Smith,M.J., Nunn,M.F., Duesberg,P.H., O'brien,S.J. and Papas,T.S. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa*, **82**, 7294-7298.

FIGURE LEGENDS

Figure 1:

Subcellular localization of ch-c-ets-1 proteins. The pKCR3-ch-c-ets-1 expression vector was transfected into COS1 cells and after 48 hrs, cells were fixed and permeabilized as described in Materials and methods. Cells were incubated with either the standart ets antiserum (A and B) or a non immune control serum (C and D). A, C: fluorescence analysis. B, C: phase contrast analysis of the same field. Arrows in A and B point to a non-transfected cell, in which no fluorescence is detected.

Figure 2:

DNA binding of c-ets-1 proteins. L^[35S] methionine-labelled thymocytes were lysed in TDT buffer, and the cleared lysates were incubated in the presence of either plain cellulose or ds-DNA cellulose for 45 min. Flow-through, wash and high salt elution fractions were then analyzed for their c-ets-1 proteins content by immunoprecipitation with the standart ets antiserum. Panel A: chicken thymocyte lysates loaded on either double-stranded DNA cellulose or plain cellulose. p54 refers to the non-phosphorylated ch-c-ets-1 protein. FT: flow-through fraction; W: wash fraction; El: 1 M NaCl elution fraction. Panel B: comparison of the affinity of ch-c-ets-1 protein between single-stranded DNA cellulose and double-stranded DNA cellulose. FT: flow-through fraction, W: wash fraction, .2 to .75: elution fractions with NaCl concentrations of 0.2 M, 0.35 M, 0.5 M and 0.75 M, respectively. Panel C: murine thymocyte lysates loaded on double-stranded DNA cellulose. p63 refers to the non phosphorylated mu-c-ets-1 protein. FT: flow-through fraction; W: wash fraction; .1 to .5: elution fractions with NaCl concentrations of 0.1 M, 0.2 M, 0.3 M, 0.4 M and 0.5 M, respectively.

Figure 3:

Phosphorylated forms of c-ets-1 proteins are not retained on double-stranded DNA cellulose. L[³⁵S] methionine-labelled thymocytes were lysed in TDT buffer, and the cleared lysates were incubated with double-stranded DNA cellulose for 45 min. Flow-through, wash and high salt elution fractions were then analyzed for the presence of c-ets-1 proteins by immunoprecipitation using the standart ets antiserum. Panel A: lysates from either untreated or A23187-treated chicken thymocytes. p54 refers to the unphosphorylated form of the ch-c-ets-1 protein, and p56-66 to its phosphorylated versions. FT: flow-through fraction; W: wash, fraction; .2 to 1: elution fractions with NaCl concentrations of 0.2 M, 0.3 M, 0.5 M, 0.75 M and 1M, respectively. Panel B: equivalent amounts of untreated and A23187-treated murine thymocytes were loaded on the same double-stranded DNA cellulose column and analyzed as in panel A. p73 refers to the major phosphorylated version of mu-c-ets-1 protein (p63). FT: flow-through fraction; W: wash fraction; El: elution fraction with 0.5 M NaCl. Immunoprecipitation analyses were performed using an ets-1 anti peptide serum (Pognonec et al., 1988).

Figure4:

Release of mu-p63 c-ets-1 from thymocyte nuclei by treatment with micrococcal nuclease. Panel A: isolated murine thymocytes nuclei were either left untreated (Control) or were treated with either 100 units of micrococcal nuclease (Mic. N.) or 20µg of boiled RNase A (RNaseA). P: residual nuclei. S: supernatant. Immunoprecipitations were carried out with the standart ets antiserum. Panel B: Coomassie blue staining of the total proteins from the residual nuclei and supernatant fractions of panel A. Panel C: Ethidium bromide staining of the DNA present in the residual nuclei and supernatant fractions of panel A.

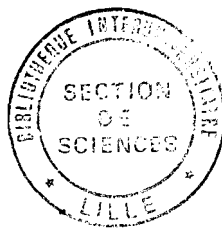
Figure 5:

Salt extraction of mu-p63 c-ets-1 from murine thymocytes nuclei.

Nuclei were incubated for 5 min in the presence of the indicated NaCl concentration, and residual nuclei (P) and supernatant fractions (S) were analyzed for the presence of mu-p63 c-ets-1 by immunoprecipitation using the standart ets antiserum. 0, .1, .2, .4, .6 correspond to treatment by 0, 100, 200, 400 and 600 mM NaCl respectively. p63 refers to the mu-p63 c-ets-1 protein.

Figure 6:

Subcellular localisation of phosphorylated and unphosphorylated murine c-ets-1 proteins by fractionation experiment. L[³⁵S] methionine-labelled thymocytes either untreated (Control) or treated with the calcium ionophore A23187 (A23187) were fractionated as described in Materials and methods. p63 refers to the non-phosphorylated murine c-ets-1 protein, and p73 to its major phosphorylated form. Crude cyto: crude cytoplasmic fraction, Nuclear wash: nuclear wash fraction, nuclei: nuclei fraction. Immunoprecipitation analyses were performed using a ets-1 anti peptide serum (i) or the same blocked by preincubation with an excess of the corresponding purified peptide (b).



RESUME

c-ets-1 est le progéniteur cellulaire de la séquence v-ets du rétrovirus aviaire E26. La protéine majoritaire codée par ce gène cellulaire, appelée Ets-1, a un poids moléculaire de 54 kD et est préférentiellement exprimée dans les cellules lymphoïdes. Nous montrons ici que l'expression de ce produit augmente au cours de la maturation de cellules de la lignée B, ainsi qu'au cours du développement embryonnaire du thymus. Parallèlement, nous montrons que l'expression de Ets-1 suit l'état de prolifération tant des thymocytes que des lymphocytes T circulant. D'autre part, nous montrons que le produit de c-ets-1 est sujet à des modifications post-traductionnelles par phosphorylation, et ce principalement sur des résidus sérines. Ces événements de phosphorylation requièrent la présence d'une concentration intracellulaire en calcium libre élevée, et sont par conséquent induits lors de stimulations mitogéniques dont l'un des événements précoces est précisément l'augmentation de la concentration intracellulaire en ions calcium. Ces modifications de Ets-1 sont transientes et font penser à des événements de régulations impliqués dans les étapes précoces de la stimulation lymphocytaire.

Cette hypothèse est renforcée par l'observation que nous présentons selon laquelle Ets-1 est localisée dans le noyau, et est associée à la chromatine. De plus, cette association à la chromatine, confortée par l'observation de l'interaction de Ets-1 avec l'ADN in vitro, est complètement abolie à la suite de la phosphorylation de Ets-1.

Ces résultats nous permettent de proposer le modèle selon lequel Ets-1 interviendrait dans la régulation de l'expression génique ou dans la réplication de l'ADN, et serait fonctionnellement modulée selon son état de phosphorylation.