

50376  
1993  
99

50376  
1993  
99

**UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE  
LILLE FLANDRES -ARTOIS**

Numéro d'ordre 1045

**THESE**

présentée pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE  
LILLE**

par

**Christophe QUEVA**

**EXPRESSION ET FONCTION DES  
PROTO-ONCOGENES C-MYB ET C-ETS-1**



Soutenue le 11 Janvier 1993 devant la commission d'examen

**Président :** Pr André Verbert

**Rapporteurs :** Dr Françoise Diéterlen-Lièvre  
Dr Pierre Jurdic

**Examineurs :** Pr Jean Krembel  
Pr Dominique Stéhelin  
Dr Bernard Vandebunder



50376  
1993  
99

50376  
1993  
99

*Un jour le drôle d'homme qu'on nomme  
Tom Bonbadilom  
m'a dit me parlant des hommes  
je les trouve bizarres*

*Comme un poulet dans le noir  
tenant une prise de courant  
qui cherche en tâtonnant à se brancher quelque part.*

Jacques Higelin. *Tom Bonbadilom.*



*Developmental Biology ...is a science of becoming, not of being, and it denies the hegemony of the adult.*

Scott F. Gilbert in *Developmental Biology*

*Afin que tout soit écrit et publié  
sur la page blanche  
reçu, vécu, conçu, transmis  
tenté, raté ou réuni*

*Dès lors  
que ma pensée fut libre  
et mon esprit assez avide  
pour recevoir l'inspiration*

*il a bien fallu que le ciel  
empruntant la voie du destin  
délègue à titre exceptionnel  
quelques représentants divins*

*Séraphins, chérubins complices  
venus filer un p'tit coup d'aile  
tendre à mon âme une pass'relle  
afin que l'"oeuvre" s'accomplisse*

A Dominique Stéhelin

*pour avoir éclairé mon âme  
du soleil de ses rêves.*

A Bernard Vandebunder

*Pour m'avoir plus qu'aidé  
veillé par la grâce de sa présence  
à ce que jamais ne s'éteigne  
la flamme  
de  
la Science.*

Aux membres du jury, Messieurs Jurdic, Krembel et Verbert

*qui ont gracieusement accepté  
de lire  
et de critiquer  
ce pavé*

A Madame Dieterlen et son groupe

*Qui m'ont guidé  
dans le monde  
des embryons*

A Stéphane

*témoin sûr et dévoué  
éclairé, généreux  
la vigne te remercie*

A Corinne, Pascale, Anita, Véro, DL, Vincent, Xavier

*pour votre aide gracieuse  
votre précieuse amitié  
et votre belle énergie*

A Marie-Berthe, Marie-Anne, Fatima, Chantal

*D'avoir su me régaler  
de vos bons mots, quand il faut  
et gâté mon coeur, mon esprit et mon palais*

A Nicole et Marie-Christine aux claviers

A Martin et Thierry à l'informatique

A Thierry, aux commandes de la photocopieuse

*Et qu'aurais-je pu faire  
Sans le secours gracieux  
d'un commando fidèle et zélé  
d'assistants talentueux ?*

Au Ministère de la Recherche et de l'Espace

A l'Institut Pasteur de Lille

*qui ont subventionné ce travail*

<b>RESUME</b> .....	<b>1</b>
<b>PUBLICATIONS</b> .....	<b>2</b>
<b>GLOSSAIRE</b> .....	<b>3</b>
<b>JARGON</b> .....	<b>4</b>
<b>DEFINITIONS</b> .....	<b>4</b>
<b>PRESENTATION DU MEMOIRE</b> .....	<b>7</b>
<b>I - COOPERATION ENTRE FACTEURS DE TRANSCRIPTION DE LA FAMILLE</b>	
<b>A LEUCINE ZIPPER</b> .....	<b>10</b>
<b>A - La famille des facteurs de transcription à leucine zipper</b> .....	<b>10</b>
1- Les proto-oncogènes c-fos et c-jun.....	10
2 - Fos, Jun et le complexe AP1.....	11
<b>B - Interférences transcriptionnelles, leucine zipper cherche zinc</b>	
<b>finger</b> .....	<b>13</b>
1 - Interférences transcriptionnelles sur des éléments de réponse	
composites.....	14
2 - Interférences transcriptionnelles indépendantes de la fixation à l'ADN.....	15
<b>II - LE RETROVIRUS LEUCEMOGENE E26</b> .....	<b>20</b>
<b>A - Structure du rétrovirus E26</b> .....	<b>20</b>
<b>B - Phénotype des cellules hématopoïétiques transformées par E26</b> .....	<b>21</b>
1 - Chez le poulet .....	21
2) Chez la souris .....	22
<b>C - Effet de E26 sur les fibroblastes et les cellules de neurorétine</b> .....	<b>23</b>
<b>D - Contributions respectives de v-myb et v-ets aux propriétés</b>	
<b>biologiques de E26</b> .....	<b>24</b>
<b>III - LE PROTO-ONCOGENE C-MYB</b> .....	<b>28</b>
<b>A- Introduction</b> .....	<b>28</b>
1- Le domaine de fixation à l'ADN de c-Myb.....	28
a) Structure.....	28
b) Une famille de gènes apparentés à c-myb.....	30
c) Myb reconnaît une séquence spécifique de l'ADN.....	31
2 - La régulation de la transcription par c-Myb.....	31
a) Les MREs sont requis.....	31
b) Myb transactive sans se fixer à l'ADN.....	32
c) Myb a trouvé des partenaires.....	33
d) Les domaines de régulation de la transcription.....	34
3 - Régulation de la fonction des protéines c-Myb.....	36
a) Epissage alternatif des transcrits du locus c-myb.....	36

b) Modifications post-traductionnelles. ....	38
c) Régulation du transport cytoplasme noyau. ....	38
d) Régulation de la dégradation. ....	39
4- Activation oncogénique de c-myb. ....	39
a) Premières évidences. ....	39
b) Tests de transformation cellulaire in vitro.....	40
5 - Expression de c-myb. ....	42
a) c-myb associé à un état immature ou prolifératif. ....	42
b) Régulation de l'expression de c-myb.....	44
6 - Fonctions de c-myb.....	46
a) Manipulation de l'expression de c-myb in vitro.....	47
b) Inactivation de c-myb par recombinaison homologue.....	49
7 - mim-1, un gène cible de Myb. ....	50
a) Isolement et caractérisation. ....	50
b) Régulation de l'expression de mim-1. ....	51
<b>B - Résultats - Publication 1.....</b>	<b>53</b>
<b>C - Discussion. ....</b>	<b>55</b>
<b>IV - LE PROTO-ONCOGENE C-ETS-1.....</b>	<b>61</b>
<b>A - Introduction.....</b>	<b>61</b>
1 - Le locus c-ets-1 de poulet code deux facteurs de transcription. ....	61
2 - Le domaine de fixation à l'ADN de c-ets-1. ....	62
a) Caractérisation.....	62
b) La famille de gènes ETS. ....	64
c) Les séquences de fixation des protéines ETS.....	65
3 - La régulation de la transcription par c-Ets-1 ....	66
a) Les gènes cibles des protéines c-Ets-1. ....	66
b) Les domaines de régulation de la transcription.....	68
4 - Régulation de la fonction des protéines c-Ets-1. ....	70
a) Répression de la fixation à l'ADN. ....	70
b) L'épissage alternatif des transcrits du locus c-ets-1. ....	72
c) Phosphorylation des protéines c-Ets-1. ....	73
d) c-Ets-1 interagit-il avec d'autres protéines ?.....	75
e) Régulation du transport du cytoplasme vers le noyau. ....	77
f) Régulation de la dégradation des protéines c-Ets-1. ....	78
5 - c-ets-1 et la transformation cellulaire. ....	78
a) Ets est-il oncogène ?.....	78
b) c-ets-1 et tumeurs humaines.....	79

6 - Régulation de l'expression de c-ets-1.....	80
7 - Expression de c-ets-1.....	82
<b>B - Résultats - Publication 2.....</b>	<b>86</b>
<b>C- Discussion.....</b>	<b>88</b>
<b>REFERENCES .....</b>	<b>94</b>

## RESUME :

Le rétrovirus leucémogène aviaire E26 induit une leucémie mixte érythroïde et myéloïde et transforme des progéniteurs hématopoïétiques très immatures. Le rétrovirus E26 a transduit deux séquences d'origine cellulaire, les oncogènes *v-myb* et *v-ets*, responsables des propriétés transformantes de E26. *v-myb* et *v-ets* coopèrent dans la transformation des cellules hématopoïétiques *in vitro* et leur expression sous la forme d'une protéine de fusion, la P135 $\Delta$ gag-myb-ets, est nécessaire pour l'activité leucémogène de E26. *v-myb* et *v-ets* dérivent des proto-oncogènes *c-myb* et *c-ets-1* qui codent des facteurs de transcription. Pour évaluer la possibilité de l'existence d'interférences entre les protéines c-Myb et c-Ets-1 et pour appréhender leurs rôles *in vivo*, nous avons entrepris une étude détaillée de l'expression de ces proto-oncogènes au cours du développement embryonnaire du poulet.

Nous avons d'abord décrit l'expression de *c-myb* et, en parallèle, celle de *mim-1*, un gène cible de la P135 $\Delta$ gag-myb-ets. Nous avons démontré que c-Myb transactive le promoteur de *mim-1* *in vitro*. Cependant, dans l'embryon, les transcrits *c-myb* détectés dans les cellules lymphoïdes, érythroïdes et épithéliales en prolifération ne sont jamais associés avec la transcription de *mim-1*. Nous avons ensuite confirmé l'expression spécifique de *mim-1* lors de la différenciation granulocytaire. Les transcrits *c-myb* et *mim-1* s'accumulent dans la rate et le pancréas, au moment où a lieu la granulopoïèse. Par contre, *mim-1* est transcrit en l'absence de *c-myb* dans les précurseurs granulocytiques du sac vitellin et de la bourse de Fabricius. Ces résultats suggèrent que, selon l'environnement dans lequel s'effectue la différenciation granulocytaire, la transcription de *mim-1* est régulée par différents mécanismes et que *c-myb* participe à l'un de ces mécanismes.

En parallèle, nous avons étudié l'expression des deux facteurs de transcription, la p54<sup>c-ets-1</sup> et la p68<sup>c-ets-1</sup>, codés par le proto-oncogène *c-ets-1* chez le poulet. Dans l'embryon, les transcrits *c-ets-1* sont détectés de manière transitoire dans les cellules d'origine mésodermique et mésothéliale. L'expression de *c-ets-1* est induite lors de la gastrulation dans les cellules du mésoderme qui migrent dans le blastocoele. Plus tard, la p54<sup>c-ets-1</sup> et la p68<sup>c-ets-1</sup> s'accumulent dans les cellules qui subissent une transition épithélium-mésenchyme, dans les cellules du mésenchyme qui interagissent avec un épithélium et dans les cellules endothéliales au cours de la vascularisation des organes. Les transcrits codant la p54<sup>c-ets-1</sup> et la p68<sup>c-ets-1</sup> sont également détectés dans des cellules érythroïdes immatures des îlots sanguins extraembryonnaires. Dans les cellules lymphoïdes, la p54<sup>c-ets-1</sup> est abondante, alors que la p68<sup>c-ets-1</sup> n'est pas détectable. Ces résultats indiquent que la p54<sup>c-ets-1</sup> et la p68<sup>c-ets-1</sup> pourraient avoir des rôles distincts et spécifiques au cours du développement.

En conclusion, nos travaux ont permis de délimiter le champ d'action des protéines c-Myb et c-Ets-1 et d'identifier des cellules dans lesquelles elles seraient susceptibles de former un complexe transitoire, qui serait stabilisé dans la P135 $\Delta$ gag-myb-ets, le produit oncogénique du rétrovirus E26.



**PUBLICATIONS :**

DESBIENS, X., QUEVA, C., JAFFREDO, T., STEHELIN, D. AND VANDENBUNDER, B. (1991). The relationship between cell proliferation and the transcription of the nuclear oncogenes *c-myc*, *c-myb* and *c-ets-1* during feather morphogenesis in the chick embryo. *Development* **111**, 699-713.

\*QUEVA, C., NESS, S.A., GRASSER, F.A., GRAF, T., VANDENBUNDER, B. AND STEHELIN, D. (1992). Expression patterns of *c-myb* and of *v-myb* induced myeloid-1 (*mim-1*) gene during the development of the chick embryo. *Development* **114**, 125-133.

\*QUEVA, C., LEPRINCE, D., STEHELIN, D. AND VANDENBUNDER, B. Expression patterns of the two transcription factors encoded by the chicken *c-ets-1* proto-oncogene during the development of the chick embryo. Soumis à *Development*.

\* publications présentées dans ce mémoire.

## GLOSSAIRE :

- ADNc : Acide déoxyribonucléique complémentaire
- AEV : *Avian erythroblastosis virus*
- AMPc : Adenosine mono-phosphate cyclique, second messenger
- AMV : *Avian Myeloblastosis virus*
- AP1 : *Activator protein 1*, complexe transcriptionnel, ou séquence de fixation du complexe AP1, peut être un TRE.
- AP2 : *Activator protein 2*, facteur de transcription qui se fixe sur des sites AP2
- ARNm : Acide ribonucléique messenger
- ATF : *Activating transcription factor*, voir CREB
- b : base
- C/EBP : *CCAAT/enhancer binding protein*, facteur de transcription qui fixe la séquence CCAAT
- c-MGF : facteur de croissance des cellules myéломonocytiques aviaires
- CRE : *c-AMP responsive element*, élément de réponse à l'AMPc, séquence fixée par les protéines de la famille CREB
- CREB : *cAMP responsive element binding factor*, ou ATF, facteur de transcription qui fixe l'élément de réponse à l'AMPc
- DMSO : Diméthyl Sulfoxyde (agent qui provoque la différenciation des cellules érythroïdes)
- E0, E1, E2 ... E21: nombre de jours d'incubation des embryons de poulet, E0 étant le premier jour d'incubation
- EBS : *Ets binding site*, site de fixation des protéines Ets
- EGTA : Ethylène Glycol-bis (β Amino-Ethyl Ether) N, N, N', N'-Acide Tétra Acétique
- ER : *Oestrogen receptor*, récepteur aux oestrogènes
- GR : *Glucocorticoid receptor*, récepteur aux glucocorticoïdes, se fixe sur le GRE
- GRE : *Glucocorticoid responsive element*, élément de réponse aux glucocorticoïdes
- IP1 : *Inhibitory protein 1*, protéine qui inhibe la fixation à l'ADN de AP1
- kD : Kilo Dalton
- LTR : *Long terminal repeat*, ou séquences promotrices de la transcription virale
- MEP : *Myb Ets progenitor*
- MRE : *Myb responsive element*, site de fixation des protéine Myb
- NF-M : *Nuclear factor myeloid*
- pb : paire de bases
- PEA3 : *Polyoma enhancer activity 3*, séquence EBS de l'enhancer du virus du polyome, ou facteur de transcription de la famille Ets, qui se fixe sur cette séquence
- RAR : *Retinoic acid receptor*, récepteur à l'acide rétinoïque de type, se fixe au RARE

- RARE :** *Retinoic acid responsive element*, élément de réponse à l'acide rétinoïque
- RT-PCR :** *Reverse transcriptase-polymerase chain reaction*, technique consistant à rétrotranscrire l'ARN en ADNc, soumis ensuite à l'amplification en chaîne
- TCR :** *T cell receptor*, récepteur à l'antigène des cellules T
- THR  $\alpha$  :** *Thyroid receptor  $\alpha$* , récepteur aux hormones thyroïdiennes  $\alpha$
- TRE :** *TPA responsive element*, élément de réponse aux TPA, équivaut souvent à AP1
- SV40 :** *Simian virus 40*
- TPA :** *Tumor promoting agent* ou 12-O-Tetradécanoyl-Phorbol-13-Acétate
- VDR :** *Vitamin D receptor*, récepteur à la vitamine D, se fixe sur le VDRE
- VDRE :** *Vitamin D responsive element*, élément de réponse à la vitamine D
- uPA :** *Urokinase-type plasminogen activator*, activateur du plasminogène de type urokinase, enzyme qui clive le plasminogène inactif et le transforme en plasmine active

## JARGON :

Je prie mon lecteur étranger au langage des facteurs de transcription de m'excuser pour les termes anglais qui figurent en *italique* dans ce mémoire. Ces termes d'usage courant, ont été préférés aux termes français rarement usités.

Le lecteur, qui n'est pas familier avec l'embryologie peut se référer à la figure 1, p7 qui indique très schématiquement les principaux dérivés des trois feuillets embryonnaires, ectoderme, mésoderme et endoderme. Les figures 5, p21 et 11, p42 illustrent la différenciation hématopoïétique, et les principaux organes où celle-ci se déroule chez le poulet.

Pour les mêmes raisons de clarté, j'ai tenté de me soumettre aux règles suivantes :

*onc* en italique signifie que je parle du gène *onc* ou des transcrits de *onc*

Onc, en majuscule ou p68<sup>onc</sup> signifie que je parle de la protéine de 68kD, produit du gène *onc*.

P135 indique qu'il s'agit d'une protéine de fusion de 135kD

## DEFINITIONS :

*enhancer* : ou activateur, séquence agissant en *cis* qui augmente l'utilisation de certains promoteurs eucaryotes et qui peut agir quelle que soit son orientation et/ou sa localisation (amont ou aval) par rapport au promoteur.

promoteur : région de l'ADN impliquée dans la liaison de l'ARN polymérase à l'ADN lors de l'initiation de la transcription, peut désigner au sens large l'ensemble des séquences agissant en *cis*, requises pour une initiation précise et efficace de la transcription.

protéine transdominante négative : protéine mutée ou variant naturel capable d'inactiver les fonctions de la protéine correspondante normale, en formant avec elle des complexes inactifs ou en s'associant de façon compétitive à ses cibles ou coactivateurs.

Quenching : Mécanisme de répression de la transcription, où l'activateur et le répresseur se fixent à des séquences adjacentes non-chevauchantes. Des interactions protéine-protéine entre l'activateur et le répresseur empêchent alors le répresseur d'entrer en contact avec la machinerie transcriptionnelle.

Squelching : Mécanisme de répression de la transcription indépendant de la fixation à l'ADN. Le répresseur agit en sequestrant l'activateur ou des cofacteurs nécessaires à l'activateur. L'importance de ce mécanisme *in vivo* n'est pas claire mais permet de démasquer des interactions protéine-protéine.

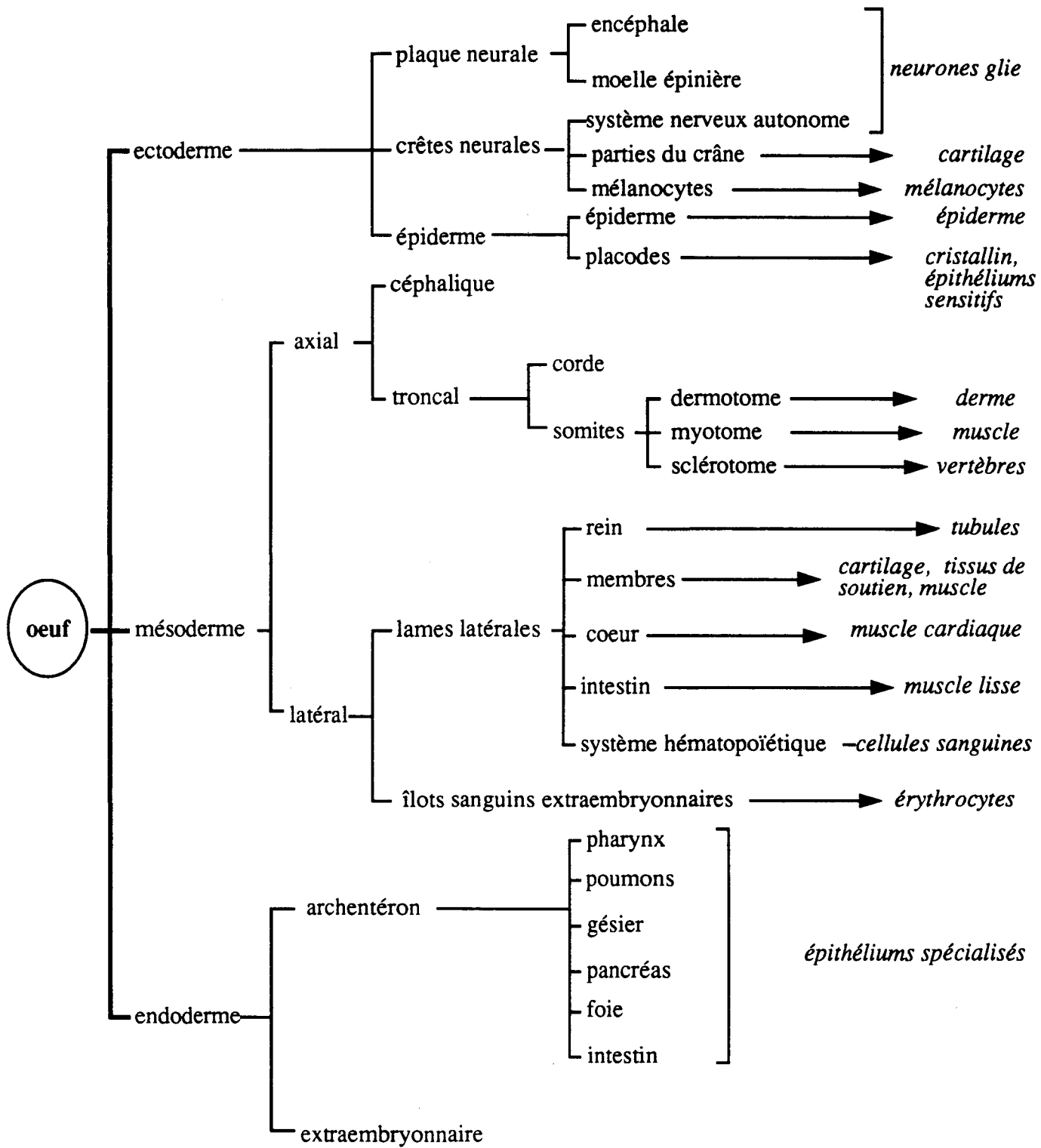
**PRESENTATION DU MEMOIRE.**

BLASTULA

GASTRULA

NEURULA

ORGANOGENESE

types cellulaires  
adultes

**Figure 1:** Schéma indicateur de l'origine embryonnaire de certains types cellulaires adultes chez le poulet. L'organisme est le résultat d'une hiérarchie de décisions.

## PRESENTATION DU MEMOIRE.

Le développement d'un organisme assure deux fonctions fondamentales. Il garantit la continuité de l'espèce d'une génération à l'autre, et il génère, de manière reproductible pour chaque individu, la diversité et l'organisation cellulaire grâce à deux processus, différenciation et morphogenèse. Le passage de l'oeuf à l'organisme adulte n'est pas spécifié en une seule fois au cours du développement embryonnaire, et implique une suite d'étapes et de choix progressifs. Cette hiérarchie de décisions peut être appréhendée en observant le schéma ci-contre (Fig.1) qui montre l'origine embryonnaire de quelques types cellulaires trouvés chez l'adulte. On peut observer que les cellules histologiquement différenciées sont trouvées à droite et qu'elles sont précédées par une série d'états intermédiaires. A partir d'un de ces états, la cellule peut se diriger vers plusieurs voies parmi une gamme restreinte de possibilités. Chacun de ces états provient lui aussi de subdivisions d'un état encore plus précoce et moins déterminé. Ainsi, pour prendre un exemple qui nous intéressera par la suite, les cellules compétentes pour former le système hématopoïétique doivent avoir déjà pris la décision qu'elles sont du mésoderme, plutôt que de l'ectoderme ou de l'endoderme, et du mésoderme de type latéral, plutôt que axial. Chaque prise de décisions va se traduire par un changement au niveau de l'expression de gènes. Certains gènes, spécifiques du nouvel état déterminé, vont être induits. D'autres vont, au contraire, être réprimés pour favoriser l'émergence du nouveau phénotype. La diversité des programmes d'expression des gènes va donc être extraordinaire, non seulement en raison du grand nombre de tissus différents (environ 200 chez un mammifère adulte) mais aussi en raison de la dynamique du développement qui nécessite la mise au point en continu de nouveaux programmes correspondant aux multiples périodes intermédiaires.

L'identification des mécanismes contrôlant cette impressionnante diversité est donc un objectif essentiel. De multiples verrous, transcriptionnels, post-transcriptionnels, post-traductionnels ont été décrits qui modifient l'activité d'un gène. Le travail présenté ici ne discutera que des mécanismes qui contrôlent l'initiation de la transcription. Le déclenchement de la transcription nécessite la constitution d'un complexe contenant l'ARN polymérase II qui se fixe sur les régions promotrices du gène considéré. La formation et l'activation de ce complexe sont soumises à l'influence régulatrice d'autres protéines ou facteurs de transcription qui se lient soit à proximité immédiate, soit à distance sur des éléments appelés *enhancer* ou *silencer* selon qu'ils aient une influence positive ou négative sur la transcription (Ptashne, 1988; Mitchell et Tjian, 1989, Ptashne et Gann, 1990). Mon but n'est pas ici de passer en revue les différents et toujours plus nombreux facteurs de transcription, environ 150 caractérisés chez les mammifères (Faisst et Meyer, 1992), ni même de dépeindre leur mécanismes d'action, comment ils pourraient par exemple modifier sur de longues distances la structure de la chromatine ou interagir avec le complexe d'initiation. Mon but est plutôt d'évoquer des mécanismes expliquant la diversité des contrôles transcriptionnels observés *in vivo*. On évalue à 15000, le nombre de gènes exprimés dans une cellule différenciées, à 200, le

nombre de tissus différents et 150 facteurs de transcription ont été caractérisés jusqu'à présent. Ce simple dénombrement fait penser que la diversité des contrôles transcriptionnels n'est pas assurée par une diversité des facteurs régulateurs. La dissection fonctionnelle des régions promotrices et régulatrices de l'expression de certains gènes a permis de montrer la présence de plusieurs sites de fixation pour des facteurs de transcription différents sur ces séquences. Une partie de la considérable diversité observée *in vivo* pourrait donc être imputable à l'utilisation de combinaisons variables d'un petit nombre de facteurs de transcription. La diversité (et la complexité) est accrue par le fait qu'un facteur de transcription peut exister sous différentes formes alternatives et appartenir à une famille de protéines apparentées. Ces facteurs peuvent se fixer à des séquences voisines, entrer en compétition, et avoir des effets opposés sur la transcription. Un autre élément de diversité est apporté par le dialogue qui s'établit entre les différents facteurs de transcription fixés aux séquences régulatrices de leurs gènes cibles. Ainsi, l'activité d'un facteur va dépendre du contexte dans lequel il se trouve, des séquences qui environnent son site de fixation et des autres protéines qui pourraient s'y lier. Ce dialogue entre facteurs de transcription peut être direct et impliquer des contacts protéine-protéine.

Dans l'introduction de ce mémoire, je présenterai un exemple bien connu de telles interactions entre facteurs de transcription appartenant à une même famille. J'ai choisi de discuter des facteurs qui coopèrent en s'hétérodimérisant par une structure appelée *leucine zipper*. J'évoquerai ensuite les interactions entre membres de deux familles différentes et le cas des interférences transcriptionnelles entre les facteurs à *leucine zipper* et les récepteurs nucléaires d'hormones qui sont des facteurs de transcription dépendant de la fixation d'un ligand. La suite de ce mémoire sera consacrée aux facteurs de transcription codés par les proto-oncogènes *c-myb* et *c-ets-1*. *c-myb* et *c-ets-1* ont été découverts par homologie avec les oncogènes viraux *v-myb* et *v-ets* transduits dans le rétrovirus leucémogène E26 (Roussel et al., 1979; Leprince et al., 1983a; Nunn et al., 1983). Nous savons que *v-Myb* et *v-Ets* coopèrent pour la transformation des cellules hématopoïétiques (Metz et Graf, 1991a, b). Cependant, il n'est pas établi que cette coopération se fasse au niveau transcriptionnel, puisque, à l'heure actuelle, aucun gène régulé à la fois par *v-Myb* et *v-Ets* n'a été isolé. Avant de spéculer sur une interaction éventuelle entre les protéines *c-Myb* et *c-Ets-1* *in vivo*, il est essentiel d'identifier les cellules dans lesquelles les deux gènes correspondants s'expriment. Une éventuelle coexpression aurait permis de ne pas faire avorter immédiatement cette hypothèse. L'étude de l'expression de *c-myb* et de *c-ets-1* au cours du développement embryonnaire a également apporté des renseignements sur les fonctions de ces facteurs de transcription *in vivo*.

Les résultats, que nous avons obtenus, seront directement insérés sous forme d'articles dans ce mémoire. Ces articles sur l'expression de *c-myb* et de *c-ets-1* seront suivis à chaque fois d'un résumé rapide et d'une discussion spécifique. Une discussion plus générale, où je réexaminerai l'hypothèse de la coopération transcriptionnelle entre *c-myb* et *c-ets-1* à la lumière de nos résultats terminera ce mémoire.



**I - COOPERATION ENTRE FACTEURS DE  
TRANSCRIPTION DE LA FAMILLE A *LEUCINE*  
*ZIPPER.***

## I - COOPERATION ENTRE FACTEURS DE TRANSCRIPTION DE LA FAMILLE A *LEUCINE ZIPPER*.

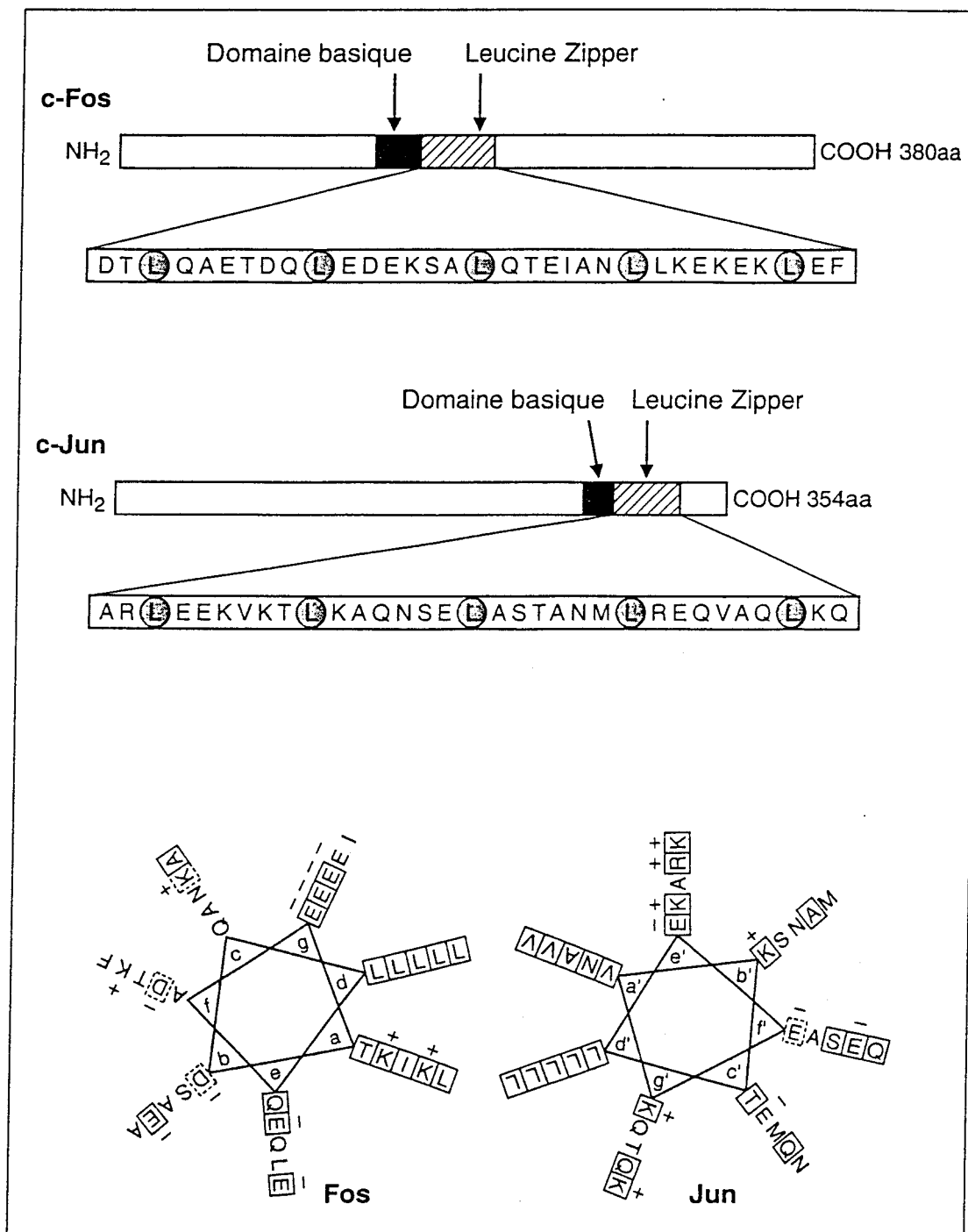
### A - La famille des facteurs de transcription à *leucine zipper*.

#### 1- Les proto-oncogènes *c-fos* et *c-jun*.



Le proto-oncogène *c-fos* est l'homologue cellulaire des gènes *v-fos* des virus sarcomatogènes murins FBJ et FBR et du virus aviaire NK24, qui induit des néphroblastomes (Müller et al., 1986; Abate et Curran, 1990; Ransone et Verma, 1990; Blanchard, 1992, pour revue). Les produits de *c-fos* et de *v-fos* sont des phosphoprotéines nucléaires (Curran et al., 1984). Le sérum de rat infectés par FBJ permet d'immunoprécipiter la protéine v-Fos de 55kD, additionnée d'une protéine de 39kD non codée par le virus (Curran et Teich, 1982; Curran et al., 1985). La p39 a été ensuite identifiée comme le produit du proto-oncogène *c-jun* (Chiu et al., 1988; Rauscher III et al., 1988a; Sassone-Corsi et al., 1988a, b). *c-jun* est l'homologue cellulaire de l'oncogène *v-jun* du virus sarcomatogène aviaire ASV17 (Maki et al., 1987).

*c-fos* et *c-jun* font partie de la classe des gènes de réponse précoce à des stimuli mitogènes (Abate et Curran, 1990; Ransone et Verma, 1990; Blanchard, 1992, pour revue). Cette expression est transiente et ne nécessite pas de néosynthèse protéique. Au cours du développement, les transcrits *c-fos* sont détectés dans les annexes extraembryonnaires, placenta, sac vitellin, amnion, et dans les zones de croissance des os, dans l'épiderme et le système nerveux (Müller et al., 1983; Dony et Gruss, 1984; Müller, 1986; Caubet et al., 1989). Chez l'adulte, *c-fos* est exprimé à des degrés divers dans pratiquement tous les tissus. Un fort marquage est retrouvé en particulier dans les kératinocytes en voie de cornéification, ce qui suggère un rôle de *c-fos* non seulement dans la prolifération mais aussi dans la différenciation cellulaire (Basset-Séguin et al., 1990; Fischer C. et al., 1991). Dans le système nerveux central, l'expression de *c-fos* est induite dans les neurones par une variété de stimuli, épilepsie, stress, douleur (Blanchard, 1992). Dans les noyaux suprachiasmatiques de l'hypothalamus, l'expression de *c-fos* est liée à la nyctémère (Smeyne et al., 1992). *c-jun* est lui aussi exprimé dans une grande variété de tissus de toute origine embryonnaire. Dans l'embryon de souris, le signal le plus intense a été observé dans certaines populations cellulaires du cartilage, du système nerveux, de l'intestin et de la peau (Wilkinson et al., 1989).

En plus de c-Fos, plusieurs protéines sont détectées par des séra dirigés contre c-Fos dans des fibroblastes en croissance. Ces protéines homologues ont été appelées FosB, Fra-1 et Fra-2 (Cohen et Curran, 1988; Cohen et al., 1989; Zerial et al., 1989; Nishina et al., 1990). De même, les gènes *junB* et *junD* ont été caractérisés sur la base de leur homologie avec *c-jun* (Ryder et al.,



**figure 2** Structure des protéines Fos et Jun

Partie supérieure : les régions impliquées dans la dimérisation, le *leucine zipper*  et dans l'interaction avec l'ADN, le domaine basique 

La région correspondant au *leucine zipper* est représentée dans le code à une lettre (L=leucine). Partie inférieure : représentation schématique des régions en interaction. Les hélices sont vues suivant leur axe à partir de l'extrémité NH<sub>2</sub>-terminale des *leucine zipper* : les acides aminés empilés les uns au dessus des autres sont regroupés et encadrés quand ils sont conservés dans les familles Fos et Jun, les pointillés représentent des changements conservatifs d'après Blanchard, 1992.

1988; Hirai et al., 1989). Ces gènes présentent des cartes d'expression différentes au cours du développement, ou du cycle cellulaire (voir par exemple Cohen et Curran, 1988; Wilkinson et al., 1989; Kovary et Bravo, 1992). L'ensemble des protéines homologues à c-Fos ou à c-Jun possèdent une structure appelée *leucine zipper* caractérisée par la présence de 5 résidus leucine espacés régulièrement de 6 acides aminés (Fig.2). Cette structure permet la dimérisation des membres de cette famille. Les hétérodimères Fos-Jun ont été montrés fonctionnellement équivalents à un complexe transcriptionnel de type AP1 (Abate et Curran, 1990; Ransone et Verma, 1990; Angel et Karin, 1991, pour revues).

## 2 - Fos, Jun et le complexe AP1.

Le complexe de facteurs de transcription AP1 a été originellement défini comme un ensemble de protéines capables de se fixer sur les sites AP1 (5'-TGACTCA-3') trouvés dans les régions *enhancer* du virus SV40 et du gène de la méthallothionéine IIA (Lee et al., 1987a). Les séquences AP1 et les complexes AP1 sont aussi impliqués dans la stimulation transcriptionnelle de gènes en réponse aux esters de phorbol (T.P.A. pour 12-O-Tétradecanoyl-Phorbol-13-Acétate ou Tumor Promoting Agent) (Lee et al., 1987b; Angel et al., 1987). La séquence AP1 est d'ailleurs appelée TRE pour *TPA-Response Element*. Un faisceau d'études convergentes a permis d'établir que le complexe AP1 était composé de c-Fos associé à c-Jun (Rauscher III et al., 1988a, Sassone-Corsi et al., 1988a, pour revues Abate et Curran, 1990; Ransone et Verma, 1990; Angel et Karin, 1991). La coopération entre ces deux protéines est requise pour obtenir un effet transactivateur maximal à partir d'un site TRE (Chiu et al., 1988; Sassone-Corsi et al., 1988c).

En utilisant les produits de traduction *in vitro* des gènes *c-fos* et de *c-jun*, de nombreux groupes ont montré que c-Fos modulait la fonction de c-Jun en formant un hétérodimère c-Fos/c-Jun (Kouzarides et Ziff, 1988; Nakabeppu et al., 1988; Halazonetis et al., 1988; Rauscher III et al., 1988b; Sassone-Corsi et al., 1988b). Les protéines c-Jun seules forment des homodimères qui se lient au site AP1. Les homodimères Jun/Jun associés à l'ADN sont moins stables que les hétérodimères Fos/Jun et sont donc moins performants en matière de transactivation. Au contraire, les protéines c-Fos ne s'associent pas en homodimères, ne se lient pas à l'ADN et leur capacité transactivatrice ne s'exprime qu'en association avec c-Jun.

La formation des complexes Jun/Jun ou Fos/Jun est possible grâce au domaine de ces protéines organisé en *leucine zipper* (Kouzarides et Ziff, 1988; Sassone-Corsi et al., 1988b; Gentz et al., 1989; Neuberger et al., 1989; Ransone et al., 1989; Schuermann et al., 1989; Turner et Tjian, 1989). Cette structure a été proposée pour la première fois pour le facteur de transcription CAAT *Element Binding Protein*, C/EBP (Landschultz et al., 1988). Elle est constituée de la répétition, tous les 7 acides aminés, de résidus leucine, 4 pour C/EBP, 5 pour Fos et Jun. L'enroulement de cette structure en hélice  $\alpha$  a pour conséquence d'aligner toutes les leucines sur une face du cylindre

constitué par l'hélice (Fig.2). Le nom de *leucine zipper* ne dépeint pas exactement la réalité puisqu'il n'y a vraisemblablement pas d'interdigitation des leucines (Gentz et al., 1989; O'Shea et al., 1989a, b). Les hélices dans un dimère sont parallèles, et s'enroulent l'une autour de l'autre comme dans les structures *coiled coil* trouvées dans les kératines ou la tropomyosine. La dimérisation des protéines Fos/Jun est indispensable pour la fixation du complexe au site AP1. Une autre région amino-terminale au *leucine zipper*, riche en acides aminés basiques, est requise pour la fixation à l'ADN (Kouzarides et Ziff, 1988; Gentz et al., 1989; Neuberg et al., 1989; Turner et Tjian, 1989). La dimérisation a pour effet de mettre bout à bout les domaines de liaison l'ADN pour former une surface de contact plus étendue. Kerpolla et Curran (1991) ont montré que la fixation du complexe Fos/Jun à la séquence AP1 était capable d'induire une courbure de l'ADN. L'homodimère Jun/Jun courbe l'ADN dans une direction opposée à celle induite par l'hétérodimère Fos/Jun. En dépit de la similarité des séquences reconnues par les dimères Jun/Jun et Fos/Jun, ces derniers sont donc capables de former avec l'ADN des complexes topologiquement différents. Cet aspect très récent de la fonction d'un facteur de transcription vient ajouter une nouvelle dimension à la diversité et pourrait en partie expliquer pourquoi les mêmes protéines peuvent avoir des effets différents en fonction du contexte d'un élément régulateur.

La formation de complexes entre membres de la famille c-Fos et c-Jun et leur association à l'ADN sont similaires à celle des complexes c-Fos/c-Jun (Franza et al., 1988; Nakabeppu et al., 1988; Cohen et al., 1989; Turner et Tjian, 1989; Zerial et al., 1989). Par conséquent, de nombreux complexes homologues peuvent interagir avec le site AP1 et affecter la transcription du gène cible contenant cet élément. Ainsi, par exemple, si l'homodimère Jun-B/JunB se fixe au site TRE avec une affinité identique à celle de l'homodimère c-Jun/c-Jun, son activité transactivatrice est beaucoup plus faible. Ceci explique pourquoi Jun-B inhibe la transformation cellulaire et la transactivation par c-Jun et ne transactive pas les TRE des promoteurs des gènes de la collagénase et de *c-jun* (Chiu et al., 1989; Schütte et al., 1989). Le produit d'un épissage alternatif des transcrits *fos-B*,  $\Delta$ Fos-B est toujours capable de s'hétérodimériser avec c-Jun, mais incapable de transactiver. Il se comporte comme un mutant négatif dominant de la forme longue de Fos-B (Mumberg et al., 1991; Nakabeppu et Nathans, 1991). Ces deux exemples montrent que des complexes qui se fixent sur des séquences identiques peuvent avoir des effets antagonistes, et illustrent donc la diversité fonctionnelle générée par l'hétérodimérisation des facteurs de transcription.

Un autre niveau de diversité a été mis en évidence avec la démonstration que certaines protéines à *leucine zipper* de type *cAMP Responsive Element Binding protein*, CREB, peuvent s'hétérodimériser avec c-Jun (Benbrook et al., 1990; Ivashkiv et al., 1990; Macgregor et al., 1990; Hai et Curran, 1991). La famille des protéines CREB, appelées aussi ATF (Activating Transcription Factor) comprend une dizaine de membres qui s'homo ou s'hétérodimérisent pour se fixer sur le site CRE qui médie la réponse à l'AMPc (Lee, 1991 pour revue). Le CRE a pour séquence TGACGTCA et diffère du site AP1 (TGAC/GTCA) par l'insertion d'un seul

nucléotide entre les 2 motifs palindromiques. Le CRE peut d'ailleurs être reconnu par le complexe AP1, ce qui peut impliquer des interférences entre les voies de transduction des signaux dépendant des protéines kinases A ou C (Sassone-Corsi et al., 1990). Les hétérodimères Jun/CREB ne fixent pas les sites AP1 (TRE) mais reconnaissent le CRE *in vitro*. L'hétérodimérisation change donc dans ce cas la spécificité de la fixation à l'ADN. Il faut toutefois noter les limites de cette prodigieuse expansion de la diversité: les protéines à *leucine zipper* ne sont des protéines de moeurs légères et elles ne s'associent pas à tout partenaire pourvu de cette structure. Ainsi, ces protéines affichent à l'intérieur de leur famille une spécificité restreinte (Lamb et McKnight, 1991 pour revue). Par exemple, ATF2 ne s'associe pas avec ATF1, mais peut s'hétérodimériser avec ATF3. De même, ni les membres de la famille Fos, Jun ni ceux de la famille CREB n'interagissent pas avec les facteurs de transcription *CAAT Element Binding Protein*, C/EBP, qui pourtant se dimérisent via un *leucine zipper*. De tels complexes entre Fos/Jun et CREB dont l'existence *in vivo* n'a soit pas été établie, pourraient permettre à la cellule d'intégrer des signaux progressant par différentes voies de transduction.

## **B - Interférences transcriptionnelles. *leucine zipper* cherche *zinc finger*.**

Nous venons de passer en revue comment la formation de dimères pouvait changer la spécificité et l'affinité de la liaison à l'ADN des facteurs de transcription. Cependant nous avons pu constater que les séquences reconnues par les différents hétérodimères des membres de la famille Fos-Jun étaient très similaires *in vitro*. On peut donc se demander quels sont les paramètres qui vont déterminer la fixation de tel complexe sur un site de fixation donné et ainsi réguler l'expression du gène considéré. Il semble que des variations subtiles dans l'affinité et la spécificité de la fixation à l'ADN ne soient pas responsable de la sélectivité d'action des facteurs de transcription. Il n'existe en effet que de faibles différences entre l'affinité des facteurs de transcription d'une même famille pour un site donné. De plus certains sont capables de se lier à plusieurs sites ne présentant entre eux parfois que de faibles homologies.

L'observation des séquences régulatrices d'un gène montre souvent l'existence de nombreux éléments de régulation sur lesquelles peuvent se lier une grande variété de complexes transcriptionnels. *In vivo*, la capacité d'un facteur de transcription à se lier de manière productive sur un promoteur donné pourrait dépendre des contacts moléculaires qu'il pourrait établir avec d'autres facteurs de transcription fixés sur des séquences d'ADN adjacentes. De telles interactions ont été décrites entre les facteurs de transcription à *leucine zipper* et à doigt de zinc (*zinc finger*) de la superfamille des récepteurs nucléaires d'hormones (pour revue voir Beato, 1989; Laudet et al., 1992; Laudet et Stéhelin, 1992).

## 1 - Interférences transcriptionnelles sur des éléments de réponse composites.

Les premières évidences d'interactions entre le complexe AP1 et le récepteur aux glucocorticoïdes (GR) ont été apportées par l'étude du promoteur de la proliférine, un membre de la famille de la prolactine et de l'hormone de croissance. L'expression de la proliférine est stimulée par le traitement par des mitogènes, facteurs de croissance ou esters de phorbol (TPA). Cette induction est médiée par un élément de 31pb du promoteur (Mordaq et Linzer, 1989). L'effet du TPA est inhibé par les glucocorticoïdes. Le GR est directement responsable de cet effet et se fixe également sur cet élément de 31pb, en modifiant les complexes protéiques qui s'y fixent. Ce résultat a été approfondi par Diamond et coll. (1990) qui ont d'abord défini avec précision les séquences de fixation du GR et de AP1. Ils ont mis en évidence un site AP1 cryptique accolé à l'élément de réponse aux glucocorticoïdes, appelé GRE pour *Glucocorticoid Response Element*. Ce GRE a été appelé GRE composite puisque formé de plusieurs sites de fixation (Fig.3A). En utilisant le GRE composite, ces auteurs ont montré que l'action du GR dépendait de la nature des complexes AP1 qu'il rencontrait. Ainsi, en absence de c-Fos et de c-Jun, le GR est inactif. En présence d'homodimères c-Jun/c-Jun, la transcription de la proliférine est stimulée par les glucocorticoïdes. L'hétérodimère c-Fos/c-Jun transactive également le GRE composite, mais son action est par contre réprimée après addition de l'hormone (Diamond et al., 1990). Le complexe AP1 sélectionne donc l'activité du GR sur le GRE composite (Fig.3A). Le GR et c-Jun, produits *in vitro*, peuvent être liés par des réactifs chimiques bifonctionnels, ce qui indique une interaction directe entre ces facteurs. c-Fos et le GR ne peuvent être co-immunoprécipités qu'en présence de c-Jun. Ce type de répression entre 2 facteurs liés à l'ADN, l'un (l'hétérodimère Fos/Jun) modulant les contacts que le second (le GR) noue avec la machinerie transcriptionnelle est appelé *quenching* (Levine et Manley, 1989). Le GR n'exerce son action répressive que lorsqu'il interagit à la fois avec les séquences GRE et le complexe c-Fos/c-Jun. Si l'on adopte un point de vue finaliste, on peut dire que le *quenching* assure une spécificité et une efficacité plus importante de la régulation.

Un autre site composite a été identifié dans le promoteur du gène de l'ostéocalcine (Schüle et al., 1990b; Owen et al., 1990) (Fig.3B). L'ostéocalcine est une protéine qui fixe le calcium et qui participe à la minéralisation de la matrice extracellulaire des os. Elle est synthétisée spécifiquement par les ostéoblastes matures qui ne prolifèrent plus. L'expression de l'ostéocalcine est induite *in vitro* et *in vivo* par la vitamine D. Cet effet est médié par un site de fixation du récepteur de la vitamine D, ou VDRE (*Vitamin D Responsive Element*) dans le promoteur de l'ostéocalcine. Le VDRE répond de la même manière à l'acide rétinoïque (Schüle et al., 1990b). Cet élément peut donc fixer les récepteurs de la vitamine D (VDR) et de l'acide rétinoïque (RAR: *Retinoic Acid Receptor*). L'expression de l'ostéocalcine est par contre inhibée lorsque l'on induit la

prolifération des ostéoblastes par l'interleukine 1 ou par le TPA. La répression peut être reproduite en cotransfectant le promoteur de l'ostéocalcine avec des vecteurs d'expression *c-fos* et *c-jun* (Schüle et al., 1990b). Schüle et coll. (1990b) et Owen et coll. (1990) ont montré que l'hétérodimère c-Fos/c-Jun se fixait sur une séquence AP1 incluse dans le site VDRE, qui peut donc être aussi qualifié de composite. Selon que le VDRE composite fixe le VDR, le RAR ou AP1, des effets transcriptionnels antagonistes vont être observés (Fig.3B). Bien qu'il puisse exister d'autres mécanismes pour expliquer l'interférence entre ces récepteurs nucléaires et AP1, il semble ici que la transcription du gène de l'ostéocalcine dépende du ratio entre les facteurs en compétition pour occuper le VDRE. AP1 baisse non seulement le taux de transcription induit par les vitamines D ou A, mais aussi le taux basal. Ce dernier dépend d'une séquence CAAT localisée dans le promoteur, qui contient également un site AP1 fonctionnel (Owen et al., 1990). On peut penser que le complexe AP1 en se fixant sur des séquences recouvrant le site CAAT soit responsable de la répression de l'activité basale du promoteur de l'ostéocalcine, en empêchant la fixation d'un facteur activateur. Cet exemple illustre comment AP1, associé à la prolifération cellulaire, peut supprimer le phénotype différencié en réprimant la transcription de gènes de différenciation.

La caractéristique principale de ces exemples d'interférence entre AP1 et récepteurs nucléaires d'hormones est la présence d'une séquence particulière, composite qui est capable de s'associer avec des facteurs appartenant à ces deux familles. Cependant, il existe des mécanismes plus généraux d'interférences qui ne dépendent pas de la fixation à l'ADN.

## 2 - Interférences transcriptionnelles indépendantes de la fixation à l'ADN.

Ce type d'interférence a été mis en évidence pour la première fois sur le promoteur de la collagénase 1 (Fig.3C, D) (Jonat et al., 1990; Schüle et al., 1990a; Yang-Yen et al., 1990). La collagénase est une enzyme de la famille des métalloprotéases, impliquée dans la dégradation du collagène de type 1,2 et 3 (Matrisian et al., 1990). Cette enzyme est importante pour de nombreux processus biologiques et pathologiques impliquant un remodelage de la matrice extracellulaire. L'expression de la collagénase est stimulée par de nombreux médiateurs de l'inflammation comme l'interleukine 1 et le facteur nécrosant des tumeurs  $\alpha$ , mais est réprimée par les glucocorticoïdes (Brenner et al., 1989; Lafyatis et al., 1990). Le site AP1 présent dans le promoteur de ce gène est responsable de la stimulation par le TPA (Angel et al., 1987) mais aussi de la répression par les glucocorticoïdes (Jonat et al., 1990; Schüle et al., 1990a; Yang-Yen et al., 1990). Le GR activé par son ligand est indispensable à la répression. La concentration en hormone requise pour inhiber l'activité AP1 est de  $10^{-9}$ M, c'est à dire 10 fois inférieure à ce qui est nécessaire pour activer la fonction transactivatrice du récepteur. La répression n'implique ni une baisse de l'expression de *c-jun* et de *c-fos*, ni de nouvelle synthèse protéique, ni la fixation à l'ADN du GR. Le GR peut

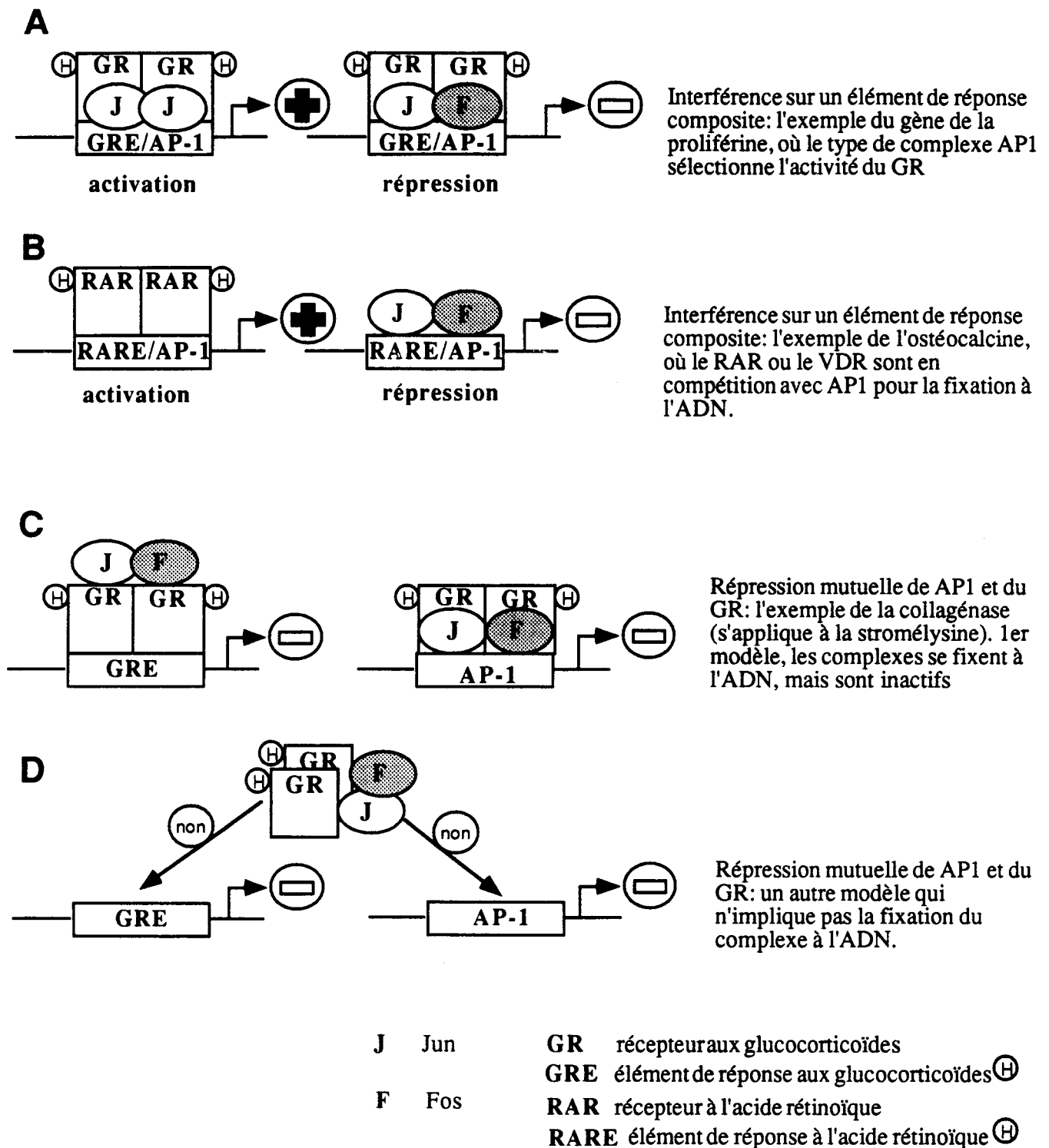


inhiber l'activité de c-Jun et de c-Fos des sites AP1 autres que celui de la collagénase (Lucibello et al., 1990; Schüle et al., 1990a). La réciproque est également valable puisque c-Fos et c-Jun, sans se fixer à l'ADN, inhibent la transactivation par le GR sur les sites GRE du LTR du virus MMTV (*Mouse Mammary Tumor Virus*) (Jonat et al., 1990; Schüle et al., 1990a; Yang-Yen et al., 1990; Lucibello et al., 1990). L'ensemble de ces résultats suggère que l'interférence entre ces facteurs de transcription impliquent des interactions protéine-protéine, directe ou indirecte (via un troisième larron).

Des mutants de délétion de ces différents facteurs ont permis de définir les domaines protéiques nécessaires à la répression. Le domaine de fixation à l'ADN du GR, est indispensable bien que la fixation à l'ADN ne soit pas requise dans ce système (Schüle et al., 1990a; Yang-Yen et al., 1990; Lucibello et al., 1990; Touray et al., 1991). Cette région, conservée dans la famille des récepteurs nucléaires d'hormones, comprend en particulier deux structures dites en "doigt de zinc", la chaîne peptidique s'organisant en boucle maintenue par un atome de zinc chelaté par 4 cystéines (Forman et Samuels, 1990). Bien que les "doigts de zinc" des récepteurs aux glucocorticoïdes, à l'acide rétinoïque ou aux hormones thyroïdiennes soient capables de fixer des séquences d'ADN différentes, ils sont fonctionnellement interchangeable pour réprimer l'action d'AP1 (Schüle et al., 1990a). De même, les récepteurs à l'acide rétinoïque (RAR $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) ou à l'hormone thyroïdienne (THR $\alpha$ ) peuvent inhiber la transactivation par AP1 du gène de la collagénase 1 ou de la stromélysine, une autre métalloprotéase (Nicholson et al., 1990; Desbois et al., 1991; Schüle et al., 1991; Zhang et al., 1991). La répression médiée par le domaine de fixation à l'ADN semble être modulée par le domaine carboxy-terminal qui fixe l'hormone (Schüle et al., 1991). Le meilleur exemple à cet égard est peut-être celui de v-Erb-A, la forme oncogénique du THR $\alpha$  du rétrovirus AEV (*Avian Erythroblastosis Virus*), qui ne fixe pas les hormones thyroïdiennes et qui est incapable de réprimer AP1 (Desbois et al., 1991).

Une démarche parallèle a permis d'identifier le *leucine zipper* de c-Jun comme le composant indispensable pour l'interférence avec le GR (Schüle et al., 1990a; Yang-Yen et al., 1990). c-Fos, en association avec c-Jun semble également interagir avec le GR (Jonat et al., 1990; Lucibello et al., 1990; Yang-Yen et al., 1990). Le domaine responsable de la répression de la réponse aux glucocorticoïdes ne correspond pas au *leucine zipper* mais à une région amino-terminale sans équivalent dans FosB et Fra-1 (Lucibello et al., 1990). D'ailleurs, ces auteurs ont montré que FosB ne pouvait pas réprimer la transactivation par le GR.

Les mécanismes précis gouvernant la répression mutuelle de AP1 et du GR ne sont pas encore connus. Le plus simple impliquerait la formation d'hétérodimères GR/c-Jun ou GR/c-Fos qui ne fixeraient plus les sites GRE ou AP1 (Fig.3D). Une inhibition réciproque de la fixation à l'ADN a en effet été décrite (Schüle et al., 1990a, 1991; Yang-Yen et al., 1990). Une interaction directe entre c-Jun, c-Fos et le GR produits *in vitro* a été également observée et pourrait être responsable de la répression (Diamond et al., 1990; Jonat et al., 1990; Yang-Yen et al., 1990;



**figure 3** Modèles d'interférences entre le récepteur aux glucocorticoïdes et les protéines Fos/Jun.

Touray et al., 1991). Le groupe de P. Herrlich met en cause ce modèle (Fig.3C) et démontre par une technique d'empreintes sur l'ADN génomique que le GR activé par son ligand n'altère pas l'occupation du site AP1 *in vitro* et *in vivo* (Jonat et al., 1990; König et al., 1992). Ces auteurs ne peuvent toutefois pas exclure qu'un complexe AP1 non transactivateur occupe secondairement le TRE libéré par l'hétérodimère Fos/Jun après interaction avec le GR. Ils privilégient néanmoins un modèle où le GR interfère avec les propriétés transactivatrices de AP1 (Fos/Jun) par contacts directs sans abolir la fixation au TRE (König et al., 1992).

Je n'ai présenté jusqu'à présent que des exemples d'interférences négatives entre le complexe AP1 et les récepteurs nucléaires d'hormones. Un cas de coopération positive a été décrit entre le récepteur aux oestrogènes (ER) et AP1 sur le promoteur de l'ovalbumine de poulet (Gaub et al., 1990). La fixation du complexe AP1 à sa séquence cible est indispensable, alors que l'ER n'a pas besoin de s'associer à l'ADN. Un mutant de l'ER pour la fixation à l'ADN est d'ailleurs toujours capable de coopérer avec c-Jun et c-Fos. Plusieurs hypothèses permettent d'expliquer cette interférence positive. Une interaction directe est possible comme aussi un mécanisme indirect où l'ER s'associe et inactive un facteur inhibiteur d'AP1. Un bon candidat pourrait être IP1 (*Inhibitory Protein 1*), un facteur caractérisé récemment qui s'associe avec les protéines Fos et Jun et qui inhibe leur fixation à l'ADN (Auwerx et Sassone-Corsi, 1991, 1992).

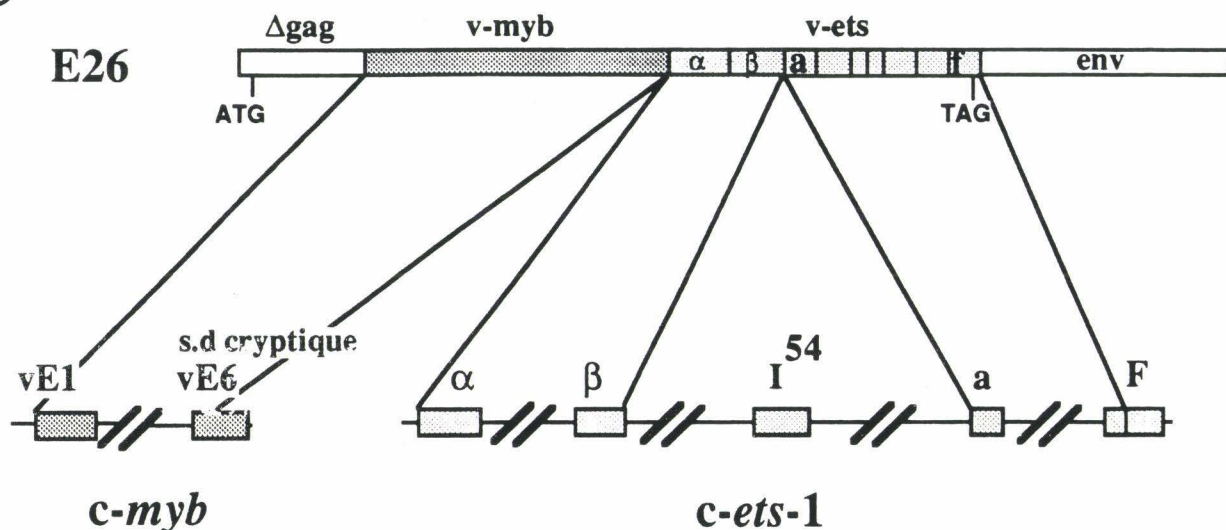
L'ensemble de ces données sur les facteurs de transcription à *leucine zipper* et à *zinc finger*, que je viens de présenter (Fig.3), donne une bonne idée de l'importance de la combinatoire dans la genèse de la diversité des contrôles transcriptionnels. Ces études montrent comment l'activité d'un facteur de transcription peut fluctuer en fonction du contexte du promoteur et de la cellule. Du point de vue du gène cible, ce type d'interférence assure un contrôle précis de la transcription qui intègre les différents messages en provenance de l'extérieur, facteurs de croissance, hormones. Bien que les modèles proposés doivent être encore étayés, ils sont très satisfaisants biologiquement. On comprend par exemple pourquoi les glucocorticoïdes sont des agents thérapeutiques de l'arthrite rhumatoïde, une maladie caractérisée par une dégradation du cartilage et des tendons due à une production trop importante de métalloprotéases.

Dans la suite de ce mémoire je m'interrogerai sur l'existence de telles interférences entre les facteurs de transcription c-Myb et c-Ets-1. L'identification des produits des proto-oncogènes c-Myb et c-Ets-1 comme étant des facteurs de transcription est tout à fait récente (1989 pour Myb et 1990 pour Ets). Ceci explique peut-être pourquoi ces facteurs sont bien moins caractérisés du point de vue de leur fonction biochimique que les membres de la famille Fos/Jun. Le fait qu'ils ne semblent pas s'homodimériser ou interagir fortement avec d'autres facteurs de transcription a sans doute aussi ralenti l'étude de possibles interférences. La nature nous a cependant pourvu d'un merveilleux outil pour révéler une coopération éventuelle entre c-Myb et c-Ets-1. Cette "pierre de Rosette pour l'étude sémantique de ces facteurs de transcription" (Vandenbunder et Stéhelin, 1992)

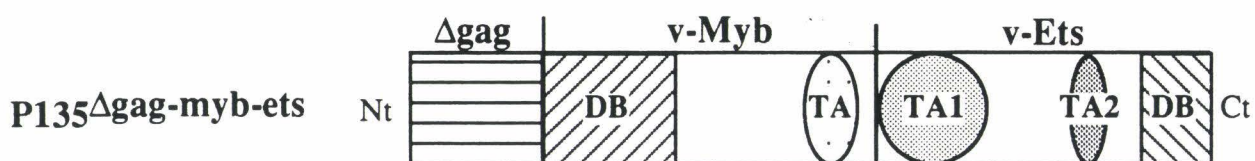
est représentée par le rétrovirus E26 qui a transduit dans son génôme des formes activés, oncogéniques de *c-myb* et de *c-ets-1*.

**II - LE RETROVIRUS LEUCEMOGENE E26.**

(A)



(B)



**Figure : 4**

A : Structure du rétrovirus E26 et genèse de la fusion entre *v-myb* et *v-ets* par épissage anormal entre un site donneur (s.d) d'épissage cryptique dans l'exon vE6 de *c-myb* et le site accepteur de l'exon  $\alpha$  de *c-ets-1*.

B : Domaines fonctionnels de la P135 $\Delta$ gag-myb-ets, définis par analogie avec ceux de *c-Myb* et de *c-Ets-1*. DB : domaine de fixation à l'ADN, TA, domaine transactivateur.

## II - LE RETROVIRUS LEUCEMOGENE E26.

### A - Structure du rétrovirus E26

Le rétrovirus E26 fait partie du groupe des virus leucémogènes aviaires défectifs pour leur réplication. Il a donc besoin d'un virus auxiliaire dit *helper* pour se propager. Ce virus *helper*, compétent pour la réplication apporte aux virus défectifs les produits des gènes *gag*, *pol*, *env* codant respectivement pour les protéines de la capsid, la rétrotranscriptase nécessaire à la synthèse de l'ARN viral génomique, et les protéines de l'enveloppe virale (RNA Tumor Viruses, 1982, 1985).

Dans le rétrovirus E26 une partie de ces gènes est remplacée par deux séquences d'origine cellulaire: les oncogènes *v-myb* (Roussel et al., 1979) et *v-ets* (LePrince et al., 1983a; Nunn et al., 1983) (Fig.4A). Ces oncogènes *v-myb* et *v-ets* sont responsables des propriétés transformantes du virus et dérivent des gènes cellulaires normaux, *c-myb* et *c-ets-1*, appelés proto-oncogènes ou *c-onc*. L'ADN proviral de E26 contient une partie du gène *gag* ( $\Delta gag$ ), les deux oncogènes (*v-myb* et *v-ets*), une partie du gène *env* ( $\Delta env$ ), le tout encadré par deux LTRs. La protéine codée par le virus E26 est une protéine de fusion de poids moléculaire apparent 135 kD, la P135 $\Delta gag$ -*myb-ets*, localisée dans le noyau (Beug et al., 1982; Bister et al., 1982; Boyle et al., 1984, Klempnauer et al., 1984) (Fig.4).

Par analogie avec la structure des proto-oncogènes *c-myb* et *c-ets-1* qui codent pour des facteurs de transcription (voir plus loin les excellentes revues sur *c-myb*, Lüscher and Eisenman, 1991b; et sur *c-ets-1*, MacLeod et al., 1992), plusieurs modules fonctionnels peuvent être définis dans la P135 $\Delta gag$ -*myb-ets*. Le domaine de fixation à l'ADN de *v-myb* est orienté vers l'extrémité amino-terminale et fusionné aux déterminants codés par le gène *gag*. Le domaine de fixation à l'ADN de *v-ets* est situé à l'extrémité carboxy-terminale, les domaines transactivateurs de *v-myb* et de *v-ets* étant situés vers le centre (Klempnauer et Sippel, 1987; Weston et Bishop, 1989; Nye et al., 1992, Schneikert et al., 1992) (Fig.4B, 6, 13). La fonction de facteur de transcription de la P135 $\Delta gag$ -*myb-ets* n'a cependant pas été étudiée en détail. On sait simplement qu'elle est capable de se fixer au promoteur du gène *mim-1* par le domaine responsable de la fixation à l'ADN de *v-Myb* et de transactiver l'expression de ce gène (Ness et al., 1989).

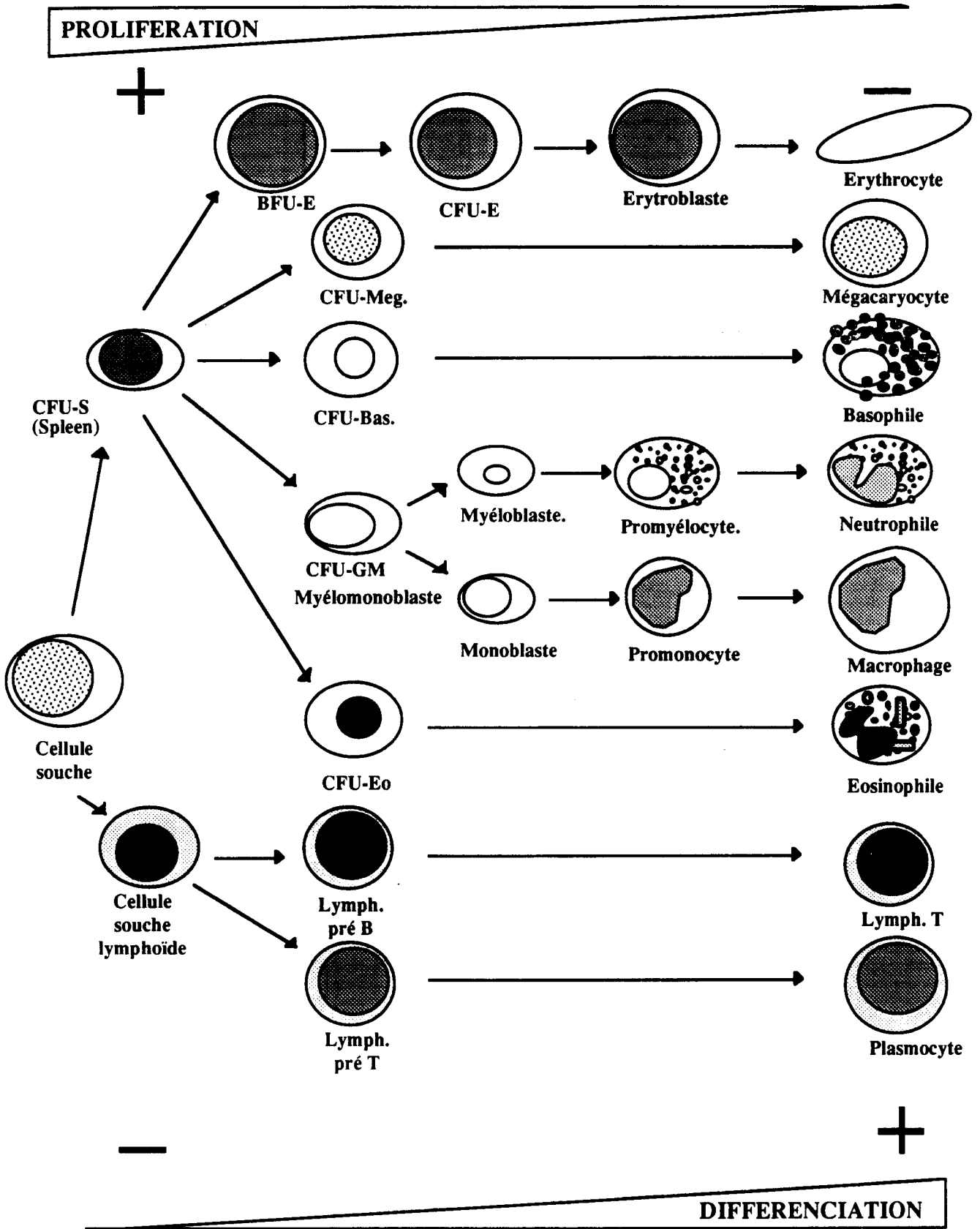


Figure 5 : schéma indicateur des différentes voies de différenciation des cellules hématopoïétiques de souris. (D'après Dexter, 1989)



## **B - Phénotype des cellules hématopoïétiques transformées par E26**

### **1 - Chez le poulet**

Le rétrovirus E26 a été isolé en Bulgarie en 1962 dans un poulet de basse-cour en recherchant des virus ayant un pouvoir leucémogène très élevé. Après plusieurs tours d'infection, les animaux développant le plus rapidement des leucémies étaient sélectionnés (Ivanov et al., 1962). E26 est particulièrement efficace puisque les poulets infectés développent 3 à 4 semaines après l'infection une leucémie mixte érythroïde et myéloïde à prédominance érythroïde (Sotirov, 1981; Moscovici et al., 1981; Radke et al., 1982; Moscovici et al., 1983). De même, après infection *in vitro* de cellules de moelle osseuse ou de blastoderme d'embryon de poulet à 2 jours d'incubation (particulièrement riche en précurseurs hématopoïétiques), trois types de colonies de cellules transformées sont obtenues: érythroïdes, myéloïdes et mixtes, érythroïdes et myéloïdes (Moscovici et al., 1983). Ceci suggère que le rétrovirus E26 a pour cellules cibles des progéniteurs des lignées érythroïdes et myéloïdes et des progéniteurs bipotents, communs à ces deux lignées. La détection d'un site d'intégration unique du génome de E26 dans certaines de ces colonies mixtes a apporté la preuve de leur origine clonale, les rétrovirus s'intégrant au hasard dans le génome de la cellule hôte, à raison d'un seul virus par cellule en général (Graf et al., 1992). E26 est le seul parmi les 12 souches de virus leucémogènes aviaires ou mammifères à affecter plus d'une lignée hématopoïétique (pour revue voir Pierce, 1989).

La possibilité de maintenir en culture les cellules transformées par E26 et d'induire leur différenciation en fait un outil de choix pour étudier les mécanismes moléculaires de la détermination au cours de l'hématopoïèse. Cependant, son utilisation nécessitait au préalable une description plus précise du phénotype des cellules transformées. Les cellules myéloïdes transformées par E26 ressemblent à des précurseurs myélomonocytiques (Beug et al., 1982; Introna et al., 1990). Leur maintien en culture est dépendant d'un facteur de croissance spécifique de la lignée myélomonocytique: le cMGF (pour chicken Myelomonocytic Growth Factor), une cytokine qui présente des analogies avec l'interleukine 6 et le G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor) des mammifères (Leutz et al., 1989). Les cellules "érythroïdes" immatures transformées par E26, appelées cellules MEP (pour Myb Ets Progenitor) sont très particulières. T. Graf et coll. (1992) ont pu montrer que les cellules MEP étaient en fait des progéniteurs hématopoïétiques multipotents, capables de se différencier dans trois lignées hématopoïétiques différentes. Les MEP sont reconnus par des anticorps monoclonaux spécifiques de la lignée érythroïde / thrombocytaire et sont capables de se différencier spontanément en cellules présentant des caractéristiques d'érythrocyte: expression de l'histone H5, de l'hémoglobine, du facteur de transcription GATA-1. Seule leur morphologie terminale qui ne ressemble pas à la forme lenticulaire des érythrocytes matures adultes, suggère une différenciation aberrante (Radke et al.,

1982, Metz and Graf, 1991a; Graf et al., 1992). Les MEP peuvent être aussi induits à se différencier en cellules myélomonocytiques et en éosinophiles par des esters de phorbol ou par des oncogènes de type tyrosine kinase (*v-erb-B*, *v-sea*, *v-src*), sérine / thréonine kinase (*v-mil*) ou par *v-Ha-ras*. La différenciation des cellules myélomonocytiques peut être poursuivie jusqu'au stade promyélocyte par traitement à l'acide rétinoïque, ou jusqu'au stade macrophage si *v-myb* est inactivé par une mutation thermosensible (Graf et al., 1992). Un nouveau type cellulaire, qui apparaît dans des cultures de moelle osseuse transformée par E26 en présence de c-MGF, a été caractérisé récemment (Domenget et al., 1992). Ces cellules ressemblent par certains critères morphologiques et biochimiques à des granulocytes basophiles. Bien que ce dernier point reste à confirmer, E26 pourrait avoir pour cible un précurseur très immature capable de se différencier vers toutes les voies hématopoïétiques hormis la voie lymphoïde.

## 2) Chez la souris

Il est intéressant de souligner que la  $P135\Delta gag-myb-ets$  n'a pas les mêmes propriétés biologiques sur des cellules hématopoïétiques de souris. Un modèle murin de E26: ME26 a été construit par le groupe de D.G. Blair en insérant les séquences aviaires  $\Delta gag-myb-ets$  dans un vecteur rétroviral dérivé du virus leucémogène murin d'Abelson. ME26 exprime la  $P135\Delta gag-myb-ets$  aviaire et provoque des leucémies érythroïdes et myéloïdes mais aussi des lymphomes après un temps de latence de 2 à 4 mois, lorsqu'il est injecté à des souriceaux nouveau-nés. Dans ces animaux, y compris ceux atteints d'un lymphome, des sites d'intégration de ME26 ont été mis en évidence, ce qui suggère une relation causale entre le virus et les maladies développées par ces souris (Yuan et al., 1989). Les cellules érythroïdes transformées par ME26 sont très immatures, mais elles n'ont pas été décrites comme multipotentes. Elles ne peuvent être induites à se différencier en érythrocytes, et prolifèrent rapidement en présence d'érythropoïétine. ME26 est capable d'induire la dépendance en érythropoïétine de ces cellules transformées mais aussi de cellules myéloïdes FDC-P2 en augmentant l'expression du gène codant pour le récepteur à l'érythropoïétine (Ruscetti et al., 1992; Aurigemma et al., 1992). Cet effet serait médié par le facteur de transcription GATA-1, spécifique des cellules érythroïdes. Par un test de cotransfection dans des cellules NIH3T3, cette équipe a pu montrer que la  $P135\Delta gag-myb-ets$  est capable de transactiver le promoteur du gène GATA-1, dont le produit transactive à son tour le promoteur du gène du récepteur à l'érythropoïétine. Un effet direct de la  $P135\Delta gag-myb-ets$  sur le promoteur de GATA-1 reste encore à démontrer (Aurigemma et al., 1992).

## **C - Effet de E26 sur les fibroblastes et les cellules de neurorétine.**

Le rétrovirus E26 ne provoque pas de tumeurs solides chez l'animal. *In vitro*, il est incapable de transformer des fibroblastes embryonnaires de poulet (Moscovici et al., 1975; Graf et al., 1979; Bister et al., 1982). Les fibroblastes infectés par E26 ne présentent aucun des caractères classiquement associés à la transformation (morphologie, croissance en milieu semi-solide, incorporation d'hexose) (Jurdic et al., 1987). Néanmoins, E26 a un effet mitogène sur ces fibroblastes. Les fibroblastes infectés par E26 commencent à pousser sans temps de latence dans un milieu supplémenté en sérum, et ont une durée de vie plus longue que des fibroblastes non infectés. De plus, ces cellules peuvent pousser en basse concentration de sérum lorsqu'elles sont ensemencées à faible densité. Il faut souligner que cet effet est obtenu avec une expression particulièrement faible de E26 dans les fibroblastes, puisqu'on n'a pu y détecter que l'ARN viral et pas la P135 $\Delta$ gag-myb-ets (Jurdic et al., 1987). Des mutants de délétion de E26 ont permis de montrer qu'une coopération entre les oncogènes *v-myb* et *v-ets* est nécessaire pour expliquer l'effet mitogène de E26 sur les fibroblastes embryonnaires de poulet. L'intégrité de la région *v-myb* de la P135 $\Delta$ gag-myb-ets doit être maintenue, cependant le domaine de fixation à l'ADN de *v-ets* est dispensable. L'analyse des mutants de délétion de *v-ets* est assez délicate, ces mutants étant capables de maintenir, d'augmenter et même d'abolir l'effet mitogène de E26 (Ravel-Chapuis et al., 1991).

Le virus murin ME26 induit également une réponse proliférative des fibroblastes NIH3T3 infectés; ceux-ci forment des colonies en agar et même des foyers (certes discrets!) de cellules morphologiquement transformées. Néanmoins, ces cellules ne sont pas totalement transformées, puisqu'incapables de former des tumeurs chez les souris *nude*. La délétion de la moitié carboxy-terminale de *v-ets* annule l'effet prolifératif de ME26 (Yuan et al., 1989).

Des résultats similaires ont été obtenus dans un autre système cellulaire, celui des neurorétines embryonnaires. La P135 $\Delta$ gag-myb-ets n'est pas capable de transformer les cellules de neurorétine, mais elle induit leur prolifération (Amouyel et al., 1989). En présence de bFGF (*Basic Fibroblast Growth Factor*), ces cellules prolifèrent plus activement. Elles sont capables de former des colonies en milieu semi-solide et acquièrent ainsi un caractère de cellules transformées. La capacité de répondre à ce facteur de croissance est médiée par *v-Myb*. La présence de *v-ets*, leur confère un avantage prolifératif par rapport à des cellules infectées par un virus ne portant que *v-myb* (Garrido et al., 1992a, b).

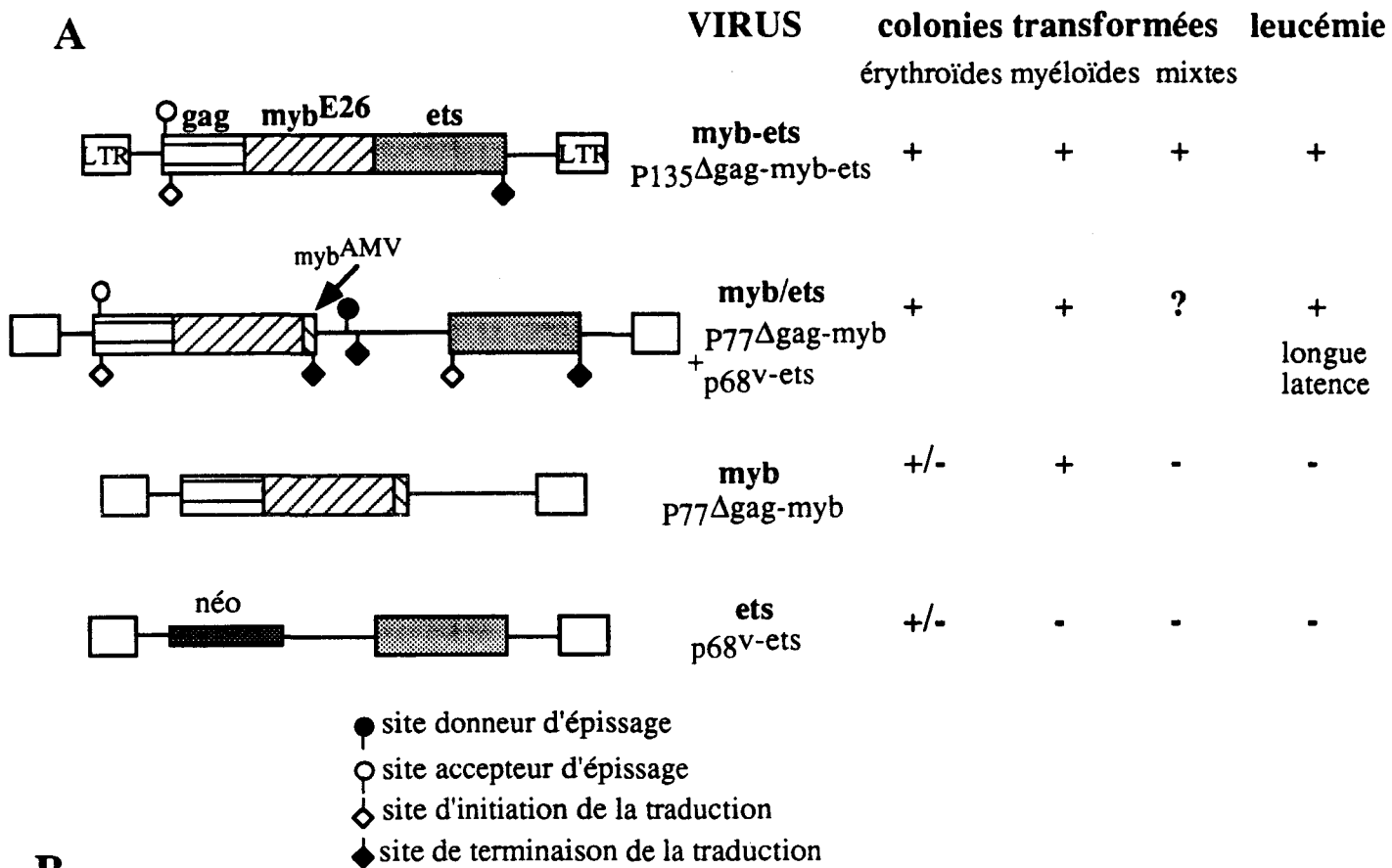
Ces études confirment que le rétrovirus E26 ne transforme que des cellules hématopoïétiques et ne lui concèdent qu'un rôle mitogène sur les fibroblastes et les cellules de neurorétine. L'utilisation de mutants de délétion laisse déjà entrevoir la nature délicieusement complexe de la P135 $\Delta$ gag-myb-ets, dont la fonction semble régie par un faisceau de coopérations entre les différents domaines. Clairement, la compréhension des rôles respectifs de *v-myb* et de *v-*

*ets* va nécessiter des expérimentations plus fines impliquant des mutants ponctuels de E26 ou des chimères entre les séquences virales et cellulaires. Le système des cellules hématopoïétiques mis en oeuvre par T. Graf à l'EMBL semble tout indiqué pour tester ces mutants. Il est, sans aucun doute, le plus riche en paramètres à analyser, et il va donc permettre d'étudier des variations subtiles dans le phénotype des cellules transformées par les différents mutants de la P135 $\Delta$ *gag-myb-ets*.

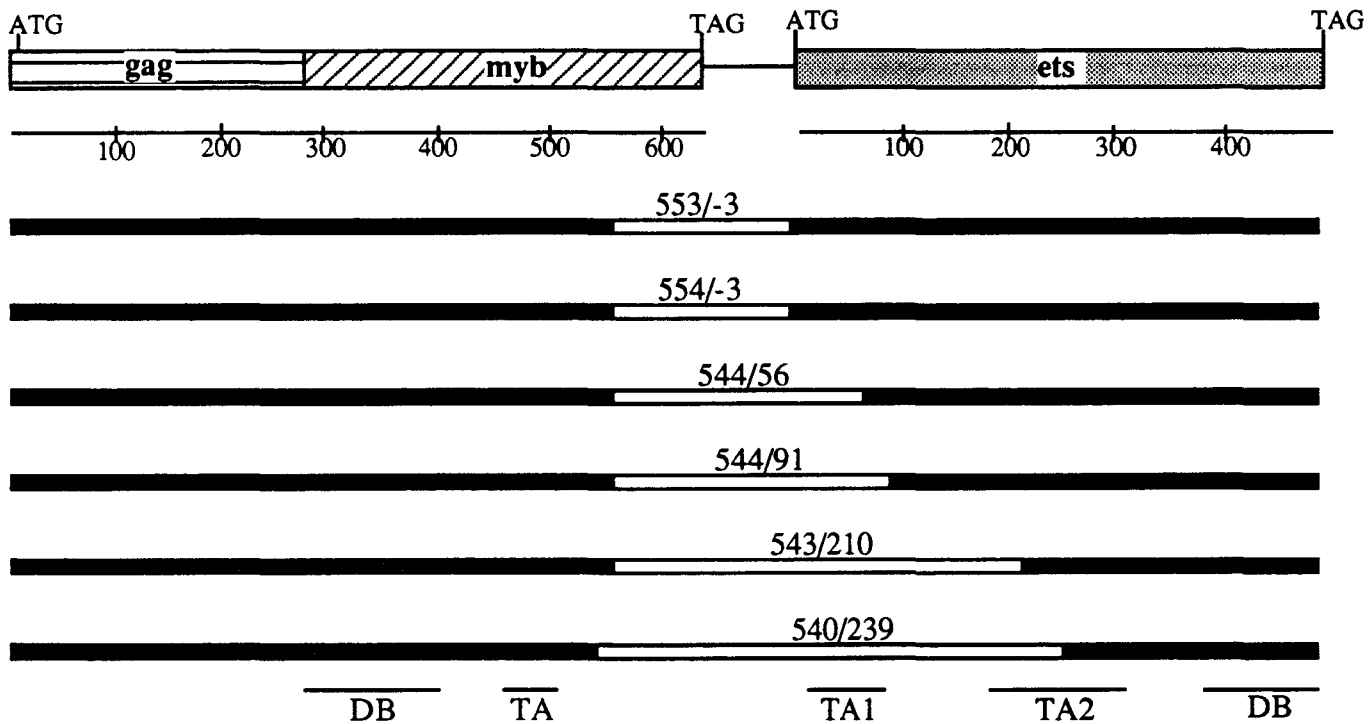
### **D - Contributions respectives de v-myb et v-ets aux propriétés biologiques de E26.**

En schématisant beaucoup, le pouvoir transformant de E26 sur les cellules myéloïdes peut être attribué à la partie Myb de la P135 $\Delta$ *gag-myb-ets*. La capacité à transformer les cellules érythroïdes serait médiée par la partie Ets. Plusieurs observations permettent d'étayer cette hypothèse. Tout d'abord, le rétrovirus aviaire AMV (Avian Myeloblastosis Virus) qui n'a transduit que l' oncogène *v-myb*, ne transforme que des cellules myéloïdes *in vitro* et *in vivo* (Moscovici, 1975, Durban et Boettiger, 1981, Introna et al., 1990). De même, des mutants de E26 délétés de *v-ets* sont toujours capables de transformer des cellules myéloïdes, mais sont désormais incapables de transformer des cellules érythroïdes *in vitro* ou d'induire des érythroleucémies dans les poulets infectés (Nunn et Hunter, 1989; Domenget et al., 1992). Alternativement, la délétion du domaine de fixation à l'ADN de *v-myb* entraîne la perte de la capacité à transformer des cellules myéloïdes, mais elle n'a pas d'effet sur la transformation érythroïde. Enfin, des résultats obtenus avec des mutants thermosensibles de E26 viennent conforter ce schéma simple. Ainsi, *ts* 21E26 un mutant ponctuel de E26 dans le domaine de fixation à l'ADN de Myb (Frykberg et al., 1988) est thermosensible pour la transformation des cellules myéloïdes; à 42°C, température non permissive, les myéloblastes transformés cessent de proliférer et acquièrent des caractéristiques de macrophages. Par contre à 42°C, comme à 37°C, *ts* 21E26 est capable de transformer les cellules érythroïdes et a toujours un effet mitogène sur les fibroblastes (Beug et al., 1984). Le virus *ts* 1.1E26 est thermosensible pour la transformation érythroïde et porte une mutation dans le domaine de fixation à l'ADN de Ets. Les cellules myéloïdes transformées par *ts* 1.1E26 sont insensibles (ne se différencient pas) à un passage de la température permissive (37°C) à la température non-permissive (42°C) (Golay et al., 1988). La délétion du domaine de fixation à l'ADN de *v-Ets* inhibe totalement la capacité de E26 à transformer des cellules érythroïdes (Domenget et al., 1992).

Cependant le concept simpliste, "Myb comme myéloïde et Ets comme érythroïde" est battu en brèche par certaines évidences montrant qu'une coopération entre *v-myb* et *v-ets* est nécessaire pour expliquer les propriétés biologiques de E26. Ainsi, l'effet des mutants thermosensibles de E26 n'est pas aussi tranché. *ts* 21E26 induit certes des érythroleucémies, mais avec un temps de latence supérieur à celles induites par E26 sauvage (Beug et al., 1984). De plus, l'introduction de la



**B**



**Figure 6 :**

**6A** Structure des différents virus recombinants construits par Metz et Graf, 1991a, b et leurs effets sur la transformation des cellules hématopoïétiques.

**6B** Structure du virus myb/ets parental et de 5 variants isolés du sang de poulets leucémiques (DB: domaine de fixation à l'ADN, TA: domaine transactivateur).

mutation *ts* 1.1 dans le domaine de fixation à l'ADN de v-Ets change le phénotype des cellules myéloïdes transformées. Alors que des myéloblastes immatures sont transformés par E26 sauvage, les cellules transformées par *ts* 1.1E26 ressemblent plutôt à des promyélocytes, précurseurs de granulocytes neutrophiles (appelés aussi hétérophiles selon la terminologie aviaire) (Golay et al., 1988).

La preuve suprême de la coopération entre *v-myb* et *v-ets* vient d'être brillamment apportée par T. Metz et T. Graf qui ont construit un ensemble de virus recombinants (Fig.6A) exprimant soit Myb ou Ets seuls, soit Myb et Ets séparés dans un même virus, soit Myb et Ets fusionnés dans le contexte de la P135 $\Delta$ *gag-myb-ets* (Metz et Graf, 1991a, 1991b). La capacité de ces virus à transformer *in vitro* des cellules érythroïdes et myéloïdes provenant de moelle osseuse ou de blastoderme d'embryons de poulet de 2 jours et leur leucémogénicité *in vivo* ont été testées. Tous les virus exprimant la protéine v-Myb seule (virus myb) ou coexprimant v-Myb et v-Ets, séparés (virus myb/ets) ou fusionnés (virus myb-ets) sont capables de transformer des cellules myéloïdes. Néanmoins, les cellules myéloïdes transformées par les virus myb, myb/ets, exprimant la protéine v-Myb séparément, possèdent un grand nombre de granules dans leur cytoplasme, ressemblent à des promyélocytes et sont donc plus matures comparés aux myéloblastes transformés par la protéine de fusion P135 $\Delta$ *gag-myb-ets*. Les virus recombinants n'exprimant que la protéine v-Ets (virus ets) sont incapables de transformer les cellules myéloïdes. Dans la lignée érythroïde, les virus myb, ets, myb/ets génèrent des colonies de cellules transformées relativement matures, présentant un taux élevé de différenciation spontanée. Par exemple, plus de 70% d'entre elles expriment de l'hémoglobine, contre 5% pour les cellules transformées par le virus myb-ets. Les capacités d'autorenouvellement sont plus élevées pour les cellules transformées par des virus exprimant v-Myb et v-Ets par rapport aux cellules transformées par un seul oncogène (temps de doublement de 20 à 30h contre 60 à 80h). La population de cellules transformées par les virus myb ou ets est capable de doubler de 10 à 15 fois contre 30 fois pour le virus myb/ets et 40 fois pour le virus myb-ets (Metz et Graf, 1991a).

Les tests de leucémogénèse *in vivo* sont encore plus discriminatoires. En effet, les virus exprimant les protéines v-Myb et v-Ets seules ne sont pas leucémogènes (Fig.6A). Les virus coexprimant v-Myb et v-Ets séparément (virus Myb/Ets) induisent des leucémies érythroïdes avec une plus faible incidence et une période de latence plus longue que E26 sauvage. Après analyse, le sang de tous les poulets leucémiques contient des variants du virus myb/ets initial. Ces variants possèdent les mêmes caractéristiques biologiques que E26. Leur caractérisation moléculaire (Fig.6B) a montré qu'ils codaient de nouveau pour des protéines de fusion Myb-Ets, générées par des délétions des parties C-terminales et N-terminales des domaines Myb et Ets respectivement, puis par fusion de ces 2 domaines (Metz et Graf, 1991b)! En conclusion, l'expression de *v-myb* et *v-ets* sous la forme d'une protéine de fusion Myb-Ets est indispensable pour que les virus correspondants soient leucémogènes. Les virus qui expriment les protéines Myb et Ets séparément

ne causent pas de leucémies, bien que ces deux protéines soient capables de coopérer dans les tests de transformation *in vitro*. Ces recombinants peuvent générer des variants leucémogènes codant pour de nouvelles protéines de fusion Myb-Ets. Tous les virus leucémogènes ont le pouvoir de transformer des cellules multipotentes différenciables vers les lignées érythroïde, myélomonocytaire et éosinophile. Les virus codants pour des protéines Myb et Ets seules ou séparées transforment des cellules érythroïdes plus matures, déjà engagées vers cette voie de différenciation.

L'obtention de nouvelles protéines de fusion Myb-Ets aux propriétés biologiques identiques à celles de la P135 $\Delta$ *gag-myb-ets* a permis de déterminer les domaines dispensables à la transformation. Les 5 protéines recombinantes contiennent les domaines de fixation à l'ADN de v-Myb et de v-Ets en C-terminal et en N-terminal de la P135 $\Delta$ *gag-myb-ets* respectivement ainsi que de domaine activateur de la transcription de v-Myb au centre de la molécule. Par contre, dans certains de ces variants, le domaine transactivateur de v-Ets est totalement délété, montrant que ce dernier est dispensable à l'activité transformante de E26 (Metz et Graf, 1991b) (Fig.6B). Le minimum requis pour l'induction de leucémies semble donc être la présence dans une seule molécule des domaines de fixation à l'ADN de v-Myb et de v-Ets ainsi que le domaine transactivateur de v-Myb. La définition des domaines importants de la P135 $\Delta$ *gag-myb-ets* pour la transformation n'est pas si simple lorsqu'elle est entreprise de manière systématique et n'est pas guidée par des contingences de structure de virus et de recombinaison. Ainsi, il semble que le domaine transactivateur de v-Myb et celui de v-Ets soient interchangeable puisque la délétion de ce domaine dans v-Myb ne perturbe pas la transformation myéloïde lorsque v-Ets est intact (Domenget et al., 1992).

Une question reste sans réponse à ce stade: Pourquoi la fusion de v-Myb et de v-Ets est elle indispensable aux propriétés biologiques de E26? Il est tentant de spéculer que la fusion de v-Myb et de v-Ets stabilise un complexe qui se forme transitoirement dans des conditions physiologiques entre les protéines c-Myb et c-Ets-1. Pour évaluer l'existence d'un tel complexe, et pour comprendre le rôle des protéines c-Myb et c-Ets-1, il était essentiel de savoir dans quelles cellules et dans quelles conditions s'expriment ces deux proto-oncogènes. Mais d'abord, une description détaillée de leur structure et de leur fonction s'impose.

### **III - LE PROTO-ONCOGENE C-MYB.**



### III - LE PROTO-ONCOGENE C-MYB.

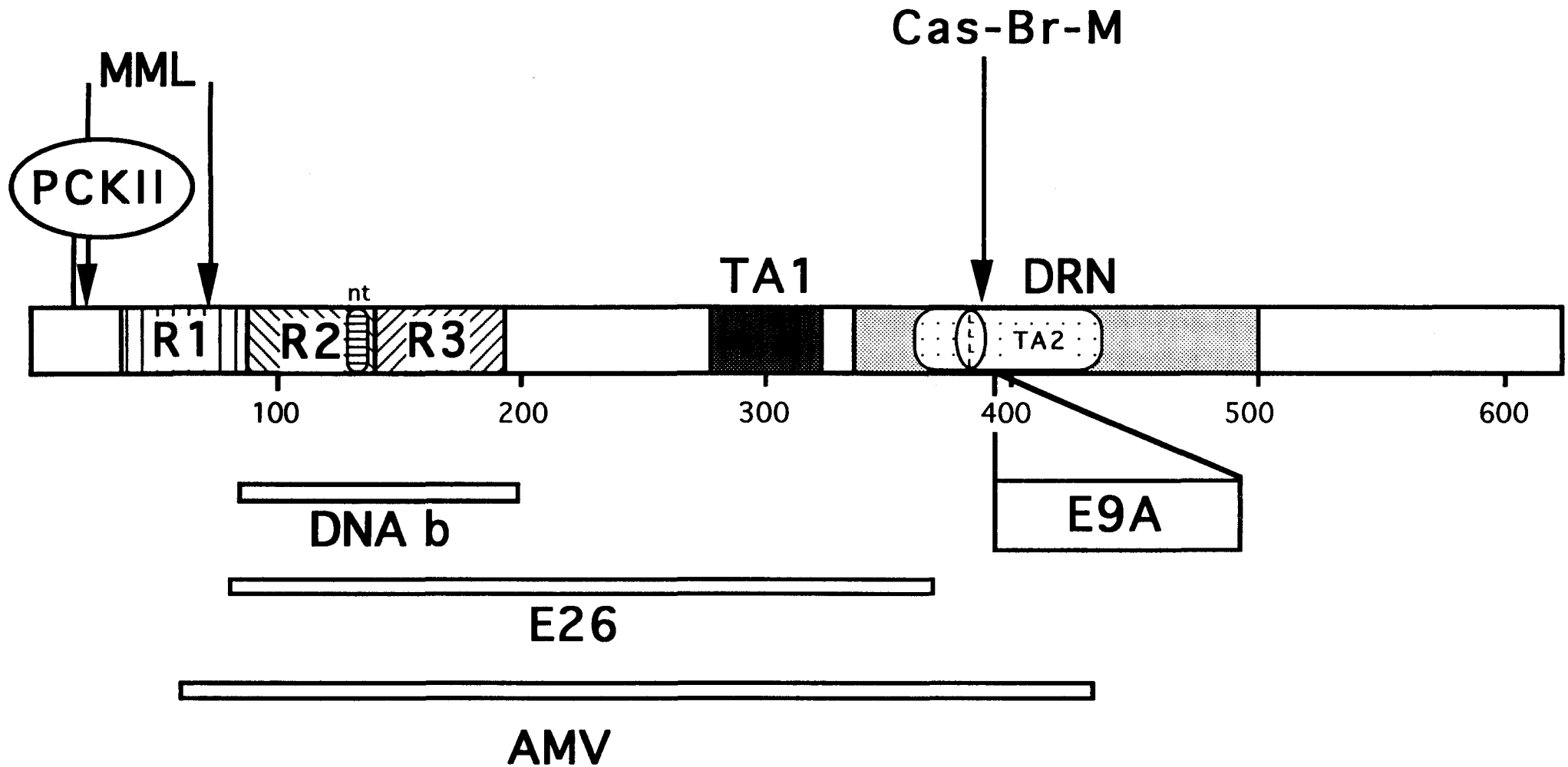
#### A- Introduction.

Le proto-oncogène *c-myb* a été isolé grâce à des sondes dérivées de ses homologues viraux transduits dans les virus leucémogènes aviaires, E26 et AMV (pour Avian Myeloblastosis Virus). Les peptides v-Myb codés par E26 et AMV sont des homologues de la protéine cellulaire, tronqués aux extrémités amino et carboxy-terminale (Roussel et al., 1979; Bister et al., 1982, Klempnauer et al., 1982, 1984). *c-myb* code un facteur de transcription capable de se fixer spécifiquement à une séquence cible de l'ADN. Sa structure moléculaire a été bien caractérisée, et comprend un domaine de fixation à l'ADN amino-terminal et un domaine de régulation de la transcription carboxy-terminal (Fig.7) (Lüscher et Eisenman, 1990b).

#### 1- Le domaine de fixation à l'ADN de c-Myb.

##### a) Structure.

Le proto-oncogène *c-myb* code une protéine de 75kD chez le poulet (Klempnauer et al., 1983, 1984, 1986, Boyle et al., 1986). Cette protéine, comme celles codées par les oncogènes *v-myb*<sup>AMV</sup> et *v-myb*<sup>E26</sup> est en général localisée dans le noyau, associée à la chromatine (Boyle et al., 1984, 1985; Boyle et Baluda, 1987; Klempnauer et al., 1984; Klempnauer et Sippel, 1986). Les protéines Myb sont capables d'interagir directement avec de l'ADN *in vitro* (Moelling et al., 1985; Klempnauer et Sippel, 1986, Bading et al., 1987). Une petite région amino-terminale très conservée parmi les protéines Myb de différentes espèces est responsable de la fixation à l'ADN (Klempnauer et Sippel, 1987; Ibanez et al., 1988, Oehler et al., 1990). Cette région de 120 acides aminés est composée dans la protéine c-Myb de trois enchaînements répétés imparfaitement de 51 ou 52 acides aminés appelés R1, R2 et R3 (Fig.7, 8) (Gonda et al., 1985; Rosson et Reddy, 1986). R2 et R3 sont aussi présents dans les régions amino-terminales des protéines v-Myb, une grande partie de R1 ayant été perdue lors de la transduction de ces séquences dans les virus AMV et E26. Ce domaine de fixation à l'ADN confère aux protéines Myb virales et cellulaires la capacité de reconnaître et de fixer spécifiquement la séquence YAACKG (Y = C ou T, K = G ou T) (Biedenkapp et al., 1988). Celles-ci se fixent sous la forme monomérique (Howe et al., 1990; Garcia et al., 1991; Ramsay et al., 1992). Les répétitions R2 et R3 sont nécessaires et suffisantes



**Figure 7 :** Structure de la protéine c-Myb (murine, 639 acides aminés, 75kD). R1,2,3, motifs répétés du domaine de fixation à l'ADN (DNAb); TA1 et TA2 domaines de transactivation; LLLL, leucine zipper putatif; DRN, domaine de régulation négative de la transcription; nt, signal de localisation nucléaire, PCKII, site de phosphorylation par la caséine kinase II; E9A, exon alternatif; MML et Cas-Br-M, sites d'intégration provirales détectés dans des cellules leucémiques.

pour la fixation à l'ADN. R1 est complètement dispensable à cette activité, et ne peut pas se substituer à R2, et ce malgré leur homologie. Ainsi, une protéine Myb délétée de R2, ayant la séquence R1-R3 ne peut plus fixer l'ADN (Howe et al., 1990, Oehler et al., 1990, Saikumar et al., 1990).

Le domaine de fixation de Myb à l'ADN (Fig.8) ne présente pas de ressemblance frappante avec des domaines précédemment décrits pour des facteurs de transcription. Néanmoins, certaines de ses caractéristiques doivent être soulignées. Les domaines R2 et R3 contiennent un nombre élevé de résidus basiques (23%), ce qui peut rappeler le domaine de fixation à l'ADN du facteur de transcription CTF/NF-1 (Mitchell et Tjian, 1989). L'observation de la séquence primaire a permis de déceler la présence de 3 résidus tryptophanes dans chacun des domaines répétés. Ces tryptophanes sont régulièrement espacés de 18 à 19 acides aminés (Anton et Frampton, 1988). La mutation des tryptophanes de R2 et de R3 en un acide aminé qui va perturber la structure provoque une abolition totale de la fixation à l'ADN. La mutation des acides aminés basiques jouxtant les tryptophanes a le même effet (Saikumar et al., 1990, Kanei-Ishii et al., 1990; Frampton et al., 1991). L'analyse de la structure primaire de la protéine c-Myb a permis à J. Frampton et coll. (1989) de proposer un modèle de structure tertiaire. Chaque domaine répété contiendrait 3 hélices  $\alpha$ . Les deux hélices en position carboxy-terminales formeraient un domaine "hélice-tour-hélice" homologue au domaine de fixation à l'ADN des répresseurs bactériens et des homéodomains eucaryotes (Frampton et al., 1989; 1991). Cette prédiction a été testée en mutant les acides aminés chargés de reconnaître la séquence cible ou responsables du maintien de la conformation tertiaire de ce domaine, définis par analogie avec le domaine "hélice-tour-hélice" d'*antennapedia*. Les effets de ces mutations sur la fixation à l'ADN et sur l'activité transactivatrice sont bien conformes avec les prévisions estimées à partir de ce modèle (Frampton et al., 1991; Gabrielsen et al., 1991). Des analyses en spectrométrie Raman de la région R1, R2, R3 et en RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) de R3 en solution semblent aussi confirmer ce modèle (Kanei-Ishii et al., 1990; Ogata et al., 1992).

En conclusion, les motifs répétés du domaine de fixation de la protéine Myb à l'ADN ont une structure formée par 3 hélices  $\alpha$ , organisées autour d'un squelette hydrophobe constitué principalement des 3 tryptophanes conservés. Les 2 hélices carboxy-terminales forment un motif en "hélice-tour-hélice" dont la structure tridimensionnelle rappelle celle des homéodomains. Ce sont les acides aminés localisés sur la face externe de la troisième hélice (la plus carboxy-terminale) de R2 et de R3 qui reconnaissent la séquence cible dans le grand sillon de l'ADN. La répétition dans R2 et R3 de ce domaine "hélice-tour-hélice" permettrait de créer une zone de contact avec l'ADN de 8 nucléotides, plus longue que celle des homéodomains qui ne possèdent qu'un seul de ces motifs et qui ne contactent que 4 à 6 bases de l'ADN.

	1	10	20	30	40	50		
BAS1 Levure						WDVLATRFKHTVVRTSKDVRKRWTGSLDPN		
Drosophila	GFGKRWSKSE	DVLLKQLVETHG	ENWEIIGPHFK	DRLEQQVQQR	WAKVLNPE			
Poulet	LGKTRWTR	EEDEKLKLLVEQ	NGTEDWKVIASFLP	NRTDVQCQHR	WQKVLNPE			
Souris	LGKTRWTR	EEDEKLKLLVEQ	NGTEDWKVIANYLP	NRTDVQCQHR	WQKVLNPE		R1	
c-Myb humain	RWTREETEKLKLLVEQ		NGTDDWKVIANYLP	NRTDVQCQHR	WQKVLNPE			
A-Myb humain	WNRVKWTR	DETDKLLKLLVEQ	HGTDDWTLIASHLQ	NRSDKQCQHR	WQKVLNPE			
B-Myb humain	KCKVKWTH	EEETEQLRALV	RQFGQQDWKFLASHFP	NRTDQQCQYR	WLRVLNPD			
REB1 levure	EQRGKWT	AEEEEQELAKLCAEK	EGQWAEIGKTL	GRMTEDCRDR	WRNRYVKCG			
BAS1 Levure	LKKGKWT	QEEDQLNKAYEEHG	PHWLSISMDIP	GRTEDQCAKRY	IEVLGPGSK			
c1 Z.mays	VKRGAWT	SKEDDALAAVKAH	GEGKWREVPQKAGL	RRCGKSCRLR	WLNYLRLPN			
1Z.mays	LNRGSWTP	QEDMRLIAYIQKH	GHTNWRALPQKAGL	LRCGKSCRLR	WINYLRLPD			
38Z.mays	TNRGAWT	KEEDERLVAYIRAH	GEGCWRSPLKAAGL	LRCGKSCRLR	WINYLRLPD			
1H.vulgare	TNKGAWT	KEEDRLTAYIKAH	GEGCWRSPLKAAGL	LRCGKSCRLR	WINYLRLPD			
33H.vulgare			HGEGCWSVPR	LAL	NRCGKSCRLR	WINYLRLPD		
305A.majus	VRKGPWT	MEEDLILINYIANH	GEGVWNSLARSAGL	KRTGKSCRLR	WLNYLRLPD			
340A.majus	VRKGPWT	MEEDLILINFI	SNHGEVWNTIARSAGL	KRTGKSCRLR	WLNYLRLPD		R2	
330A.majus	TNKGAWT	KEEDQRLINYIRAH	GEGCWRSPLKAAGL	LRCGKSCRLR	WINYLRLPD			
315A.majus	LKRGPWTE	EEEDQKLT	SYVLKNGIQGWRVIPKLAGL	SRCGKSCRLR	WMMNYLRLPD			
308A.majus	TNKGAWT	KEEDRLVAYIRAH	GEGCWRSPLKAAGL	LRCGKSCRLR	WINYLRLPD			
306A.majus	VKKGPTPE	EEDII	LVSYIQEHGPGNWRAIPRNTGL	LRCGKSCRLR	WNTNYLRLPG			
Drosophila	LIKGPWTR	DEEDMVIKLV	RNF	GPKKWT	LIARYLN	GRIGKQCRER	WHNHLNPE	
Souris	LIKGPWT	KEEDQ	RVIKLVQKYGPKRWSVIAKHLK	GRIGKQCRER	WHNHLNPE			
c-Myb hu/Po	LIKGPWT	KEEDQ	RVIKLVQKYGPKRWSVIAKHLK	GRIGKQCRER	WHNHLNPE			
A-Myb humain	LIKGPWT	KEEDQ	RVIKLVQKYGPKRWSVIAKHLK	GRIGKQCRER	WHNHLNPE			
B-Myb humain	LVGKPWT	KEEDQ	KVIELVKKYGTKQWT	LIAKHLK	GRLGRQCRER	WHNHLNPE		
BAS1 Levure	GRLREWT	LEEDLNLISKVKAYG	TKWRKISSEME	FRPSLTCRNR	RWRKIITMV			
c1 Z.mays	IRRGNISY	DEEDLIIRLH	RLLG	NRWSLIAGRLP	GRTDNEIKNYWN	STLGRR		
1Z.mays	LKRGNFT	DEEEEAIRLH	GLLG	NKWSKIAGACP	GRTDNEIKNYWN	THLKKK		
38Z.mays	LKRGNFT	ADEDDLIIVLH	GLLG	NKWSKIAGALP	GRTDNEIKNYWN	THVRRK		
1H.vulgare	LKRGNFS	HEEDELIIKLH	SLIG	NKWSLIAGRLP	GRTDNEIKNYWN	THIRRK		
33H.vulgare	LKRGCF	SQEEEDHIVALH	KILG	NRWSQIAGSHP	GRTDNEIKNFWN	SCIKKK		
305A.majus	VRRGNIT	PEEQLLIMELHAKWG	NRWSKIAKTLP	GRTDNEIKNYWR	TRIQKH			
340A.majus	VRRGNIT	PEEQLLIMELHAKWG	NRWSKIAKHLP	GRTDNEIKNYWR	TRIQKH		R3	
330A.majus	LKRGNFTE	EEDEIIKLH	SLIG	NKWSLIAARLP	GRTDNEIKNYWN	THIKRK		
315A.majus	LKKGPLTE	MEENQIIELHAHLG	NRWSKIALHIP	GRTDNEIKNYWN	THIKKK			
308A.majus	LKRGNFTE	EEDELIKLH	SLIG	NKWSLIAGRLP	GRTDNEIKNYWN	THIRRK		
306A.majus	IKRGDFTE	HEEKMI IHLQ	ALLG	NRWAAIASYLP	HRTDNDIKNYWN	THLKKK		
Drosophila	IKKTAWTE	KEDEIIYQAH	ELNG	NQWAKIAKRLP	GRTDNAIKNHWN	STMRRK		
c-Myb hu/po/So	VKKT	SWTEEDRIIYQAH	KRLG	NRWAEIAKLN	GRTDNAIKNHWN	STMRRK		
A-Myb humain	VKKS	SWTEEDRIIYEAH	KRLG	NRWAEIAKLN	GRTDNSIKNHWN	STMRRK		
B-Myb humain	VKKS	SWTEEDRIICEAH	KVLG	NRWAEIAKMLP	GRTDNAWKNHWN	STIKRK		
<b>consensus</b>	*+...*T..E-...*...*...G ..W...*...*					.R.....*...W...*....		
<b>hélice α</b>	HHHHHHHHHH			HHHHHHHH	HHHHHHHHHHHHHH			
	α1			α2	α3			

**Figure 8** : Alignement des différents motifs répétés des domaines de fixation à l'ADN des protéines de la famille MYB. Les séquences sont représentés dans le code des acides aminés à une lettre. Pour le consensus \*, hydrophobe; -, acide; +, basique. Les résidus qui s'organiseraient en hélice α sont indiqués par la lettre H. (d'après Frampton et al., 1991).

### b) Une famille de gènes apparentés à *c-myb*.

Le domaine de fixation à l'ADN de la protéine c-Myb permet de définir une famille de gènes apparentés (Fig.8). Les séquences des protéines murines et humaines sont identiques dans cette région (Gonda et al., 1985; Bender et Kuehl, 1986a; Majello et al., 1986; Slamon et al., 1986). Les séquences aviaires diffèrent seulement par 3 acides aminés localisés dans le premier motif répété, R1 (Rosson et Reddy, 1986). Cette région a été conservée chez la drosophile *Drosophila melanogaster* (Katzen et al., 1985; Peters et al., 1986), chez l'éponge *Geodia cydonium* (Biesalski et al., 1992) chez l'amibe *Dictyostylium discoideum* (Stober-Grässer et al., 1992). La protéine Myb chez l'amibe s'associe avec l'ADN et reconnaît la même séquence que son homologue humain. La région de liaison à l'ADN est également retrouvée avec une homologie partielle dans des gènes impliqués dans la différenciation tissulaire des plantes, *Arabidopsis majus*, *Hordeum vulgare* (l'orge), *Zea mays* (le maïs) (Oppenheimer et al., 1991; Marocco et al., 1989; Paz-Ares et al., 1987). La partie amino-terminale du produit du gène *c1* du maïs ne contient que 2 motifs répétés qui présentent 40% d'homologie avec les protéines c-Myb du règne animal; *c1* code un facteur de transcription impliqué dans la régulation de la biosynthèse des anthocyanines du maïs (Paz-Ares et al., 1987, Goff et al., 1991). Il existe également une région d'homologie entre le gène BAS1 de la levure (*Saccharomyces cerevisiae*) et *c-myb*. BAS1 active la transcription du gène HIS4 de la levure en coopération avec un autre facteur de transcription à homéodomaine, BAS2 (Tice-Baldwin et al., 1989).

Une famille de gènes apparentés à *c-myb* peut exister également à l'intérieur d'une même espèce. La famille semble assez nombreuse chez *Arabidopsis majus* (6 membres) (Oppenheimer et al., 1991). Trois membres ont été caractérisés chez l'homme et le poulet: *c-myb*, *A-myb* et *B-myb* (Nomura et al., 1988; Foos et al., 1992; K.-H. Klempnauer, communication personnelle). Une faible homologie entre le domaine de fixation à l'ADN de c-Myb et des facteurs de transcription médiant la réponse cellulaire à l'interféron (ISGF3g, IRF1, IRF2, ICSBP) a été décrite récemment (Veals et al., 1992). L'homologie de c-Myb avec A-Myb et B-Myb dans ce domaine est de 90 et 75% respectivement. *A-myb* et *B-myb* sont exprimés dans de nombreuses lignées cellulaires et dans des cellules lymphoïdes normales humaines (Nomura et al., 1988; Golay et al., 1991; Foos et al., 1992). B-Myb reconnaît avec une affinité comparable la séquence de fixation de la protéine c-Myb (Mizuguchi et al., 1990; Howe et Watson, 1991; Foos et al., 1992). Une séquence plus spécifique de B-Myb a été décrite (Mizuguchi et al., 1990), mais ce résultat n'a pas pu être reproduit (Howe et Watson, 1991; Foos et al., 1992). La protéine B-Myb transactive une construction comportant des sites de fixation de c-Myb et le promoteur de *c-myc* humain (Mizuguchi et al., 1990; Nakagoshi et al., 1992). Des résultats contradictoires ont été obtenus par Foos et coll. (1992) qui n'ont pas observé d'activité transactivatrice pour B-Myb sur une variété de promoteurs artificiels ou cibles naturelles de c-Myb, notamment celui de SV40 et celui de *mim-1*.

Ces auteurs montrent de plus que B-Myb inhibe la transactivation par les protéines c-Myb et v-MybAMV, probablement par compétition pour la fixation des séquences cibles, et suggèrent donc que B-Myb se comporte comme un membre inhibiteur de la famille Myb.

### c) Myb reconnaît une séquence spécifique de l'ADN.

La première indication d'une fixation spécifique de la protéine c-Myb humaine sur une séquence spécifique de l'ADN est venue du laboratoire de K. Moelling qui a montré que la protéine c-Myb purifiée se fixait de manière préférentielle à un fragment du bactériophage  $\lambda$  (Bading et al., 1987, 1988). H. Biedenkapp et coll. (1988) ont déterminé la séquence de fixation de la protéine v-MybAMV sur des fragments d'ADN génomique par la technique d'empreinte à la DNase I. Cette séquence YAACKG (Y = C ou T, K = G ou T) a été appelée MRE pour "Myb Responsive Element". Plusieurs de ces sites ont été retrouvés dans les fragments d'ADN spécifiquement fixés par v-MybAMV. Plus récemment, Pollock et Treisman (1992) ont mis au point une technique de sélection de séquences oligonucléotidiques fixées à la protéine étudiée par coprécipitation et amplification grâce à la technique d'amplification en chaîne. Après plusieurs tours de sélection, les oligonucléotides préférentiellement fixés par la protéine d'intérêt sont séquencés. Cette technique, appliquée aux protéines v-MybAMV et c-Myb de souris a permis de dégager un MRE consensuel plus large: YAACKGHHR (Y = C ou T, K = G ou T, R = A ou G, H = A, T ou C) et surtout, de déterminer les nucléotides absolument requis pour obtenir un bon site de fixation (Howe et Watson, 1991; Weston, 1992).

## **2 - La régulation de la transcription par c-Myb.**

### a) Les MREs sont requis

Les séquences de fixation des protéines Myb possèdent les caractéristiques canoniques des *enhancers*. Elles fonctionnent indépendamment de leur orientation et de leur position vis à vis d'un promoteur (en 5' ou en 3') (Nishina et al., 1989; Ramsay et al., 1992). La signification des MREs a été établie lorsqu'elles ont été retrouvées dans les promoteurs et *enhancers* de gènes régulés par les protéines Myb. Ainsi, un MRE de forte affinité, correspondant à la séquence consensus décrite *in vitro* a été identifié dans l'enhancer du virus SV40 (Nishina et al., 1989; Sakura et al., 1989; Nakagoshi et al., 1990), et dans le LTR du virus HIV-1 (Dasgupta et al., 1990). Ces séquences clonées en amont d'un gène reporter lui confèrent la capacité d'être régulé par Myb en tests de cotransfection. Le promoteur du gène *mim-1*, premier gène cible de la P135 $\Delta$ *gag-myb-ets* et de la p75<sup>c-myb</sup> identifié (voir paragraphe 7a) possède 3 MREs, l'un très affine correspondant à la

séquence consensus décrite *in vitro* et deux autres moins affines (Ness et al., 1989) (Fig.13). La protéine c-Myb transactive faiblement le promoteur du gène *c-myb* en tests de cotransfection, et régulerait ainsi sa propre expression (Nicolaidis et al., 1991). Cet effet est médié par 3 MREs localisés 600pb en amont du codon d'initiation. Cette autorégulation, par sa faible intensité, ne semble pas contribuer de manière fondamentale à la régulation de l'expression de *c-myb*.

La protéine c-Myb ou une protéine apparentée ferait également partie d'un complexe protéique indispensable à l'expression du gène CD4 (Siu et al., 1992). CD4 code une glycoprotéine qui s'accumule dans une population de thymocytes et dans les lymphocytes auxiliaires (Fig.19). Les MREs du promoteur de CD4 sont requis pour observer une induction de CD4 dans les lymphocytes auxiliaires. Le promoteur caractérisé n'est toutefois pas fonctionnel dans les thymocytes corticaux immatures CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup> où c-Myb est abondant. Ceci suggère que la transactivation par c-Myb nécessite des adaptateurs ou d'autres facteurs de transcription qui ne seraient pas exprimés dans ces cellules immatures.

Les nombreuses fonctions attribuées à c-Myb suggèrent que celui-ci régule l'expression d'autres facteurs de transcription, point de départ d'une cascade d'évènements conduisant à la prolifération ou à la différenciation. Cela semble bien être le cas, puisque la transfection stable de *c-myb* dans une lignée lymphoïde T provoque une augmentation de l'expression du proto-oncogène *c-myc*, un facteur de transcription aux effets pléiotropiques (Evans et al., 1990, pour revue sur *myc*, Lüscher et Eisenman, 1991a). *In vitro*, c-Myb et B-Myb transactivent le promoteur des gènes *c-myc* murin et humain (Evans et al., 1990; Zobel et al., 1991; Nakagoshi et al., 1992). Le promoteur de *c-myc* ne contient pas moins de 15 MREs putatifs plus ou moins affines pour la fixation de c-Myb. L'observation de plusieurs répétitions des séquences de fixation dans les promoteurs de gènes cibles de c-Myb est à rapprocher des données des tests de cotransfection sur des promoteurs artificiels qui montrent qu'une duplication (au minimum) des MREs dans des promoteurs synthétiques est nécessaire pour qu'une activation significative de la transcription soit observée. Ce système permettrait une modulation plus fine de la transcription des gènes cibles en fonction du taux d'expression de *c-myb* dans la cellule.

#### b) Myb transactive sans se fixer à l'ADN.

Une nouvelle dimension à la fonction des protéines Myb a été mise en évidence par K.H. Klempnauer et coll. (1989) qui ont montré que la p48<sup>v-myb</sup> était capable de transactiver le promoteur du gène codant la protéine de choc thermique HSP70 en absence de son domaine de fixation à l'ADN. Cet aspect de la fonction de v-Myb a été éclairé d'un jour nouveau après l'étude de gènes cibles potentiels de v-Myb. Sept gènes ont été clonés sur la base de leur expression différentielle entre des cellules myélomonocytiques transformées par un mutant d'AMV et des monoblastes transformés par AMV sauvage (Nakano et Graf, 1992). Seul un de ces clones,

présentant des homologies avec la ribonucléase A et avec l'angiogénine humaine semble directement régulé par v-Myb de E26 et d'AMV. Trois MREs sont présents dans le promoteur de ce gène mais leur délétion n'empêche pas la transactivation médiée par v-Myb. Cela ressemble beaucoup aux premières observations publiées par l'équipe de Klempnauer sur le promoteur de la protéine de choc thermique HSP70 (Klempnauer et al., 1989). Le promoteur du lysozyme de poulet, qui est exprimé dans les granulocytes et les macrophages matures, est aussi régulé de manière directe par v-Myb, bien qu'aucune séquence de type MRE n'y apparaisse (Introna et al., 1990; Burk et Klempnauer, 1991).

La transfection d'une chimère entre v-Myb et la partie responsable de la fixation du ligand du récepteur à l'estrogène (ER) dans la lignée de macrophages HD11 a permis d'obtenir un système où l'activité transactivatrice de v-Myb est inductible après addition d'estrogènes (Burk et Klempnauer, 1991). Ce système a permis d'isoler en plus de *mim-1*, précédemment caractérisé comme un gène cible de la P135 $\Delta$ *gag-myb-ets*, un nouveau gène cible de v-Myb appelé MD-1. La transcription de MD-1 n'est plus induite par la chimère v-Myb/ER en présence de cycloheximide. L'activation de l'expression de MD-1 par v-Myb/ER pourrait requérir un coactivateur protéique labile ou se produire de manière indirecte. La même conclusion a été tirée pour le gène codant l'ADN polymérase  $\alpha$ . Son promoteur contient 6 sites MRE fonctionnels, en terme de fixation de la protéine c-Myb mais il n'est pas transactivé par la protéine c-Myb en test de cotransfection (Sudo et al., 1992). MD-1 et l'ADN polymérase  $\alpha$  pourraient rejoindre le groupe constitué des gènes codant pour la kinase p34<sup>cdc2</sup>, l'histone H3, le *Proliferating Cell Nuclear Antigen* régulés positivement et indirectement par les protéines Myb (Travali et al., 1991a).

### c) Myb a trouvé des partenaires.

Bien que le mécanisme de la transactivation par les protéines Myb sans fixation à l'ADN ne soit pas encore élucidé, plusieurs hypothèses peuvent être avancées. Les protéines Myb non liées à l'ADN pourraient séquestrer une protéine chargée de réprimer l'expression de *hsp70*. Alternativement, un facteur fixé au promoteur du gène *hsp70*, interagirait avec Myb et utiliserait le domaine transactivateur de ce dernier pour augmenter l'expression du gène *hsp70*. Un tel mécanisme a été mis en évidence pour la protéine à homéodomaine Oct-1 capable de recruter le transactivateur VP16 du virus de l'herpès (Stern et al., 1989). Des interactions protéine-protéine de ce type ont été suspectées pour la première fois par C. Ibanez et J. Lipsick (1990) qui ont observé que la fixation de la p48<sup>v-myb</sup> aux MREs était nécessaire mais pas suffisante pour la transactivation d'un gène *reporter*, ce qui suggérait que d'autres facteurs de transcription étaient requis pour que la p48<sup>v-myb</sup> transactive. Plus récemment de telles interactions ont été avancées pour expliquer la coopération entre c-Myb et le transactivateur BZLF1 du virus d'Epstein-Barr (EBV) (Kenney et al., 1992). Alors que BZLF1, une protéine avec une structure de type *leucine zipper*, et c-Myb ont peu



d'effets indépendamment sur le promoteur BMRF1 de EBV, la coexpression des deux conduit à la stimulation de la transcription de plus de 100 fois. Cet effet nécessite le site de fixation de la protéine BZLF1, mais non le site de fixation de la protéine c-Myb. Aucune interaction directe entre ces 2 facteurs n'a été mise en évidence. Le domaine de fixation à l'ADN de c-Myb est requis pour la coopération avec BZLF1. On pourrait imaginer que la protéine virale BZLF1 mime et détourne une coopération normale entre c-Myb et une protéine cellulaire à *leucine zipper* analogue à BZLF1. Dans cette perspective, il est intéressant de souligner que BAS1 de levure, apparenté à Myb, n'active la transcription du gène HIS4 qu'en coopération avec BAS2, une protéine à homéodomaine (Tice-Baldwin et al., 1989).

#### d) Les domaines de régulation de la transcription.

Des expériences de mutagenèse par délétion et par insertion ont permis de délimiter un domaine des protéines p75<sup>c-myb</sup> (entre les acides aminés 276 et 326 de c-Myb murin) et p48<sup>v-myb</sup> AMV nécessaire à l'activation de la transcription (Sakura et al., 1989, Weston et Bishop, 1989, Ibanez et Lipsick, 1990, Kalkbrenner et al., 1990; Lane et al., 1990) (Fig.7). Ce domaine de 50 acides aminés, localisé en position carboxy-terminale du domaine de fixation à l'ADN (acides aminés 276 à 326 de la p75<sup>c-myb</sup> murine), est très bien conservé chez les vertébrés. A part deux substitutions conservatives, il est identique chez l'homme, la souris et le poulet. Par contre, on ne retrouve pas de séquences homologues à ce domaine ni dans les protéines c-Myb de drosophile, d'eucaryotes inférieurs et de végétaux, ni dans la protéine B-Myb (Weston et Bishop, 1989; Foos et al., 1992). Foos et coll. (1992) annoncent d'ailleurs que B-Myb ne transactive pas des promoteurs contenant des MREs, bien que se fixant à ses séquences, et que B-Myb inhibe la transactivation par c-Myb et v-Myb<sup>AMV</sup>, par compétition avec ces dernières.

Le domaine d'activation de la transcription de c-Myb ne présente aucun trait particulier hormis sa nature hydrophile et faiblement acide. Ce caractère acide est commun à d'autres domaines d'activation de la transcription tels ceux des protéines de levure Gal4 et du virus de l'herpès VP16. Cependant il faut noter que ce caractère n'est pas très prononcé dans le cas de Myb, la charge nette de ce domaine étant de -3 contre -10 pour VP16. Comme pour VP16 (Cress et Triezenberg, 1991), sa structure tridimensionnelle semble plus importante puisqu'une délétion ou une insertion de 11 et 2 acides aminés respectivement, qui modifient peu la charge globale de ce domaine, abolissent totalement la transactivation par Myb (Weston et Bishop, 1989, Lane et al., 1990). Ce domaine d'activation de la transcription est requis pour la transformation des cellules myéloïdes par la p48<sup>v-myb</sup> et semble aussi nécessaire à l'activité transformante de E26 (Lane et al., 1990; Metz et Graf, 1991b).

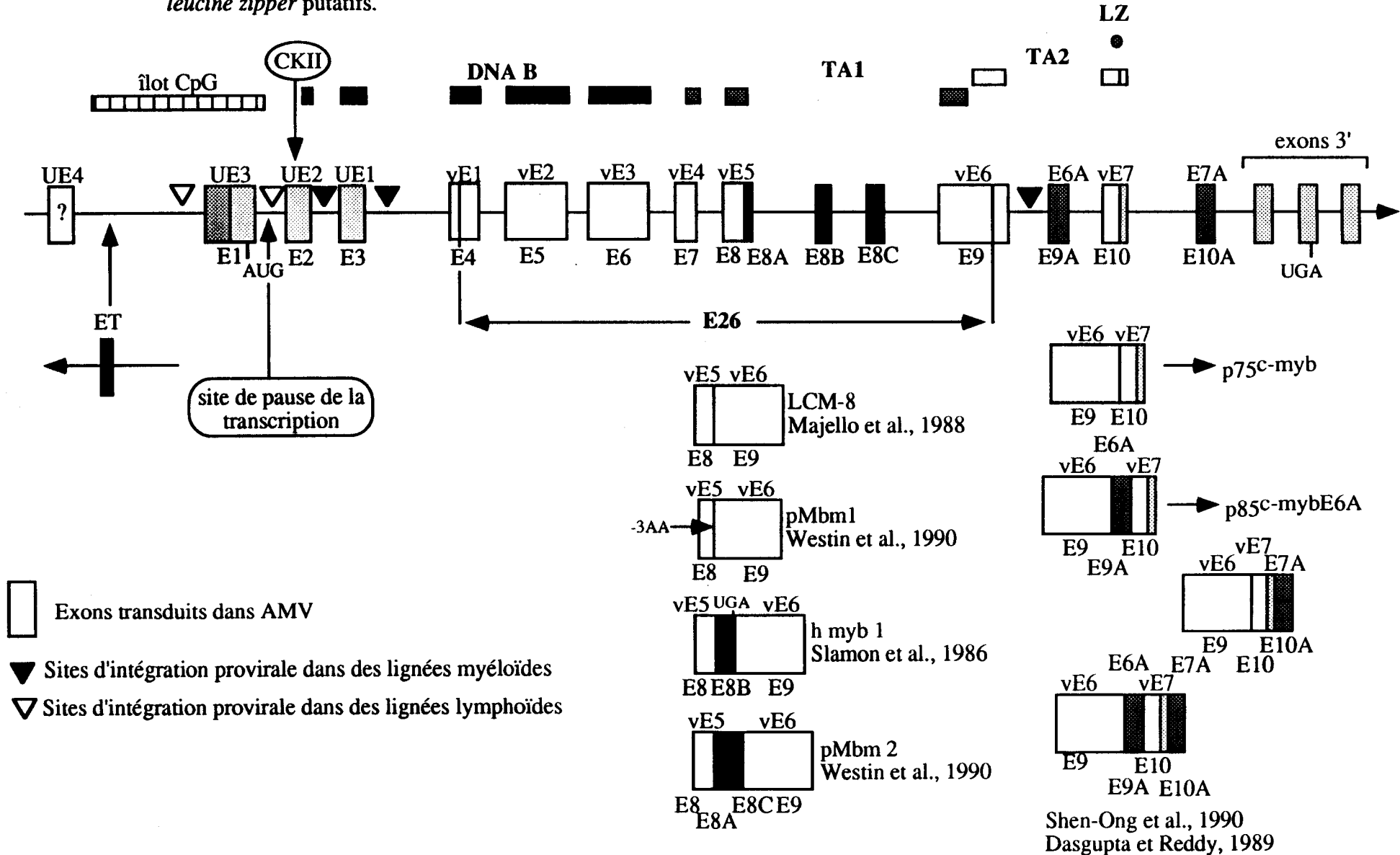
Un autre domaine transactivateur a été décrit récemment dans la p48<sup>v-myb</sup> en position carboxy-terminale du premier (correspondant au domaine encadré par les acides aminés 367 et 428

de c-Myb murin) (Bortner et Ostrowski, 1991; Nakagoshi et al., 1992) (Fig.7). La p48<sup>v</sup>-myb délétée de ce domaine se comporte comme un mutant négatif dominant et inhibe partiellement la transactivation médiée par la p48<sup>v</sup>-myb. Ce phénotype est accentué si les délétions de la p48<sup>v</sup>-myb englobent les 2 domaines transactivateurs. Ainsi, ces 2 domaines coopèreraient en *cis* pour induire une activation de la transcription maximale. *In vivo*, la p48<sup>v</sup>-myb délétée de ce domaine n'est plus transformante et n'induit plus la croissance des cellules myéloïdes sans ancrage (Ibanez et Lipsick, 1988, 1990). Une partie de ce domaine pourrait s'organiser en *leucine zipper*, une structure responsable d'interactions avec d'autres protéines (Biedenkapp et al., 1988). Des mutations par insertions de 3 acides aminés qui doivent perturber l'hélice  $\alpha$  du *leucine zipper* ne semblent cependant pas affecter les propriétés transformantes de la p48<sup>v</sup>-myb. Au contraire, elles semblent augmenter l'activité transactivatrice, ce qui indiquerait plutôt la présence d'un domaine qui régule de manière négative la transcription (Lane et al., 1990). Des mutations de la p75<sup>c</sup>-myb dans ce motif putatif ou la délétion de sa partie carboxy-terminale (acides aminés 330 à 640) provoquent également une augmentation de l'activité transactivatrice (Sakura et al., 1989; Kalkbrenner et al., 1990; Hu et al., 1991; Kanei-Ishii et al., 1992). Cette contradiction apparente peut refléter une limite technologique, les mutations par délétion étant trop grossières pour délimiter des domaines fonctionnels discrets, ou notre ignorance de la structure tridimensionnelle de la protéine. On peut imaginer que le second domaine transactivateur décrit par Bortner et Ostrowski (1991) ne possède pas de propriétés activatrices intrinsèques mais qu'il soit nécessaire pour un fonctionnement optimal du premier domaine transactivateur. Ce point pourrait être éclairci en le fusionnant à un domaine de fixation à l'ADN hétérologue, tel celui de GAL4 afin d'établir qu'il possède une activité transactivatrice autonome. D'une manière plus triviale, la fonction de ces domaines pourrait varier selon le contexte expérimental, cellules utilisées pour les tests de cotransfection, gènes *reporter*... Enfin, ce domaine pourrait être masqué par la région carboxy-terminale de la protéine c-Myb qui régule de manière négative la transcription.

En effet, un domaine transrépresseur a été localisé par des délétions entre les acides aminés 325 et 460 de la p75<sup>c</sup>-myb murine (Sakura et al., 1989; Hu et al., 1991; Kanei-Ishii et al., 1992) (Fig.7), confiné aux 140 acides aminés carboxy-terminaux de la p75<sup>c</sup>-myb humaine (Kalkbrenner et al., 1990). Ce domaine agirait à deux niveaux. Il semble tout d'abord qu'il diminue la fixation à l'ADN. Ainsi, une protéine Myb délétée de ce domaine se fixe 4 à 6 fois mieux sur le site MRE que la protéine de pleine longueur (Ramsay et al., 1992). Le domaine transrépresseur pourrait agir aussi directement sur le domaine transactivateur. Cette évidence a été apportée par F. Kalkbrenner (1990) qui utilise la partie carboxy-terminale de c-myb fusionnée au domaine de fixation à l'ADN de GAL4. Une augmentation de l'activité transactivatrice de ces constructions est observée après délétion du domaine répresseur. Bien que l'influence de ces délétions sur la capacité de GAL4 à se fixer à sa séquence spécifique n'ait pas été regardée, il est possible que ces résultats soient dus à un effet direct sur la transactivation.

**figure 9 : Représentation schématique du locus *c-myb*. Epissages alternatifs des transcrits *c-myb*.**

Les différents ADNc sont représentés (ne figurent que les exons impliqués dans l'épissage). CKII, site de phosphorylation par la caséine kinase II; DNA B, domaine de fixation à l'ADN, TA1, 2, domaines transactivateurs; LZ, *leucine zipper* putatifs.



La structure des protéines Myb peut donc être décomposée en modules comme celles des autres facteurs de transcription déjà décrits. Le schéma de cette structure représentée Fig.7 résume notre connaissance actuelle de ce facteur de transcription. Il transparaît de l'étude de nombreux mutants que la détermination de la structure tridimensionnelle, encore inconnue est d'une importance capitale. Ainsi un domaine répresseur carboxy-terminal pourrait par exemple interagir avec un domaine de fixation à l'ADN amino-terminal et un domaine transactivateur au centre de la molécule.

### 3 - Régulation de la fonction des protéines c-Myb.

#### a) Epissage alternatif des transcrits du locus *c-myb*.

La génération de plusieurs isoformes d'une même protéine par épissage alternatif est un mode commun de régulation de l'activité d'un facteur de transcription. Plusieurs de ces événements affectent les transcrits du locus *c-myb* (Fig.9). Le locus *c-myb* s'étend sur 40kbp et est très homologue entre l'espèce aviaire, murine et humaine (pour revue voir Shen-Ong, 1990). Les 7 exons de *c-myb* qui ont été transduits dans AMV sont appelés vE1 à vE7 dans le sens 5'-->3' (Klempnauer et al., 1982; LePrince et al., 1983b; Majello et al., 1986; Shen-Ong et al., 1986). Les exons en amont des séquences homologues à *v-myb* ont été appelés UE1 à UE3 dans le sens inverse 3'-->5' (Lavu et Reddy, 1986; Soret et al., 1988, Hahn et al., 1989). UE3, premier exon codant, est aussi appelé E1, les exons en aval étant numérotés de E2 à E10. En amont du dernier exon transduit dans AMV, vE7, on trouve encore 3 exons dont 2 codant, qui n'ont pas été caractérisés en détails (Majello et al., 1986).

Un premier événement d'épissage alternatif des transcrits du locus *c-myb* murin a d'abord été détecté dans des lymphosarcomes induits par le virus d'Abelson (Rosson et al., 1987). Un exon alternatif de 363 bases d'une capacité codante de 121 acides aminés est inséré entre les exons vE6 et vE7 (Fig.9). Il a été appelé E6A. En fait, 10% des transcrits *c-myb* isolés de tissus sains de souris possèdent l'exon E6A (Shen-Ong, 1987). L'exon E6A est conservé au cours de l'évolution; ce même épissage alternatif existe chez l'homme et des séquences homologues à E6A ont été identifiées chez le poulet et le xénope (Dasgupta et Reddy, 1989; Shen-Ong et al., 1990). Les transcrits alternatifs sont traduits chez la souris en une protéine de 85kDa, immunoprécipitée spécifiquement par des anticorps dirigés contre la région codée par l'exon E6A (Dudek et Reddy, 1989; Shen-Ong et al., 1989). La p85<sup>c-myb-E6A</sup> et la p75<sup>c-myb</sup> classique sont localisées dans le noyau, ont la même durée de vie, environ 40mn et sont régulées de la même manière au cours du cycle cellulaire (Shen-Ong, 1990). La perturbation apportée par l'exon alternatif dans la fonction de la p85<sup>c-myb-E6A</sup>, par rapport à la p75<sup>c-myb</sup> n'a pas été investiguée en détail. Des résultats

préliminaires n'ont pas permis de mettre en évidence des différences significatives entre les capacités transactivatrices de la p85<sup>c-myb</sup>-E6A et de la p75<sup>c-myb</sup> *in vitro* (Dudek et al., 1992). Il faut souligner que l'insertion des séquences codées par E6A se fait au milieu du domaine de régulation négative de la transcription; en particulier, elle sépare la structure en *leucine zipper* putative en deux. Chez l'homme, des données contradictoires ont été rapportées. P. Dasgupta et E.P. Reddy (1989) prévoient d'après la séquence de l'exon E6A humain l'existence d'une protéine homologue à la p85<sup>c-myb</sup>E6A murine. La séquence établie par G. Shen-Ong (1990), confirmée sur différents ADN complémentaires, est différente d'une seule base par rapport à la séquence décrite précédemment; cette base crée un codon stop dans le cadre de lecture qui conduit à un arrêt de la traduction dans l'exon E6A. Les transcrits ayant intégré l'exon E6A chez l'homme seraient donc traduits en une protéine tronquée déléetée d'un tiers carboxy-terminal (200 acides aminés) comprenant le domaine de régulation négative. Un autre processus d'épissage d'alternatif impliquant un exon E7A qui s'intercale entre les exons vE7 et E8, pourrait générer de la même manière une protéine déléetée d'une centaine d'acides aminés carboxy-terminaux (Shen-Ong et al., 1990). Chez l'homme, des formes tronquées ou plus longues de la protéine c-Myb n'ont jamais été mises en évidence.

D'autres processus d'épissage alternatif des transcrits *c-myb* sont suspectés chez l'homme. En effet des ADNc différents de l'ADNc canonique codant pour la p75<sup>c-myb</sup> (Majello et al., 1986) ont été isolés (Fig.9). Ceux-ci résultent de l'usage différentiel de l'exon E8B (Slamon et al., 1986) ou des exons E8A et E8C (Westin et al., 1990) et coderaient pour des protéines déléetées d'une partie du domaine transactivateur. Ces produits alternatifs gardent le domaine de fixation à l'ADN et entreraient en compétition avec la p75<sup>c-myb</sup> pour la fixation aux gènes cibles. L'un de ces ADNc se comporte d'ailleurs comme un mutant négatif dominant et accélère la différenciation des cellules érythroleucémiques induite par le DMSO, au contraire de la p75<sup>c-myb</sup> qui l'inhibe (Weber et al., 1990).

L'utilisation alternative d'un exon non codant encore hypothétique en amont de UE3, ou l'utilisation de sites alternatifs d'initiation de la transcription pourrait être aussi responsable de l'hétérogénéité en 5' des transcrits *c-myb* (Majello et al., 1986; Rosson et Reddy, 1986; Shen-Ong, 1990). Récemment, un exon alternatif appelé ET (pour Exon Thymique) a été décrit dans les cellules lymphoïdes T et la moelle osseuse de poulet (Soret et al., 1988; Kim et Baluda, 1989) (Fig.9). Ces séquences sont portées par un chromosome différent de celui qui porte le locus *c-myb* et pourraient provenir d'un épissage en *trans* d'ARNs précurseurs exprimés à partir d'unités transcriptionnelles physiquement distinctes (Vellard et al., 1991a). Une protéine exprimée sur le brin antisens du locus ET présente des homologies avec des protéines fixant l'ARN impliquées dans la régulation des épissages alternatifs (Vellard et al., 1991b, 1992; Perbal, 1992). Le brin sens de l'exon ET intégré en amont de l'exon UE3 de *c-myb* code pour 58 acides aminés supplémentaires, capables de réprimer la transactivation dans un système hétérologue chez la levure

(Punyammalee et al., 1991). Ces données souffrent du fait qu'il n'existe aucune preuve que ce type d'ARNm soit effectivement traduit *in vivo*.

#### b) Modifications post-traductionnelles.

Récemment, le groupe de R.N. Eisenman a montré que l'activité de fixation à l'ADN de la p75<sup>c-myb</sup> aviaire était régulée par phosphorylation près de son extrémité amino-terminale (Lüscher et al., 1990). Les sérines en position 11 et 12 sont phosphorylées *in vitro* et *in vivo* par la caséine kinase II (CKII) (Fig.7). La phosphorylation de ces résidus diminue la fixation spécifique de la p75<sup>c-myb</sup> sur la séquence MRE. Le mécanisme de cette inhibition n'est pas encore clair. Etant donné que les sérines 11 et 12 sont localisées à environ 50 acides aminés du domaine de fixation à l'ADN, la phosphorylation pourrait provoquer des altérations structurelles sur une longue distance, par exemple un repliement de la molécule qui masquerait le domaine de fixation à l'ADN. Il faut aussi noter que l'inhibition de la liaison à l'ADN induite par la phosphorylation est beaucoup plus efficace pour les MREs présentant une moindre affinité que pour ceux présentant une forte affinité pour la p75<sup>c-myb</sup>. La phosphorylation par la CKII serait un moyen déplacer *in vivo* la protéine Myb vers les MREs les plus affines et ainsi d'altérer le type de gènes régulés en réponse à des signaux extracellulaires. Des facteurs de croissance peuvent en effet modifier positivement ou négativement la phosphorylation par la CKII (Meisner et Czech, 1991, pour revue).

La protéine c-Myb est également phosphorylée *in vivo* au cours de la mitose (Lüscher et Eisenman, 1992). Cette phosphorylation se traduit par une modification de la structure tridimensionnelle visualisée par un ralentissement de la mobilité électrophorétique. La protéine c-Myb phosphorylée ainsi ne se fixe plus à l'ADN, permettant peut-être le détachement de ce facteur de transcription des chromosomes en condensation, et la diminution des activités transcriptionnelles pendant la mitose. p34<sup>cdc2</sup>, une sérine/thréonine kinase qui participe au contrôle de la mitose est probablement l'une des kinases responsables. p34<sup>cdc2</sup> phosphoryle c-Myb *in vitro* sur certains des résidus qui sont phosphorylés *in vivo* au cours de la mitose. D'autres kinases sont impliquées dans ce processus. La glycogène synthase kinase 3 et les *Mitogen Activated Protein* kinases sont souvent proposées (Bading et al., 1989; Alvarez et al., 1991; Lüscher et Eisenman, 1992) mais aucun travail n'a été publié sur ce sujet jusqu'à présent. Plusieurs voies de signalisation cellulaire pourraient converger pour réguler la fixation à l'ADN de la protéine Myb.

#### c) Régulation du transport cytoplasme noyau.

La régulation du transport du cytoplasme vers le noyau, mise récemment sous les feux de l'actualité pour les facteurs de transcription c-Fos et NF-KB (Roux et al., 1990, Blank et al., 1992) pourrait s'appliquer aux protéines Myb. C'est ce que suggèrent H. Bading et coll. (1988) qui

déteignent la protéine c-Myb humaine dans le cytoplasme de lymphocytes T normaux et dans le noyau des lymphocytes issus de lymphomes. Ces expériences sont étayées par l'emploi de 2 anticorps monoclonaux différents et l'utilisation de 2 techniques indépendantes (immunocytochimie et fractionnement cellulaire). La présence de la p48<sup>v-myb</sup> dans le cytoplasme, en périphérie du noyau a été également décrite dans des myéloblastes transformés par AMV induits à se différencier (Klempnauer et al., 1984). Cependant, dans la grande majorité des cas, les protéines c-Myb et v-Myb ont été détectées dans le noyau de cellules transformées ou normales (Boyle et al., 1984, 1985; Boyle et Baluda, 1987; Kempnauer et al., 1984; Klempnauer et Sippel, 1986; Kastan et al., 1989a; Pizer et al., 1992). Les signaux responsables du transfert de la p48<sup>v-myb</sup> ont été localisés (Ibanez et Lipsick, 1990). Un premier domaine est composé de 29 acides aminés dans la partie amino-terminale du premier motif répété de la p48<sup>v-myb</sup> (R2 dans la p75<sup>c-myb</sup>). Ce motif est très conservé entre les protéines Myb de mammifères, de poulet ou de drosophile, mais ne présente pas d'homologie avec les signaux de localisation nucléaire déjà décrits (Silver, 1991). Le second domaine est codé par la fin de l'exon vE5 et le début de vE6 et augmenterait l'efficacité du mécanisme de transport vers le noyau médié par le premier domaine.

#### d) Régulation de la dégradation.

La dégradation des protéines Myb est un moyen, certes définitif, de réguler leur activité transcriptionnelle. La demi-vie des protéines c-Myb et v-Myb est courte, de 30 minutes à une heure (Boyle et al., 1985; Klempnauer et al., 1986; Lüscher and Eisenman, 1988; Foos et al., 1992). Leur dégradation requiert de l'énergie et ne dépend pas des mécanismes déjà décrits impliquant les lysosomes ou l'ubiquitine. Deux régions PEST, riches en proline (P), acide glutamique (E), sérine (S) et thréonine (T), peuvent être identifiées dans Myb (Rogers et al., 1986). Ces séquences sont retrouvées dans de nombreuses protéines à demi-vie courte, telles c-Myc, p53, c-Fos, c-Ets-1 mais leur rôle dans la protéolyse n'a pas été établi.

### **4- Activation oncogénique de c-myb.**

#### a) Premières évidences.

Après avoir identifié différents domaines fonctionnels et sachant que les protéines Myb oncogéniques sont des formes tronquées de la p75<sup>c-myb</sup>, il est tentant de comprendre l'activation de Myb en termes de perte de domaines fonctionnels. Par exemple, on peut prévoir que la perte des domaines de régulation négative, le trans-répresseur carboxy-terminal et le site de phosphorylation amino-terminal par la caséine kinase II résulterait en une protéine qui transactive

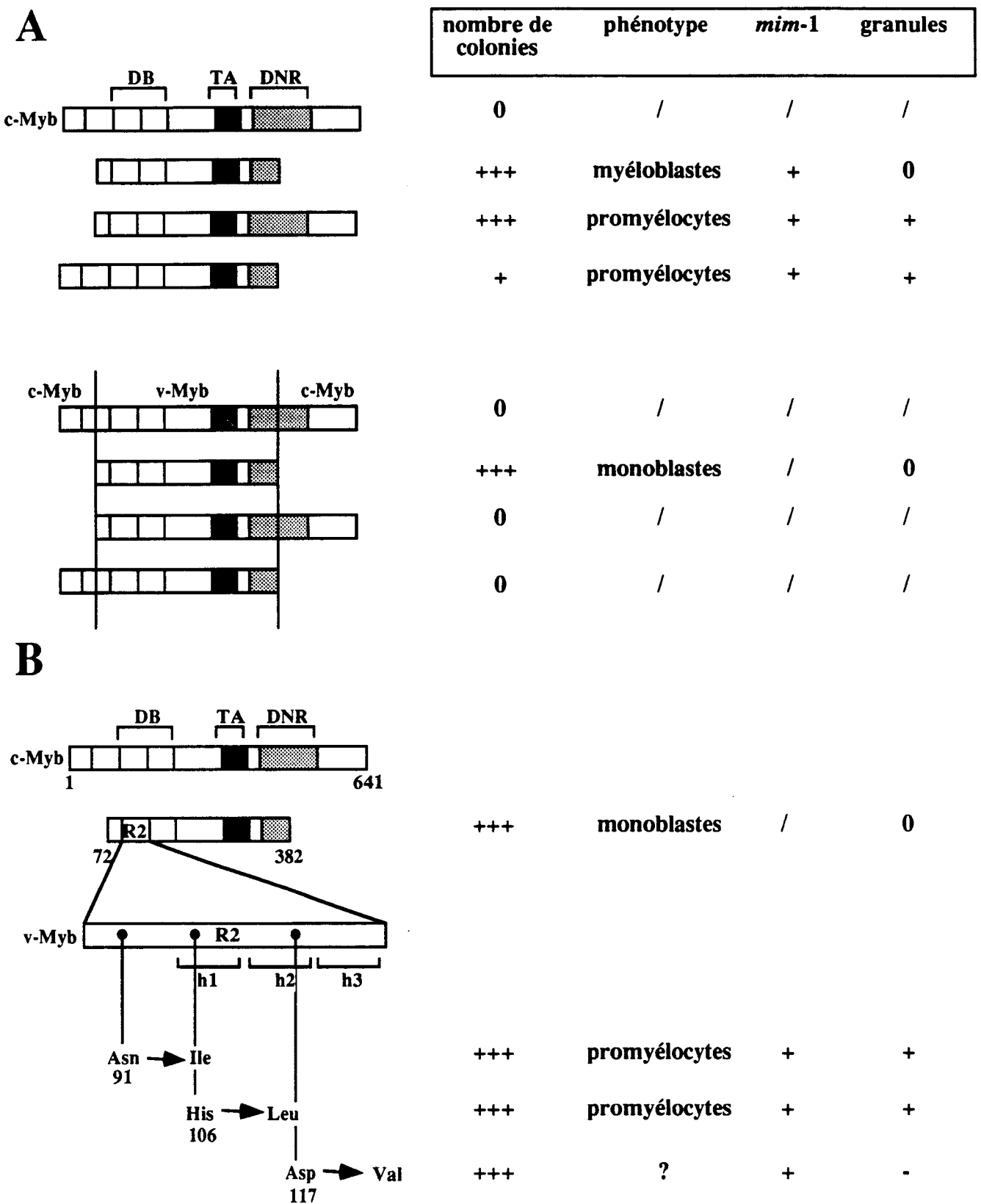
plus et qui se fixe de manière constitutive à l'ADN. C'est précisément ce qui s'est passé dans la génération des formes virales de Myb des rétrovirus E26 et AMV (Fig.7, 9). Les protéines v-Myb ont en effet perdu, du moins en partie, les deux domaines de régulation négative et présentent des capacités de fixation à l'ADN et de transactivation accrues par rapport à leur homologue cellulaire (Weston et Bishop, 1989; Lane et al., 1990; Hu et al., 1991; Ramsay et al., 1991; Merzak et al., 1992). Des délétions amino-terminales de *c-myb* sont générées par l'insertion de rétrovirus dans des leucémies myéloïdes chez la souris et des lymphomes B chez le poulet (Shen-Ong et al., 1984, 1986, 1990; Gonda et al., 1987, Kanter et al., 1988, Pizer et Humphries, 1989, Pizer et al., 1992) (Fig.9). La délétion la plus petite observée affecte les 20 premiers acides aminés, et donc délète les résidus phosphorylés par la caséine kinase II (Mukhopadhyaya et Wolf, 1992). Dans certains cas d'intégration rétrovirale, des délétions de la partie carboxy-terminale qui réprime la transcription ont été aussi décrites (Shen-Ong et al., 1986; Weinstein et al., 1986, 1987; Mukhopadhyaya et Wolf, 1992) (Fig.9). En plus des troncutures, ces versions oncogéniques des protéines Myb sont en général sous le contrôle des promoteurs forts des LTRs rétroviraux et sont donc surexprimées dans les cellules leucémiques. Ces observations suggèrent fortement, mais toutefois sans le prouver, que l'activation oncogénique des protéines Myb requiert leur expression constitutive et une troncuture amino ou carboxy-terminale. Dans le système des neurorétines de caille, C. Garrido et coll. (1992a) ont montré que ces cellules, en présence de bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*) étaient aussi bien transformées par les produits de *v-myb* des virus E26 et AMV que par le gène *c-myb* placé sous le contrôle de LTR rétroviraux.

Un processus d'amplification de *c-myb* semble également suffisant dans la tumorigenèse chez l'homme. Le locus *c-myb* est localisé chez l'homme sur le chromosome 6 en position 6q 22-24 (Harper et al., 1983). L'amplification de *c-myb* a été détectée dans 2 lignées cellulaires établies à partir d'un carcinome de colon (COLO 201 et 205), indiquant que *c-myb* puisse être impliqué dans le développement de tumeurs solides (Alitalo et al., 1984 ; Winqvist et al., 1985). Une amplification et/ou une forte expression de *c-myb* ont été reportées dans des leucémies lymphoïdes et myéloïdes portant une délétion de la bande 24 sur le chromosome 6 (Pelicci et al., 1984). En dépit de cette aberration chromosomique commune à de nombreuses leucémies lymphoïdes et myéloïdes, aucune altération structurale du locus *c-myb* n'a pu être mise en évidence (Barletta et al., 1987; Park et Reddy, 1992). La production massive d'une protéine c-Myb normale pourrait donc suffire à l'induction de leucémies chez l'homme, bien qu'aucune relation causale directe n'ait pu être prouvée jusqu'à présent.

#### b) Tests de transformation cellulaire *in vitro*.

Le développement de tests de transformation *in vitro* de cellules hématopoïétiques était nécessaire pour tester l'importance des différentes altérations subies par la protéine Myb. Un tel test





**Figure 10**

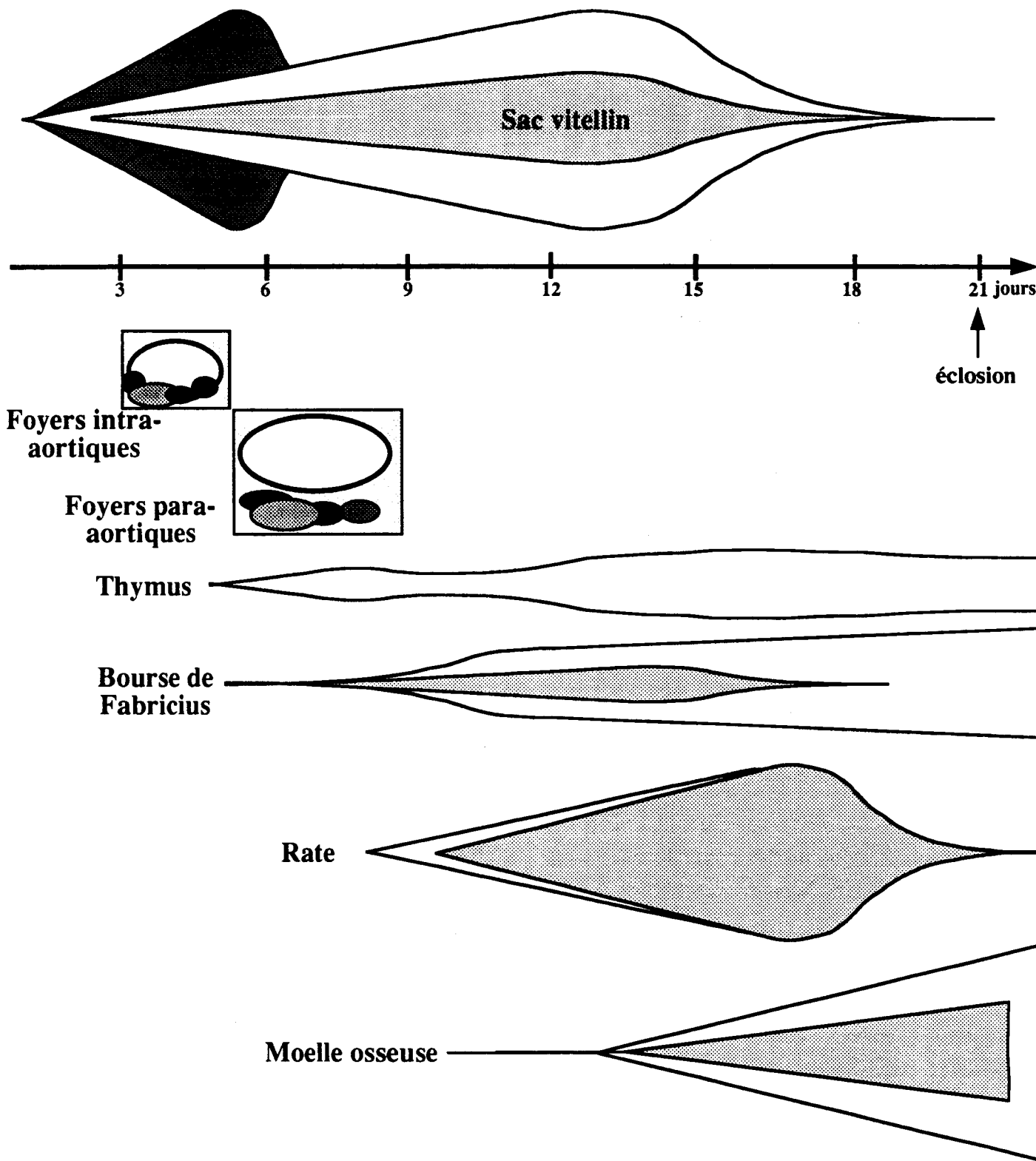
**A:** Structure des protéines c-Myb sauvages et délétées de leur extrémité Nt et Ct. Structure des protéines v-Myb<sup>AMV</sup> auxquelles sont rajoutées les extrémités Nt et Ct de c-Myb. Effets de ces mutants sur la transformation des cellules myéloïdes. D'après Grässer et al., (1991) (DB, domaine de fixation à l'ADN; TA, domaine transactivateur, DRN, domaine de régulation négative de la transcription).

**B:** Structure des mutants ponctuels dans le motif répété R2 de v-Myb<sup>AMV</sup> et leur effets sur la transformation des cellules myéloïdes. D'après Introna et al., (1990) (h1, h2, h3, régions putativement organisée en hélice  $\alpha$ )

a d'abord été développé chez le poulet. Des virus recombinants exprimant la protéine c-Myb totale ou tronquée ont été construits et testés pour la transformation de cellules de moelle osseuse de poulet (Grässer et al., 1991) (Fig.10A). La délétion des 72 premiers ou des 143 derniers acides aminés suffit à la transformation des cellules myéloïdes. L'effet de ces délétions est additif, et se traduit en une protéine dotée d'un pouvoir transformant accru. Une délétion simple génère ainsi des promyélocytes; une délétion double des myéloblastes plus immatures (Grässer et al., 1991). La surexpression de la p75<sup>c-myb</sup> normale n'est pas transformante. Réciproquement, v-myb<sup>AMV</sup> n'est plus transformant si on lui ajoute les régions 5' et 3' codantes de c-myb. Les troncatures amino ou carboxy-terminales sont donc absolument requises pour l'activation oncogénique de la protéine c-Myb.

Les autres différences entre c-myb et v-myb<sup>AMV</sup>; l'addition de séquences gag et env à v-myb et les 11 mutations ponctuelles existant entre c-myb et v-myb<sup>AMV</sup> ne sont pas nécessaires à la transformation (Lipsick et Ibanez, 1987; Stober-Grässer et Lipsick, 1988; Grässer et al., 1991). Les 11 mutations de v-myb<sup>AMV</sup> introduites dans c-myb sont incapables d'activer son pouvoir oncogénique. Réciproquement, lorsque ces 11 mutations sont révertées pour se retrouver dans le contexte du gène cellulaire, v-myb est toujours transformant. Seule subtilité à noter, les cellules transformées ressemblent alors à des promyélocytes et non plus aux monoblastes transformés classiquement par AMV (Grässer et al., 1991). Trois acides aminés (Asparagine 91, Histidine 106 et acide aspartique 117) dans le premier motif répété de v-myb (R2 pour c-myb) sont critiques pour l'induction de ce phénotype (Introna et al., 1990) (Fig.10B). Le virus, généré après la réversion d'une seule de ces mutations est capable d'induire l'expression de *mim-1*, un gène cible de la P135<sup>Δgag-myb-ets</sup> marqueur des promyélocytes. Les cellules transformées par les 3 mutants du virus AMV, où chacun des 3 acides aminés a été remplacé par sa contrepartie cellulaire, ne sont pas identiques. Elles diffèrent par le nombre de granules dans leur cytoplasme et ont donc un phénotype promyélocytique plus ou moins prononcé. Ainsi, le remplacement de l'acide aspartique 117 par une valine comme dans c-Myb ne confère pas au mutant obtenu la capacité de transformer des cellules qui ressemblent morphologiquement à des promyélocytes. Ces cellules ne possèdent pas de granules cytoplasmiques, elles ont plutôt un phénotype de monoblastes. Les mutants, où l'asparagine 91 et l'histidine 106 ont été remplacées respectivement par une isoleucine et une leucine, transforment des promyélocytes *in vitro*, mais provoquent *in vivo* des leucémies mixtes à monoblastes et à promyélocytes (à prédominance monoblastiques). L'ensemble de ces résultats suggère donc que si les 3 mutations de R2 sont cruciales pour le phénotype des cellules transformées par AMV, d'autres régions de la molécule, comme le domaine transactivateur pourraient être aussi importantes. On peut d'ailleurs regretter que l'importance des autres mutations entre c-Myb et v-Myb<sup>AMV</sup> n'aient pas été testées dans ce modèle.

Un test de transformation cellulaire *in vitro* a été également développé chez la souris, où l'hématopoïèse est bien décrite. Les résultats dans cette espèce sont en accord avec les résultats



**Figure 11 :** L'hématopoïèse dans l'embryon d'oiseau

- granulopoïèse
- érythropoïèse primitive
- hématopoïèse définitive

obtenus chez le poulet. Des cellules de foie foetal de souris ont été infectées par des constructions rétrovirales exprimant la protéine Myb murine sauvage ou délétée de son extrémité carboxy-terminale (Gonda et al., 1989a). Dans ces deux cas des lignées myélomonocytiques sont obtenues, ce qui indique que l'expression forcée de *c-myb* est capable de transformer les cellules. Ces résultats surprenants sont à rapprocher de la description dans des leucémies humaines d'une protéine Myb surexprimée mais apparemment normale (Pelicci et al., 1984; Barletta et al., 1987; Park et Reddy, 1992). Des cellules hématopoïétiques infectées par des rétrovirus codant une protéine Myb délétée de toute la région carboxy-terminale, à partir du *leucine zipper* putatif, ont un taux de prolifération et une durée de vie plus élevés (Gonda et al., 1989b). Cet effet n'est pas observé avec des vecteurs codant la protéine c-Myb sauvage. Dans les conditions de cette étude, les troncatures carboxy-terminales du domaine transrépresseur auraient un rôle majeur dans l'activation oncogénique de la protéine Myb. Ce même groupe a observé que la capacité transformante de Myb était corrélée positivement avec la transactivation et inversement avec la répression de la transcription, indiquant que Myb transforme en augmentant l'expression de gènes cibles (Hu et al., 1991)

## 5 - Expression de *c-myb*.

### a) *c-myb* associé à un état immature ou prolifératif.

Les premières études sur ce sujet ont associé un fort taux d'expression de *c-myb* à des cellules hématopoïétiques immatures de différentes lignées, érythroïdes, myéloïdes et lymphoïdes (Gonda et al., 1982 ; Westin et al., 1982 ; Coll et al., 1983 ; Gonda et Bishop, 1983; Sheiness et Gardinier, 1984 ; Duprez et Boettiger, 1985 ; Pelicci et al., 1984 ; Slamon et al., 1986; Bender et Kuehl, 1987). Les transcrits *c-myb* ont été détectés par northern blot dans tous les organes hématopoïétiques de l'embryon de poulet (Gonda et al., 1982; Coll et al., 1983). Par la technique d'hybridation *in situ*, B. Vandebunder et coll. (1989) ont observé la transcription de *c-myb* dans les cellules hématopoïétiques très immatures de la paroi ventrale de l'aorte de l'embryon de poulet à 3 jours d'incubation. Ces cellules sont multipotentes et vont générer l'ensemble du système hématopoïétique définitif de l'oiseau (Dieterlen-Lièvre, 1988) (Fig.11). Chez l'homme, la cytofluorimétrie de flux à deux couleurs a permis de trier les cellules en fonction des marqueurs hématopoïétiques qu'elles expriment et de leur contenu en protéine Myb évalué grâce à un anticorps spécifique (Kastan et al, 1989a, b). Le niveau d'expression de c-Myb est maximal dans les cellules de moelle osseuse positives pour l'antigène CD34, un marqueur de progéniteurs myéloïdes érythroïdes et lymphoïdes B. Une quantité 3 à 4 fois moindre de protéine Myb est détectée dans les monocytes, les lymphocytes B et T et les érythroblastes. Les granulocytes et les érythrocytes

matures n'expriment pas *c-Myb* à un niveau détectable. Ces expériences ne révèlent pas de corrélation entre l'expression de *c-myb* et la prolifération cellulaire (en particulier avec le marquage pour l'antigène nucléaire Ki67 présent dans les cellules en cycle).

Une expression faible a été aussi détectée dans des tissus ou des lignées d'origine neuroectodermique (cellules de neuroblastome, cerveau foetal humain) ou endodermique (carcinomes du poumon et du colon) (Alitalo et al., 1984; Griffin et Baylin, 1985; Torelli et al., 1987; Thiele et al., 1988; Guérin et al., 1990). L'expression de *c-myb* a été également documentée dans les cellules souches carcino-embryonnaires F9, dans les cellules souches embryonnaires ES, dans les cellules musculaires lisses de la paroi des vaisseaux sanguins et dans les fibroblastes embryonnaires de poulet en prolifération (Thompson et al., 1986; Fukuda et al., 1987; Dyson et al., 1989; Reilly et al., 1989; Brown et al., 1992). Dans l'embryon de poulet, *c-myb* est exprimé dans l'épiderme en prolifération au cours de la morphogenèse de la plume (Desbiens et al., 1992). Dans ces cellules qui n'appartiennent pas au système hématopoïétique, la protéine Myb n'a jamais pu être mise en évidence. Seule H. Bading et coll. (1988) signalent la présence de la protéine Myb, localisée dans le cytoplasme dans quelques cellules humaines de l'épiderme, de follicules pileux ou de l'endomètre.

Ces études descriptives montrent une corrélation entre un taux de transcrits *c-myb* élevé et la prolifération cellulaire ou l'état indifférencié des cellules, deux processus difficilement séparables. Des expériences réalisées *in vitro* sur des lignées cellulaires dont on peut induire la différenciation, ont permis de préciser cette relation. Ainsi, l'expression de *c-myb* est supprimée au cours de la différenciation de lignées de cellules myéloïdes, érythroïdes ou de lignée de neuroblastome (Westin et al., 1982; Gonda et Metcalf, 1984; Craig et Bloch, 1984; Ramsay et al., 1986; Thiele et al., 1988; Liebermann et Hoffman-Liebermann, 1989; Hoffman-Liebermann et Liebermann, 1991). La baisse de l'expression de *c-myb* dans ces cellules précède l'arrêt de la prolifération qui accompagne la différenciation des cellules myéloïdes, suggérant un rôle de *c-myb* dans l'arrêt de la croissance cellulaire ou dans l'initiation de la différenciation. Dans la lignée myéloïde M1 et dans les cellules érythroleucémiques MEL, la suppression de la transcription de *c-myb* est même une condition préalable à l'initiation de la différenciation terminale mais pas à l'arrêt de la prolifération (Ramsay et al., 1986; Hoffman-Liebermann et Liebermann, 1991). Dans le thymus chez le poulet ou chez la souris, l'expression de *c-myb* est plus intense dans les thymocytes corticaux doublement négatifs et doublement positifs pour les marqueurs CD4 et CD8 (Fig.19). Dans ces thymocytes immatures qui prolifèrent le plus activement, l'expression de *c-myb* n'est pas liée à la prolifération mais plutôt à un stade précis de la différenciation (Mountz et al., 1984; Sheiness et Gardinier, 1984; Thompson et al., 1986; Yokota et al., 1987; Mountz et Steinberg, 1989). Ainsi des souris servant de modèles pour l'étude de maladies auto-immunes (souche MRL-1 *pr/1pr*) produisent des lymphocytes immatures (CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup>) qui expriment *c-myb* à un taux

élevé. Il s'avère que 5% de ces cellules sont en cycle, mais que 35% de ces cellules sont positives pour *c-myb*.

D'autres exemples montrent que l'expression de *c-myb* peut être associée avec la progression dans le cycle cellulaire de fibroblastes embryonnaires de poulet (CEF) stimulés par le sérum et des lymphocytes B normaux isolés de la bourse de Fabricius (Thompson et al., 1986). Dans une lignée de lymphocytes T transformés (lignée MSB-1), l'expression de *c-myb* est même augmentée de manière transitoire à chaque cycle cellulaire lorsque les cellules sont en phase exponentielle de croissance. Dans ces situations, l'accumulation des transcrits *c-myb* est maximale dans la phase S du cycle cellulaire. Dans des lymphocytes T circulants, l'expression de *c-myb* est augmentée d'un facteur 100, 16 heures après leur stimulation mitogénique par la lectine PHA (Torelli et al., 1985; Reed et al., 1986). L'interaction entre l'antigène et le récepteur à l'antigène, qui provoque le passage des cellules T de la phase  $G_0$  à  $G_1$  du cycle cellulaire n'est pas suffisante pour induire *c-myb*. L'induction de *c-myb* se fait au niveau transcriptionnel, et requiert l'interaction de l'interleukine 2 avec son récepteur à la surface des lymphocytes T auxiliaires ou cytotoxiques et leur passage de la phase  $G_1$  à S (Stern et Smith, 1986; Pauza, 1987; Shipp et Reinherz, 1987) (Fig.19). Dans la lignée lymphoïde, les événements qui contrôlent l'expression de *c-myb* sont donc totalement différents que l'on s'adresse à un précurseur immature thymique ou à un lymphocyte mature circulant activé.

#### b) Régulation de l'expression de *c-myb*.

La plupart des études sur l'expression de *c-myb* ont été basées sur la mesure du taux d'ARNm. Trois mécanismes peuvent rendre compte des taux différentiels observés: le contrôle de l'initiation de la transcription, de l'élongation des ARNm et enfin de la dégradation des ARNm.

Les régions promotrices, en amont du codon d'initiation de la traduction dans la partie 3' de l'exon UE3, ont été clonées et séquencées chez la souris (Bender et Kuehl, 1986; Watson et al., 1987), chez le poulet (Dvorak et al., 1989; Hahn et al., 1989) et chez l'homme (Nicolaidis et al., 1991), mais elles n'ont pas été encore caractérisées fonctionnellement. La comparaison de ces promoteurs a permis de dégager certaines caractéristiques conservées au cours de l'évolution. Ces promoteurs se trouvent au centre d'une région de 3kbp riche en paires du dinucléotide cytidine et guanosine appelée îlot CpG (Fig.9). Ces îlots CpG caractérisent des gènes dont la transcription serait régulable par un processus de méthylation en position 5 des cytidines. Dans l'état non méthylé, les îlots CpG permettraient de délimiter des zones du génome disponibles pour l'interaction avec des facteurs de transcription (Bird, 1992). Ce mécanisme ne permet pas de rendre compte à lui seul de l'expression différentielle de *c-myb*, même si une certaine corrélation est indéniable. Ainsi, l'îlot CpG de *c-myb* est hypométhylé dans les thymocytes très immatures des souris MRL-1 *pr/lpr*, méthylé partiellement dans les thymocytes normaux et les érythrocytes de

poulet, et méthylé totalement dans l'ADN de sperme (Evans et al., 1987; Dvorak et al., 1989). Localisé dans la région 5' non-codante de l'exon UE3, le promoteur de *c-myb* est de fait aussi "riche en GC", sans boîte TATAA ou CAAT. De nombreux sites de fixation pour le facteur de transcription Sp1 (Pugh et Tjian, 1990) ont été identifiés dans ce promoteur. 3 sites de fixation de la protéine c-Myb ont été montrés fonctionnels tant en terme de fixation (2 de ces sites ont la séquence d'un MRE canonique) qu'en terme de transactivation (Nicolaidis et al., 1991). Myb serait donc capable d'autoréguler de manière positive sa propre expression. La transcription de *c-myb* est initiée à de nombreux endroits, une quinzaine chez la souris, s'étendant sur 800bp en amont du codon d'initiation (Watson et al., 1987). Cette caractéristique est fréquente pour des promoteurs riches en GC, sans TATA box et CAAT box. Des sites hypersensibles à la digestion par la DNase I qui varient en fonction du site de départ de la transcription et du taux d'expression de *c-myb* dans les différents types cellulaires considérés ont été détectés dans le promoteur (Watson et al., 1987; Dyson et al., 1989). Le profil de fixation de facteurs nucléaires en retard sur gel est fonction de l'expression de *c-myb* dans les thymocytes des souris MRL-1 *pr/lpr* (Mountz et Steinberg, 1989). Tous ces éléments indiquent que l'initiation de la transcription de *c-myb* est sans doute régulée par des facteurs de transcription dont l'identité reste hélas obscure.

Cependant, au cours de la différenciation des cellules érythroleucémiques ou de lymphocytes B alors que l'expression de *c-myb* décroît de manière drastique, on s'aperçoit avec surprise que le taux d'initiation de la transcription de *c-myb* ne varie pas (Bender et Kuehl, 1987; Watson R.J., 1988b, Reddy et Reddy, 1989). De même le taux d'initiation de la transcription de *c-myb* n'est pas différent entre une cellule érythroleucémique, myéloïde et un fibroblaste alors que les transcrits *c-myb* y sont respectivement abondants, peu nombreux et indétectables (Todokoro et al., 1988; Watson R.J., 1988a). Cette expression différentielle de *c-myb* est due principalement à un arrêt différentiel de l'élongation de la transcription dans une région de pause de l'ARN polymérase au milieu du premier intron (entre UE3 et UE2) (Bender et al., 1987; Todokoro et al., 1988; Watson R.J., 1988a, b; Reddy et Reddy, 1989) (Fig.9). Par exemple, dans des cellules érythroleucémiques, l'élongation des trois quarts des transcrits initiés est bloquée. Des sites hypersensibles à la digestion à la DNase I ont été décrits dans ce premier intron, indiquant une structure de la chromatine altérée à cet endroit par la fixation de facteurs nucléaires (Bender et al., 1987; Mountz et Steinberg, 1989). Une séquence riche en thymidine qui rappelle la séquence impliquée dans l'arrêt de l'élongation de la transcription du gène *c-myc* est notée au début de l'intron 1 mais son importance n'a pas été investiguée (Nepveu et Marcu, 1986; Bentley et Groudine, 1988). Plusieurs sites consensus de fixation pour des facteurs de transcription sont rassemblés dans la zone d'arrêt de l'ARN polymérase. La différenciation de cellules érythroleucémiques s'accompagne d'une baisse de l'expression de *c-myb* et d'une baisse de la fixation de facteurs nucléaires dans cet intron (Reddy et Reddy, 1989). La présence d'une unité transcriptionnelle fonctionnant dans l'orientation opposée à celle de *c-myb* pourrait expliquer la

fixation de facteurs nucléaires et la présence de sites hypersensibles dans l'intron 1. Des transcrits ayant une orientation antisens par rapport aux transcrits *c-myb* ont d'ailleurs été détectés (Bender et al., 1987; Watson R.J., 1988a, b). L'initiation de la transcription antisens se fait en plusieurs endroits de l'intron 1, à un taux égal à celle de *c-myb* et son élongation est bloquée réciproquement quant l'ARN polymérase progresse dans le promoteur de *c-myb*. Néanmoins, on ne peut totalement exclure qu'une partie de ces ARN antisens soient élongués normalement et soient codants; une phase ouverte de lecture ayant une capacité codante de 206 acides aminés a été reportée chez le poulet (Hahn et al., 1989). De telles unités transcriptionnelles chevauchantes ont été décrites par exemple pour *c-myc* et le gène du récepteur aux hormones thyroïdiennes (Nepveu et Marcu, 1986; Lazar et al., 1989; Miyajima et al., 1989). Le gène *ear-1* transcrit dans l'orientation antisens à *c-erb-A* code pour un produit qui appartient comme *c-erb-A* à la famille des récepteurs nucléaires d'hormone. Alternativement, les transcrits antisens à *c-myb* pourraient être impliqués dans la régulation de la dégradation des transcrits *c-myb*. Ainsi, des ARNs antisens s'appariaient avec les transcrits codant pour le facteur de croissance *basic Fibroblast Growth Factor* et provoquent leur dégradation dans l'ovocyte du Xénope (Kimelman et Kirschner, 1989).

Un tel mécanisme pourrait expliquer la stabilité très fluctuante des ARNm *c-myb*. En plus de l'arrêt de l'élongation, la déstabilisation des ARMm est responsable de la chute de l'expression de *c-myb* au cours de la différenciation des cellules érythroleucémiques (Watson R.J., 1988b). Après l'addition de diméthyl sulfoxyde qui induit la différenciation, la demi-vie des ARNm *c-myb* passe de 2 à 1 heure. De même, l'augmentation de l'expression de *c-myb* dans les fibroblastes embryonnaires de poulet ou les lymphocytes MSB-1 lorsque l'on induit leur prolifération n'est pas due à une induction transcriptionnelle, mais est essentiellement attribuable à une stabilisation des transcrits *c-myb*, leur demi-vie passant de 30mn à plus de 3 heures (Thompson et al., 1986). Ce point de contrôle supplémentaire permet une régulation rapide du taux d'ARNm dans une cellule, plus rapide que ne le permettrait un contrôle plus traditionnel de l'initiation de la transcription.

## 6 - Fonctions de *c-myb*.

L'examen des tissus où *c-myb* était exprimé laissait présager un rôle important de *c-myb* au cours de la différenciation des cellules hématopoïétiques, mais encore fallait-il le prouver. Plusieurs approches ont été utilisées pour tenter de cerner un peu mieux le rôle de *c-myb*, le gain de fonction en apportant *c-Myb* de manière exogène, ou la perte de fonction en réduisant artificiellement son expression par des oligonucléotides antisens ou encore en détruisant totalement le gène par la technique de recombinaison homologue.



a) Manipulation de l'expression de *c-myb* *in vitro*.

Le rôle de *c-myb* au cours de la différenciation a surtout été étudié dans des cellules érythroleucémiques murines (MEL). L'expression constitutive de la forme majeure de *c-myb*, codant la p75<sup>c-myb</sup>, dans ces cellules bloque leur différenciation terminale en érythrocytes induite par le diméthyl sulfoxyde ou l'érythropoïétine (Clarke et al., 1988; Todokoro et al., 1988). L'expression d'un produit alternatif de *c-myb* délété du domaine d'activation de la transcription qui agit comme un mutant dominant négatif, est au contraire capable d'accélérer la différenciation des cellules MEL (Weber et al., 1990). *c-myb* semble agir relativement tard dans la différenciation érythroïde puisque l'expression d'un gène *myb* exogène, limitée au deux premiers jours de l'induction ne suffit pas pour inhiber la différenciation des cellules MEL (McClinton et al., 1990). L'expression constitutive de *c-myb* ne bloque d'ailleurs pas les premières étapes de la différenciation érythroïde, induction de l'histone H1' ou condensation de la chromatine (Danish et al., 1992). L'hémine, un inducteur de la différenciation des cellules MEL, peut induire l'expression de l'hémoglobine sans provoquer la différenciation terminale. *c-myb* peut supprimer cet effet. *c-myb* peut donc influencer l'expression d'un marqueur de la différenciation dans des cellules qui ne sont pas en train de se différencier (Prochownik, 1989).

Dans la lignée myéloïde, l'expression constitutive de *c-myb* bloque également la différenciation induite par l'interleukine 6 ou par le LIF (Leukemia Inhibitory Factor) (Selvakumaran et al., 1992). Ces cellules sont bloquées à un stade très immature. Elles n'expriment que transitoirement certains des gènes immédiatement induits lors de la différenciation myéloïde (*junD*, *interferon regulatory factor-1*) et jamais les marqueurs de la différenciation terminale (facteurs du complément, ferritine, lysozyme). Ces résultats sont à rapprocher de l'effet de *v-myb* des rétrovirus AMV et E26 qui sont capables d'imposer un phénotype immature à des cellules myélomonocytiques différenciées (Ness et al., 1987). Les cellules exprimant *c-myb* constitutivement sont sensibles à des agents antiprolifératifs, ce qui indique que la baisse d'expression de *c-myb* au cours de la différenciation normale n'est pas nécessaire pour l'arrêt de la multiplication des cellules. L'expression constitutive de *c-myb* leur confère néanmoins un avantage prolifératif, indiquant que *c-myb* est un régulateur à la fois de la différenciation et de la croissance des cellules (Gonda et al, 1989b).

Le rôle de *c-Myb* dans la prolifération a été démontré par l'usage d'oligonucléotides antisens capables d'inhiber sa synthèse. Une première étude a montré que ces oligonucléotides réduisaient la taille et le nombre de colonies érythroïdes, myéloïdes et mégakaryocytiques obtenues par culture de moelle osseuse humaine normale, mais ne semblaient pas perturber la différenciation des colonies résiduelles (Gewirtz et Calabretta, 1988). Les oligonucléotides *c-myb* antisens inhibent également la prolifération de diverses lignées de cellules myéloïdes et lymphoïdes

humaines ou de progéniteurs érythroïdes humains normaux à différents stades de différenciation (Anfossi et al., 1989; Furukawa et al., 1990; Venturelli et al., 1990; Valtieri et al., 1991; Citro et al., 1992). Ces expériences ne permettent toutefois pas de conclure quant à un éventuel effet sur la différenciation. L'inhibition de l'expression de *c-myb* dans les lymphocytes circulants par des oligonucléotides antisens bloque spécifiquement les cellules en fin de la phase G1 du cycle cellulaire ou en début de S, sans perturber l'expression de marqueurs de lymphocytes T activés, expression de l'interleukine 2 ou du récepteur de la transferrine (Gewirtz et al., 1989). Ce blocage s'accompagne d'une baisse des événements liés à la progression de la phase G1 à S, baisse de l'expression de l'ADN polymérase  $\alpha$  et de la kinase p34<sup>cdc2</sup>, baisse de la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome par cdc2 (Furukawa et al., 1990; Venturelli et al., 1990; Valtieri et al., 1991). Dans des fibroblastes thermosensibles pour la progression dans G1, l'expression constitutive de *c-myb* est capable de réverter ce phénotype (Venturelli et al., 1990; Travali et al., 1991a). Dans la lignée parentale, le passage à la température non permissive, provoque une baisse de l'expression de la polymérase  $\alpha$ . Dans la lignée exprimant *c-myb*, l'expression de l'ADN polymérase  $\alpha$  n'est pas affectée. Cet effet de *c-myb* sur l'expression de l'ADN polymérase  $\alpha$  ou sur d'autres gènes importants pour la réplication tels les gènes codant l'histone H3 et le Proliferating Cell Nuclear Antigen est indirect et post-transcriptionnel, peut-être médiée par une maturation plus rapide des messagers (Travali et al., 1991a). L'expression constitutive de *c-myb* dans des fibroblastes BALB/c 3T3 leur permet de pousser sans apport du facteur de croissance *Insulin-like growth factor-1*. *c-myb* ne s'exprime pas dans ces fibroblastes normaux, mais le fait qu'il puisse s'insérer dans une voie menant à l'entrée dans le cycle cellulaire, suggère que la prolifération de cette lignée est contrôlée par un membre de la famille de *c-myb*, exprimé normalement dans cette lignée (Travali et al., 1991b).

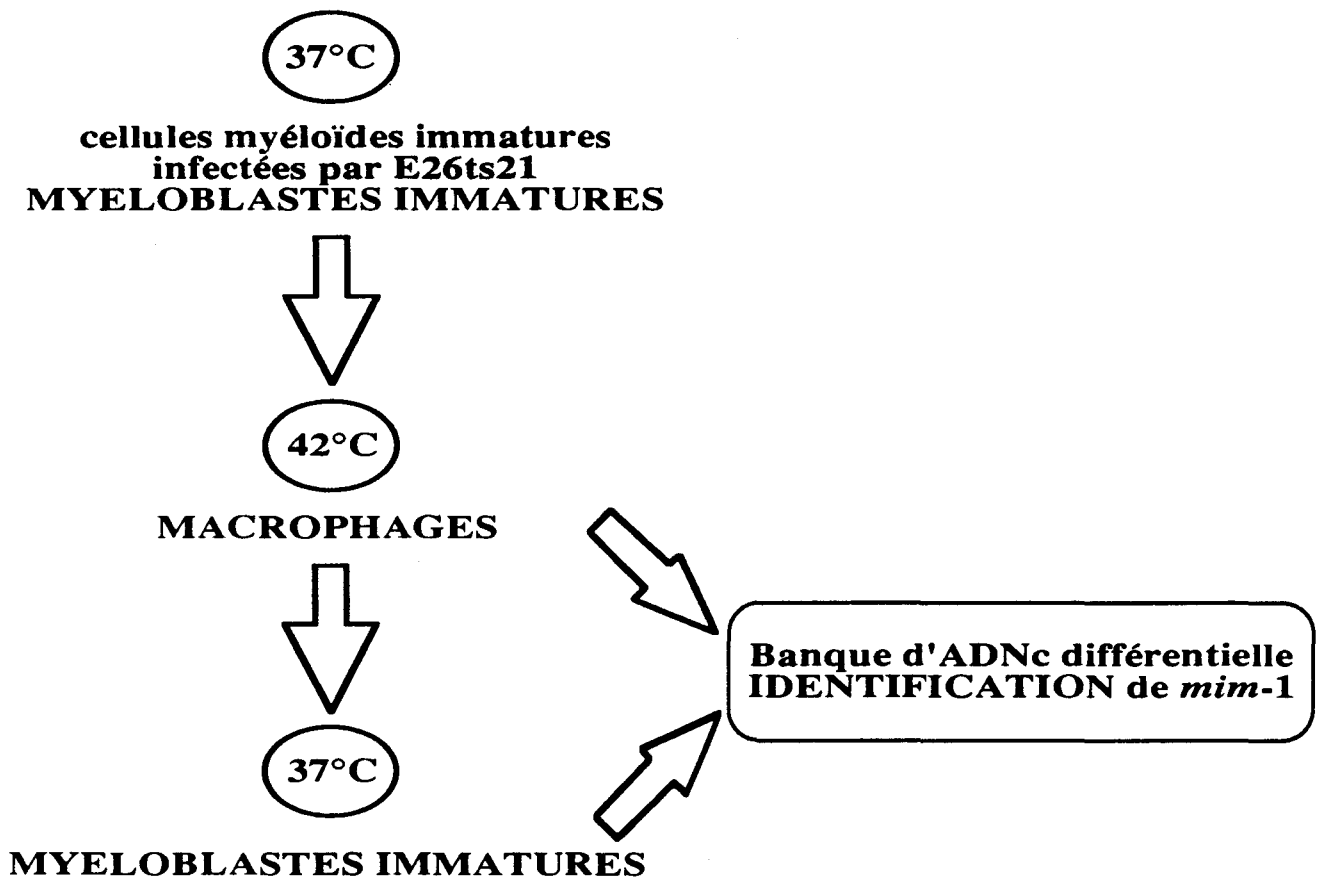
La première démonstration du rôle de *c-myb* dans une lignée non hématopoïétique a été apportée récemment par le blocage de la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires médié par des oligonucléotides antisens *in vitro* et *in vivo* (Brown et al., 1992; Simons et al., 1992). *In vivo*, la prolifération de ces cellules est provoquée par angioplastie dans la carotide de rat. Cette opération consiste à faire passer un ballonnet dans l'artère, ce qui provoque un décapage de l'endothélium et une prolifération des cellules musculaires lisses sous-jacentes. L'application d'un gel qui contient une forte concentration d'oligonucléotides antisens sur la paroi interne du vaisseau sanguin est capable d'inhiber la prolifération des cellules musculaires lisses. L'oligonucléotide sens ou antisens avec 3 mutations n'a pas d'effet. Pour la première fois, l'expression d'un gène pouvait être spécifiquement inhibée *in vivo* avec des oligonucléotides antisens. Ce cas est particulièrement intéressant puisque l'accumulation des cellules musculaires est responsable de l'échec de l'angioplastie pour le traitement à long terme de la sténose des artères coronaires. Cet effet des oligonucléotides antisens *c-myb* est absolument étonnant étant donné le

niveau faible d'expression de *c-myb* dans ces cellules; il est rassurant pour tous ceux qui s'inquiètent de la signification biologique de leur gène faiblement exprimé.

#### b) Inactivation de *c-myb* par recombinaison homologue.

L'inactivation de *c-myb* par recombinaison homologue a permis de préciser les processus biologiques où *c-myb* était requis *in vivo* au cours du développement embryonnaire (Mucenski et al., 1991). Par recombinaison homologue, des codons de terminaison de la traduction ont été introduits dans l'exon vE3 de *c-myb*. Cette mutation *myb<sup>-</sup>* génère des protéines c-Myb tronquées en amont du domaine de fixation à l'ADN. Bien que ce produit soit en théorie capable d'agir comme un mutant négatif dominant, le phénotype des souris hétérozygotes *myb<sup>+</sup>/myb<sup>-</sup>* est normal. Par contre, les souris homozygotes *myb<sup>-</sup>/myb<sup>-</sup>* meurent au 15ème jour de vie foetale par anémie. L'examen du sang ou du foie de ces souris, où a lieu l'hématopoïèse, révèle la présence d'un nombre très faible d'érythrocytes ou de progéniteurs érythroïdes de la lignée définitive. La mise en culture des cellules souches du foie révèle de plus la présence de 4 fois moins de progéniteurs myéloïdes. Le développement des souris homozygotes n'est pas perturbé jusqu'au 14ème jour de vie foetale. Avant cette date, la première vague d'érythropoïèse se passe dans le sac vitellin et elle n'est apparemment pas affectée par l'absence de gène *c-myb* fonctionnel. Vers le 13ème jour de gestation, les cellules hématopoïétiques souches quittent le sac vitellin et migrent vers le foie, s'y nichent pour donner la lignée érythropoïétique définitive. Il est probable que dans l'embryon *myb<sup>-</sup>/myb<sup>-</sup>*, ces cellules souches soient incapables de répondre de manière correcte aux signaux distribués par le micro-environnement du foie. Ces expériences montrent donc sans ambiguïté le double rôle de *c-myb* dans la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques et dans leur différenciation.

Mis à part le teint blafard des embryons homozygotes, du à l'anémie, la morphologie de ces embryons est identique à celle des témoins; cerveau, reins, poumons, bourgeons de membre semblent normaux. Ce résultat est surprenant lorsque l'on se souvient du rôle de *c-myb* dans la progression du cycle cellulaire dans des lignées ou des tissus non hématopoïétiques. On peut imaginer qu'un embryon puisse répondre avec plus de plasticité, pallier plus aisément à une déficience, que ne le feraient des cellules en culture ou un tissu adulte déjà différencié exposé à un oligonucléotide *c-myb* antisens. De plus, il est important de considérer *c-myb* comme appartenant une famille multigénique. Certains de ses membres pourraient pallier à une défaillance de *c-myb*. Ces souris homozygotes *myb<sup>-</sup>/myb<sup>-</sup>* et hétérozygotes *myb<sup>+</sup>/myb<sup>-</sup>*, ou des cellules qui en sont dérivées pourraient d'ailleurs permettre de tester l'hypothèse d'un partage de fonctions par plusieurs membres de cette famille. Plus largement, elles représentent un excellent modèle pour cerner le rôle de *c-myb*. Toutefois, elles ne permettent pas de répondre à la question: comment *c-myb* exerce-t-il son rôle? Il est plus que probable, d'après les propriétés biochimiques de c-Myb



**Figure 12 : Isolement de *mim-1***

que ce rôle s'exerce par la modulation de l'expression de gènes cibles et ne pourra être totalement compris sans leur identification.

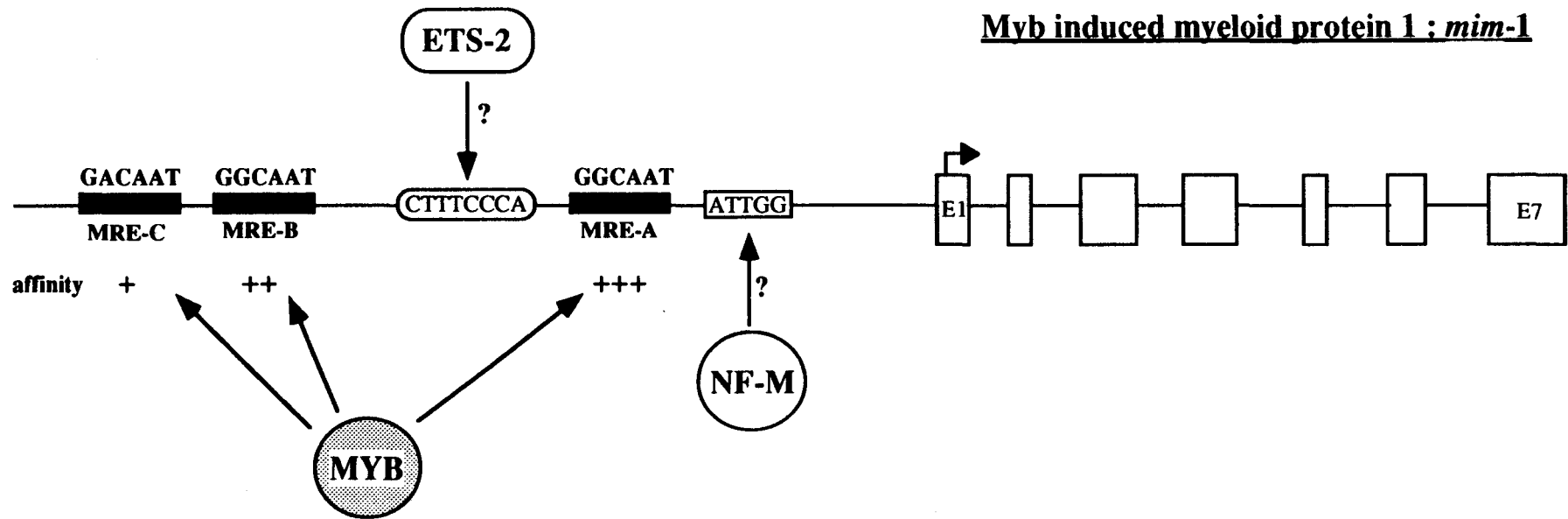
## 7 - *mim-1*, un gène cible de Myb.

### a) Isolement et caractérisation.

*mim-1*, pour *Myb Induced Myeloid protein-1*, a été isolé par S. Ness, A. Marknell et T. Graf au LEBM à Heidelberg. C'est le premier gène cible d'une protéine Myb qui ait été caractérisé (Ness et al., 1989). *mim-1* a été isolé grâce à une stratégie de banque différentielle d'ADNs complémentaires (Fig.12). Le virus *ts 21 E26* qui porte une mutation dans le domaine de fixation à l'ADN de v-Myb<sup>E26</sup> est thermosensible pour la transformation myéloïde (Beug et al., 1984; Frykberg et al., 1988; Li et al., 1989). Il transforme des myéloblastes à la température permissive de 37°C. Lorsque ces myéloblastes sont portés à la température non permissive de 42°C, ils se différencient en macrophages, car v-Myb<sup>E26</sup> est inactivé. Cette différenciation est réversible; v-Myb<sup>E26</sup> est réactivable à 37°C et on obtient de nouveau des myéloblastes immatures transformés (Beug et al., 1987). L'hybridation différentielle a été réalisée entre ces deux populations cellulaires. L'expression d'un des clones obtenus, appelé ensuite *mim-1*, était élevée dans les myéloblastes immatures et réduite dans les macrophages après le passage à 42°C, elle répondait donc aux critères d'un gène cible putatif de la P135 $\Delta$ *gag-myb-ets*.

*mim-1* comprend 7 exons, transcrits en un ARNm de 1kb. Cet ARNm code pour une protéine de 35kD, qui peut être clivée en deux sous-unités semblables de 15 et 18kD. Ces protéines sont secrétées et présentent des analogies lointaines avec des peptides bactéricides, appelés défensines, produits par les granulocytes des mammifères (Introna et al., 1990; Lehrer et al., 1991). L'existence d'un véritable homologue de *mim-1* chez les mammifères n'a par contre pas pu être démontrée.

Les transcrits *mim-1* sont détectés dans la moelle osseuse de poulet adulte dans des granulocytes immatures, ou promyélocytes. Leur expression y est maximale, puis décroît lors de la différenciation terminale des granulocytes. En culture de moelle, les transcrits *mim-1* sont détectés dans une phase de cellules non adhérentes, riche en promyélocytes, mais sont absents des cellules adhérentes constituée principalement de macrophages. L'expression de *mim-1* est induite très fortement dans les cellules myéloïdes, mais pas dans les cellules érythroïdes transformées par E26, ce qui suggère qu'une simple expression de la P135 $\Delta$ *gag-myb-ets* ne suffit pas pour induire l'expression de *mim-1* (Ness et al., 1989). Ce résultat est surprenant si on le compare à ceux obtenus dans la système des neurorétines qui expriment *mim-1* lorsqu'elles sont transformées par E26 (Garrido et al., 1992b). Les ARNm *mim-1* ne sont pas détectés dans les monoblastes



**Figure 13 : régulation de l'expression de *mim-1*.**

transformés par AMV, bien que la p48<sup>v-myb</sup>AMV soit capable de transactiver le promoteur de *mim-1* en test de cotransfection. *mim-1* est par contre exprimé dans les cellules myéloïdes transformées par des mutants de v-Myb<sup>AMV</sup>, où au moins une des mutations (par rapport à c-Myb) dans le 2ème motif répété du domaine de fixation à l'ADN a été révertée. Il suffit en effet de changer la valine 91 en asparagine, ou l'histidine 106 en leucine, ou l'acide aspartique 117 en valine pour que ces mutants de AMV soient capables d'induire l'expression de *mim-1 in vivo* (Introna et al., 1990; Grässer et al., 1991) (voir paragraphe activation oncogénique de c-Myb, Fig.10B). Le fait que *mim-1* soit exprimé de manière différentielle dans des populations de cellules transformées par E26 ou AMV suggère qu'il ne soit pas requis pour la transformation cellulaire. Ses caractéristiques (expression, homologie avec les défensines) en font plutôt un marqueur de la différenciation de la lignée myéloïde.

#### b) Régulation de l'expression de *mim-1*.

Le promoteur de *mim-1* a été cloné (Fig.13). Il contient trois séquences consensus de fixation pour les protéines Myb (MRE), regroupées dans 80bp en amont d'une boîte CAAT (Ness et al., 1989). Lorsque ce promoteur est cloné en amont d'un gène reporter codant la luciférase de luciole et cotransfecté avec un vecteur qui guide l'expression de la P135 $\Delta$ gag-myb-ets, la transcription du gène *reporter* est activée seulement si les MREs n'ont pas été délétés. Le MRE-A, qui correspond à la séquence optimale de fixation, est effectivement celui qui est capable de conférer le maximum de transactivation lorsqu'il est concatémérisé en amont du gène de la luciférase. Les MRE-B et C sont moins affines et moins efficaces dans les tests de transactivation. L'expression constitutive de la P135 $\Delta$ gag-myb-ets dans des HD11, une lignée de macrophages de poulet, qui n'expriment pas normalement *mim-1*, est capable d'induire *in vivo* la transcription de ce dernier. Ces solides arguments ont permis d'établir la fonction transactivatrice de la P135 $\Delta$ gag-myb-ets et de conférer à *mim-1* le statut de premier gène cible de E26. La p75<sup>c-myb</sup> et la p89<sup>c-myb</sup>-E6A transactivent (faiblement) le promoteur de *mim-1* qu'il soit exogène, en cotransfection, ou endogène (Dudek et al., 1992; Foos et al., 1992; Quéva et al., 1992). Une plus forte activation de la transcription de *mim-1* est observée si l'on cotransfecte le vecteur exprimant c-Myb et un vecteur exprimant c-Ets-2 (Dudek et al., 1992). La protéine c-Ets-2 se fixe de manière spécifique sur le promoteur de *mim-1*, mais ne le transactive pas sans la présence de c-Myb. Le mécanisme de la coopération entre c-Ets-2 et c-Myb n'est pas encore compris et ne semble pas impliquer ni de synergie pour la fixation à l'ADN, ni une interaction entre ces deux protéines. Il est important de noter pour ce qui nous préoccupe que la p75<sup>c-myb</sup> et la p54<sup>c-ets-1</sup> ne coopèrent pas pour activer la transcription de *mim-1*. Le facteur NF-M (*Nuclear Factor-Myeloid*), isolé récemment par l'équipe d'A. Leutz semble capable de transactiver le promoteur de *mim-1 in vitro* (Sterneck et al., 1992). NF-M, qui régule également l'expression du c-MGF, et qui semble exprimé spécifiquement dans la

lignée myéloïde, est homologue au facteur de transcription à *leucine zipper*, C/EBP (CAAT Element Binding Protein).

Ces résultats ont permis de définir un réseau de facteurs de transcription qui régulent l'expression de *mim-1* *in vitro*. Il était important et intéressant de préciser les relations entre ces facteurs et leur gène cible *in vivo*. Nous avons donc choisi de décrire en parallèle l'expression de *c-myb* et de *mim-1* au cours du développement embryonnaire du poulet.



## **B - Résultats - Publication 1**

### **Etude de l'expression de *c-myb* et de *mim-1* au cours du développement de l'embryon de poulet.**

Après la publication princeps décrivant l'isolement de *mim-1* (Ness et al., 1989), plusieurs questions restaient en suspens. Tout d'abord, il n'était pas établi que c-Myb puisse réguler l'expression de *mim-1*. P135 $\Delta$ *gag-myb-ets* aurait pu fort bien induire l'expression de gènes qui ne sont pas régulés normalement par c-Myb dans les promyélocytes. Si c-Myb était effectivement capable de réguler l'expression de *mim-1 in vitro*, il fallait de plus démontrer qu'il était capable de le faire *in vivo*. Enfin, les données étayant l'expression de *mim-1* au cours de la différenciation granulopoïétique étaient peu fournies; une description plus approfondie aurait pu donner des indications sur la fonction de *mim-1* au cours de ce processus.

Pour répondre à ces questions, notre travail s'est scindé en deux parties. Dans un premier temps, en collaboration avec S. Ness et T. Graf, nous avons démontré que c-Myb pouvait réguler l'expression de *mim-1 in vitro*. Dans un second temps, *in vivo*, nous avons décrit l'expression de *c-myb* et de *mim-1* au cours du développement embryonnaire du poulet grâce à la technique d'hybridation *in situ*. Les transcrits *c-myb* et de *mim-1* s'accumulent dans la rate et le pancréas au moment où a lieu la granulopoïèse. Par contre, *mim-1* est transcrit en absence de *c-myb* dans des précurseurs granulocytiques du sac vitellin et de la bourse de Fabricius, ce qui suggère que d'autres facteurs que c-Myb sont capables de réguler la transcription de *mim-1*.

### **COMMENTAIRES SUR LES METHODES :**

Les tests de transactivation du promoteur de *mim-1* ont été réalisés par S. Ness. Le protocole figure dans notre première publication (Quéva et al., 1992).

Devoir détecter les transcrits *mim-1*, présents en large abondance dans les cellules, nous a permis de mettre au point les conditions expérimentales de l'hybridation *in situ*. La difficulté résidait en ce que nous voulions utiliser des sondes ARN simple brin marquées par incorporation de  $\alpha$ -S<sup>35</sup>-CTP. Ces sondes sont plus énergétiques, plus sensibles et permettent de raccourcir le temps d'autoradiographie à 15 jours, contre 3 mois avec des sondes marquées au tritium. Ces sondes ont par contre la fâcheuse tendance de se coller de manière aspécifique, ce qui génère un bruit de fond élevé. Le détail du protocole, que nous avons mis au point, se trouve dans la première publication (Quéva et al., 1992). Les sondes ribonucléiques sont synthétisées à partir d'un fragment cloné en amont d'un promoteur pour une ARN polymérase de bactériophage. Leur spécificité a été auparavant vérifiée en northern blot. Les sondes *c-myb* et *mim-1* n'hybrident en

conditions stringentes qu'avec des ARNm de 4kb et 1kb respectivement. Deux types de fragments ont été utilisés pour synthétiser les sondes *c-myb*: un fragment de 350bp dans la région 3' de *v-myb*<sup>E26</sup> (Leprince et al., 1983a) et un ADNc *c-myb* de 3kbp (Gerondakis et Bishop, 1986). Ces deux types de sondes sont capables en théorie d'hybrider avec les différents transcrits alternatifs du locus *c-myb* si ceux-ci sont présents chez le poulet. Il faut donc souligner que la détection d'un signal d'hybridation ne permet pas de préjuger ni de l'efficacité de la traduction de la protéine, ni de sa forme définitive. Les sondes longues de 3kb sont capables également d'hybrider sur une centaine de bases avec des transcrits putatifs s'arrêtant dans l'intron 1, contrairement aux sondes plus courtes. Ce type de régulation n'a pas été démontré chez le poulet. La contribution des transcrits avortés au signal d'hybridation sera faible parce que le signal d'hybridation *in situ* est proportionnel à la longueur de la sonde hybridée à l'ARNm dans la cellule. Des transcrits plus courts ne sont pas détectés en northern blot avec la sonde de 3kb (résultats non publiés). Les cartes d'expression de *c-myb* ne sont pas non plus différentes qu'elles soient obtenues avec les sondes de 350b ou de 3kb. Le signal plus intense obtenu avec ces dernières étant probablement dû à leur taille plus importante et donc à leur meilleure sensibilité.

## Expression patterns of *c-myb* and of *v-myb* induced myeloid-1 (*mim-1*) gene during the development of the chick embryo

CHRISTOPHE QUÉVA<sup>1,\*</sup>, SCOTT A. NESS<sup>2</sup>, FREDERICH A. GRÄSSER<sup>3</sup>, THOMAS GRAF<sup>2</sup>,  
BERNARD VANDENBUNDER<sup>1</sup> and DOMINIQUE STÉHELIN<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INSERM U186/CNRS URA1160, Institut Pasteur, 1 rue Calmette, 59019 Lille, France

<sup>2</sup>Differentiation Program, EMBL, Meyerhofstrasse 1, 6900 Heidelberg, Germany

<sup>3</sup>Department of Microbiology, State University of New York, Stony Brook, NY 11794, USA

\*Corresponding author

### Summary

The *v-myb* oncogene of the acute avian leukemia virus E26 encodes a transcription factor that directly regulates the promyelocyte-specific *mim-1* gene (Ness, S.A., Marknell, A. and Graf, T. *Cell*, 59, 1115-1125). We have investigated the relationship between the *c-myb* proto-oncogene and the transcription of the *mim-1* gene both *in vitro* and *in vivo*. We demonstrate that the *c-myb* protein can transactivate the transcription of *mim-1* in a transient transfection assay.

In the chick embryo, we confirm that *mim-1* is specifically expressed during granulopoiesis and we show that the expression of *c-myb* and *mim-1* are perfectly correlated in the granulocytic spleen and pancreas. However we suggest that *mim-1* is efficiently

transcribed in the absence of *c-myb* in the yolk sac and in the promyelocytes at the onset of the colonization of the bursa of Fabricius. On the other hand *c-myb* transcripts detected in the early hemopoietic progenitor cells, in lymphoid cells and in proliferative epithelia are never associated with *mim-1* transcription.

We conclude that the granulocyte-specific *mim-1* gene is regulated by *c-myb*-dependent and *c-myb*-independent mechanisms depending upon the environment in which granulocytic precursor cells differentiate.

Key words: *c-myb*, granulopoiesis, *in situ* hybridization, *mim-1*, transcription factor.

### Introduction

The avian myeloblastosis virus AMV and the avian leukemia virus E26, which have independently transduced the nuclear oncogene *v-myb* (Roussel et al., 1979), induce myeloid leukemias in chickens and transform hemopoietic cells *in vitro* that have distinct myeloid phenotypes (for review see Moscovici and Gazzolo, 1982). The *v-myb* gene of E26 virus is fused to a second oncogene, *v-ets*, which confers upon it the ability to transform erythroid progenitor cells and to induce an erythroleukemia in chickens (Radke et al., 1982; Golay et al., 1988; Nunn and Hunter, 1989). The *c-myb* proto-oncogene from which the two forms of *v-myb* arose is expressed at high levels predominantly in immature hemopoietic cells including those of the erythroid, lymphoid and myeloid lineages (Gonda et al., 1982; Westin et al., 1982; Coll et al., 1983). The expression of *c-myb* declines as these cells mature (Craig and Block, 1984; Gonda and Metcalf, 1984; Duprey and Boettiger, 1985; Liebermann and Hoffman-Lieberman, 1989). *c-myb* itself appears to control this differentiation process since the expression of

exogenous *c-myb* or *v-myb* can block or reverse the differentiated phenotype of various hemopoietic cells (Ness et al., 1987; Clarke et al., 1988; Todokoro et al., 1988; McClinton et al., 1990). In addition, *c-myb*-specific antisense oligonucleotides have been used to inhibit the growth of hemopoietic progenitor cells (Gewirtz and Calabretta, 1988). Together these results suggest that the *c-* and *v-myb* genes encode proteins that regulate the phenotype of normal and transformed hemopoietic cells, respectively.

A number of shared biochemical properties have implicated the *v-myb* and the *c-myb* gene products as potential regulators of transcription. Both the *v-myb* and the *c-myb* proteins are localized in the nucleus (Boyle et al., 1984; Klempnauer et al., 1984) and bind DNA *in vitro* (Moelling et al., 1985). The DNA-binding domain of the *v-myb* proteins is composed of two imperfectly conserved 52 amino acid direct repeats located near the amino terminus (Gerondakis and Bishop, 1986; Rosson and Reddy, 1986; Klempnauer and Sippel, 1987). It corresponds to a truncated version of the one found in chicken *c-myb* and in several *myb*-related DNA-binding proteins isolated from species as

diverse as mammals, insects and plants (for review see, Lüscher and Eisenman, 1991). A consensus DNA-binding sequence for *v-myb* protein was identified by comparing random fragments of cellular DNA that were bound by a bacterially synthesized form of the AMV *v-myb* protein (Biedenkapp et al., 1988). Since then, several laboratories have shown that concatemers of this consensus sequence can confer *v-myb* and *c-myb*-dependent inducibility to a variety of otherwise unresponsive test promoters (for review see Lüscher and Eisenman, 1991 and also Klempnauer et al., 1989; Sakura et al., 1989; Weston and Bishop, 1989; Ibanez and Lipsick, 1990).

Recently Ness et al. (1989) identified a new gene *mim-1* (for *myb* induced myeloid protein-1) which is directly regulated by the product of the E26 *v-myb* gene. *mim-1* was isolated using a differential hybridization strategy in myeloid cells transformed by a temperature-sensitive mutant of the E26 virus (Beug et al., 1984, 1987; Frykberg et al., 1988). The promoter of *mim-1* contains three *v-myb* responsive elements and can be transactivated by the E26 *v-myb* protein. *mim-1* is specifically expressed in normal, immature granulocytes and encodes a  $35 \times 10^3 M_r$  secretable component of the granules found in such cells. When these promyelocytes undergo terminal differentiation into neutrophil granulocytes, the level of *mim-1* protein decreases.

Since this former study was achieved with the E26 *v-myb* protein, it was essential to investigate the relationship between *c-myb* and *mim-1*. We demonstrate that *c-myb* can transactivate an exogenously added or the endogenous *mim-1* promoter. Using *in situ* hybridization, we have also undertaken a comparative description of the expression pattern of *c-myb* and *mim-1* throughout the development of the chick embryo. *c-myb* and *mim-1* are coexpressed during granulopoiesis in the pancreas and the spleen. Surprisingly, *mim-1* is efficiently transcribed in the absence of *c-myb* in the yolk sac and in the promyelocytes at the onset of the colonization of the bursa of Fabricius, indicating that factors other than *c-myb* might regulate *mim-1* gene transcription.

## Materials and methods

### *Cotransfection and transactivation assays*

Transfection of HD-11 cells with a plasmid containing 240 bp of the promoter plus the first exon of the *mim-1* gene fused to the firefly luciferase reporter gene has been described previously (Ness et al., 1989), as well as the E26 *v-myb* expression vector (Introna et al., 1990). The expression vector for *c-myb* (kindly provided by J. Lipsick) was derived from pMAV-NEO (Ibanez and Lipsick, 1990) and will be described in detail elsewhere. Published procedures were used for assays of luciferase (De Wet et al., 1987) and  $\beta$ -galactosidase (Herbomel et al., 1984). For northern blots, total RNA from transfected HD-11 cells was prepared, fractionated on formaldehyde-agarose gels, transferred to Genescreen (NEN-Du Pont) and then hybridized to radiolabeled probes specific for *mim-1* (exposure 3 days) (Ness et al., 1989) or  $\beta$ -actin (exposure 4 hours) (Kost et al., 1983) using standard methods (Maniatis et al., 1982; Feinberg and Vogelstein, 1983).

### *Probes*

We attempted first to detect *c-myb* transcripts using a 350 bp *EcoRI-Sall* fragment containing the major part of *v-myb* from a molecularly cloned E26 provirus (LePrince et al., 1983). However, unless otherwise stated, all the results presented in this paper have been obtained with a full-length (3 kb) chicken *c-myb* cDNA cloned in the plasmid pSG3 (Gerondakis and Bishop, 1986). The *mim-1* probe derives from a 869 bp *mim-1* partial cDNA fragment cloned in Bluescript SK minus (Stratagene).

The specificity of the probes was demonstrated using northern blot analysis of total RNA from different organs (yolk sac, bursa of Fabricius, liver, thymus, spleen and gut) of E10 embryos. Although both *c-myb* probes used in this study encompass the DNA-binding domain which is well conserved in the *myb* gene family, under stringent conditions they hybridize only with the 4.0 kb mRNA species which correspond to the expected size for *c-myb* transcripts (Coll et al., 1983) (data not shown). Hybridization of probes with tissue sections has been always carried out under stringent conditions, at 60°C, followed by RNAase treatment which removes mismatched hybrids. On northern blots, the *mim-1* probe hybridizes with a major band of 1.0 kb (Ness et al., 1989) (data not shown).

RNA probes were transcribed from truncated plasmids by the SP6, T7 or T3 RNA polymerase (Promega Biotec) using  $\alpha$ - $^{35}$ S-CTP ( $\sim 1300$  Ci/mmol NEN).

### *Tissue preparation*

The eggs of brown Leghorn chicken were incubated at 37°C in a humidified air chamber. The age of the embryos is indicated as E1, E2 etc..., E0 being the first day of incubation. Embryos or dissected organs were fixed at 4°C for 16 h in 4% paraformaldehyde in PBS containing 5 mM MgCl<sub>2</sub>, dehydrated and embedded in paraffin. 4  $\mu$ m thick transverse sections were transferred to either poly-L-lysine or 3-aminopropyltriethoxysilane (TESPA; Aldrich)-coated slides and dried at 42°C for two days. Slides may be stored at 4°C for up to 1 year before hybridization.

### *In situ hybridization*

Prehybridization treatments were performed essentially by the method of Cox et al. (1984). After deparaffinization and hydration, slides were incubated in 0.1 M glycine, 0.2 M Tris-HCl, pH 7.4 for 10 min at room temperature, treated with 1  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> proteinase K (Boehringer-Mannheim) for 15 min at 37°C and further fixed in 4% paraformaldehyde in PBS. The slides were subsequently washed in PBS, acetylated and dehydrated.

Prior to hybridization, the probes were diluted in the hybridization buffer [50% deionized formamide, 0.3 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.9), 5 mM EDTA, 10% dextran sulfate, 1 $\times$ Denhardt's solution, 0.5 mg ml<sup>-1</sup> *E. coli* tRNA and 100 mM dithiothreitol] and denatured at 80°C for 2 min. A low level of background and a highly specific signal were obtained when the hybridization was performed at 60°C for 16 h with a probe concentration of 50 pg  $\mu$ l<sup>-1</sup>. Thereafter, the slides were washed in 4 $\times$ SSC, 10 mM dithiothreitol for one hour, and in 50% formamide, 0.15 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.9), 5 mM EDTA, 100 mM dithiothreitol at 65°C for 30 min as described in Angerer et al. (1987). The sections were subsequently treated with 20  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> RNAase A (type III A, Sigma) for 30 min to one hour at 37°C in 0.4 M NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.05 M EDTA, incubated 15 min at 60°C in 2 $\times$ SSC and 15 min at 60°C in 0.1 $\times$ SSC. The slides were

dehydrated and dipped in a nuclear track emulsion (Kodak NTB2) diluted 1:1 with 0.6 M ammonium acetate.

The slides were exposed at 4°C for one to three weeks and developed according to the recommendations of Cox et al. (1984). Labeling with the Hoechst dye 33258 (bisbenzimidine) was performed to visualize the nuclei. The sections were examined under dark-field and epifluorescence illumination with a Zeiss microscope (IM35). We have always used on serial sections in parallel with the antisense probes *c-myb* and *mim-1* sense probes that never gave any signal.

## Results

### *The mim-1 promoter can be transactivated by the product of the c-myb gene*

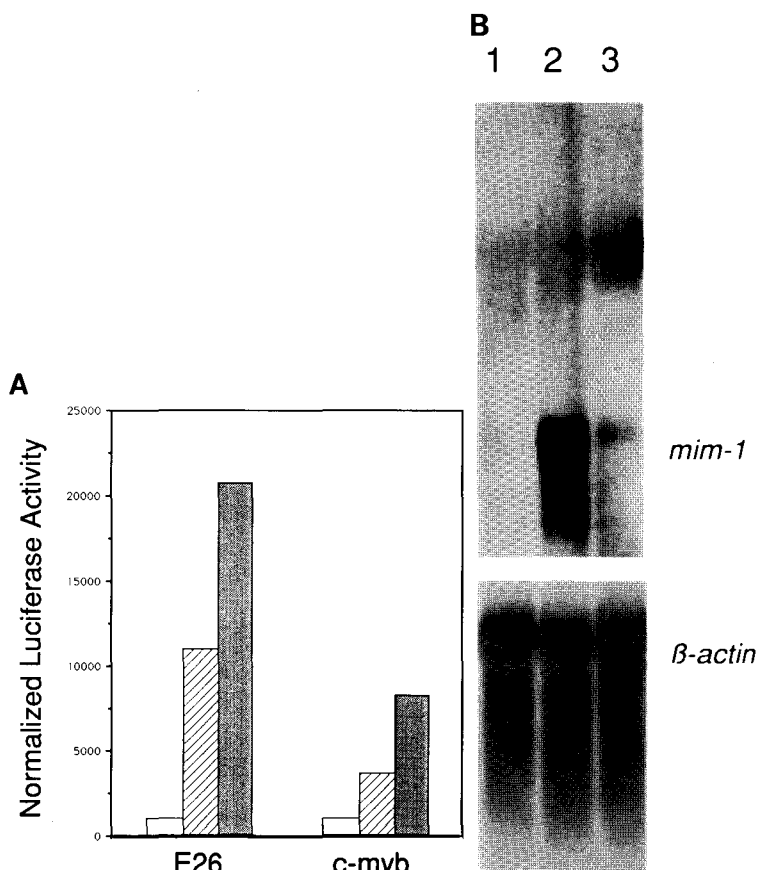
To determine whether the *c-myb* gene product can activate the *mim-1* promoter in chicken myeloid cells, we used a transient expression assay in the chick macrophage cell line HD11 (Ness et al., 1989). Cotransfection of plasmids expressing *c-myb* as well as E26 *v-myb* proteins greatly stimulated the luciferase activity in cells transfected by the *mim-1* promoter-luciferase constructs (Fig. 1A), but had little or no effect on control plasmids lacking *mim-1* promoter sequences (data not shown).

In the same HD11 cell line, we have also investigated whether the *c-myb* gene product could activate the endogenous (chromosomal) *mim-1* gene. Two days after transfection, total cellular RNA was purified and analyzed after northern blotting. The cells transfected with plasmids expressing the *c-myb* or the E26 *v-myb* protein did express *mim-1* (Fig. 1B). In contrast no *mim-1* mRNA was detected in untransfected HD-11 cells or in cells transfected with control plasmids. These results indicated that *c-myb* as well as E26 *v-myb* can transactivate the *mim-1* promoter. Both with the plasmid containing *mim-1* promoter and with the chromosomal *mim-1* gene, E26 *v-myb* worked better than *c-myb*. This may be due to a difference in the efficiency of expression of the two *myb* proteins in transfected cells because the two expression vectors were different. Alternatively, the E26 *v-myb* protein may be a better transactivator than the *c-myb* protein. In any case, this difference was not due to the presence of *v-ets* in E26 since an E26 construct with *v-ets* deleted or with the AMV construct worked as well as the wild-type E26 (data not shown).

These experiments have been made with the E26 form of *v-myb*. The AMV form activates the luciferase construct, but is unable to turn on the endogenous *mim-1* gene (Ness et al., 1989). This suggests that the regulation of the endogenous *mim-1* gene is complex, and dependent on *v-myb*-specific factors. To contribute towards a better understanding of the role of the *c-myb* protein in regulating *mim-1* expression, we have undertaken a comparative study of the pattern of expression of *c-myb* and *mim-1* during the chick ontogeny.

### *The expression of c-myb precedes the expression of mim-1 during the early stages of hemopoiesis*

At the beginning of the development of the chick



**Fig. 1.** The *mim-1* gene can be activated by either *v-myb* or *c-myb*. (A) The *mim-1* promoter-luciferase reporter plasmid construct was cotransfected into HD-11 cells without (open bars) or with either 200 or 600 ng (hatched and shaded bars, respectively) of plasmids that encode either E26 *v-myb* or *c-myb* as indicated. In each case, the pRSV- $\beta$ -gal plasmid was included as an internal control. Luciferase activities shown are the means from assays of duplicate plates, normalized to  $\beta$ -galactosidase levels. (B) Northern blot analysis of HD-11 cells transfected with lane 1, pRSV- $\beta$ -gal only; lane 2, as lane 1 plus the E26 *v-myb* expression plasmid; lane 3, as lane 1 plus the *c-myb* expression plasmid. Each lane contained 10  $\mu$ g of total RNA. The blot was hybridized first with the radiolabeled *mim-1* cDNA, then stripped and rehybridized with a probe specific for  $\beta$ -actin.

embryo, the first blood cells belong to the erythroid lineage and are produced in the yolk sac. There, aggregates of cells called blood islands are found attached within the lumen of blood vessels and give rise to the first generation of erythroblasts between day 2 and 5 of incubation (Dieterlen-Lièvre, 1988). In the chick blastoderm from E2 to E6, a few cells within these blood islands expressed *c-myb* (data not shown). No signal was observed with the *mim-1* probe on these structures until E3. Later, some isolated cells labeled with the *mim-1* probe were found in the yolk sac (data not shown).

In the 3- to 4-day avian embryo, after the first wave of erythropoiesis which occurs in the yolk sac, multipotent hemopoietic progenitor cells emerge in the ventrola-

teral wall of the aorta (Dieterlen-Lièvre and Martin, 1981; Dieterlen-Lièvre, 1984). The *c-myb* probe detected a high signal on these intraembryonic hemopoietic cells in the periaortic clusters (Fig. 2A). In contrast, these clusters were negative with the *mim-1* probe (Fig. 2B) and only a few wandering cells dispersed in the embryo displayed an intense labeling at E3 (data not shown).

At E6, erythroid and myeloid progenitors become numerous in the dorsal mesentery and they assemble into dense foci around blood vessels (Dieterlen-Lièvre and Martin, 1981). Various patterns of expression of *c-myb* and *mim-1* were observed over these hemopoietic foci, presumably depending on the commitment of the hemopoietic cells and on the progression of these cells into a differentiation pathway. Erythrocytes, which could be easily recognized by their lenticular shape and their refringent cytoplasm, were not labeled. Fig. 3A illustrates a section through a cluster of hemopoietic cells that hybridized with the *c-myb* probe. On the neighboring section, only a few cells were intensely labeled with the *mim-1* probe (Fig. 3B). A detailed examination of numerous hemopoietic foci revealed that *mim-1* displayed two levels of expression, faint all over the foci and high in some isolated cells (Fig. 3D,E,F).

In some places where the cells were more loosely arranged, there was a good correlation between the expression of *c-myb* and *mim-1*. Figs 4A and B illustrate cells expressing both *c-myb* and *mim-1*.

These intraembryonic precursor cells probably emigrate into the rudiments of the hemopoietic organs (yolk sac, spleen, thymus, bursa of Fabricius) where they initiate hemopoiesis (Dieterlen-Lièvre, 1988). After 9 days of incubation, the decrease of diffuse intramesodermal hemopoiesis follows the initiation of the blood-forming activity in the hemopoietic organs.

*In the yolk sac the c-myb and mim-1 transcripts are not expressed in the same cells*

The haemopoietic stem cells that emerge in the ventrolateral wall of the aorta within the embryo at E3 later colonize the yolk sac where they form secondary blood islands. There they give rise to the definitive strain of erythroblasts and to myeloid cells (Dieterlen-Lièvre, 1988). Three stages of development have been investigated, E10, E12 and E14, which gave similar results. The *c-myb* proto-oncogene was transcribed within the bulk of some blood islands in dividing cells which had characteristic small, round and strongly fluorescent nuclei upon staining with the intercalating dye bisbenzimidazole (Fig. 5A). In contrast *mim-1* transcripts were detected extravascularly, outside of these blood islands, in more mature myeloid cells characterized by a large polymorphic and weakly fluorescent nucleus (Fig. 5B). Therefore, surprisingly, we detected *mim-1* transcripts in promyelocytes which were negative with the *c-myb* probe. Whether these promyelocytes arise from a common erythroid and myeloid precursor present in the blood island or emerge extravascularly is still an open question. However, we

showed here that the onset of *mim-1* transcription did not coincide with the transcription of *c-myb* during hemopoiesis in the yolk sac. This prompted us to study the expression of *c-myb* and *mim-1* in the intraembryonic hemopoietic organs where the location of the major hemopoietic events has been more precisely delineated.

*In the pancreas and in the spleen c-myb and mim-1 are specifically expressed during granulopoiesis*

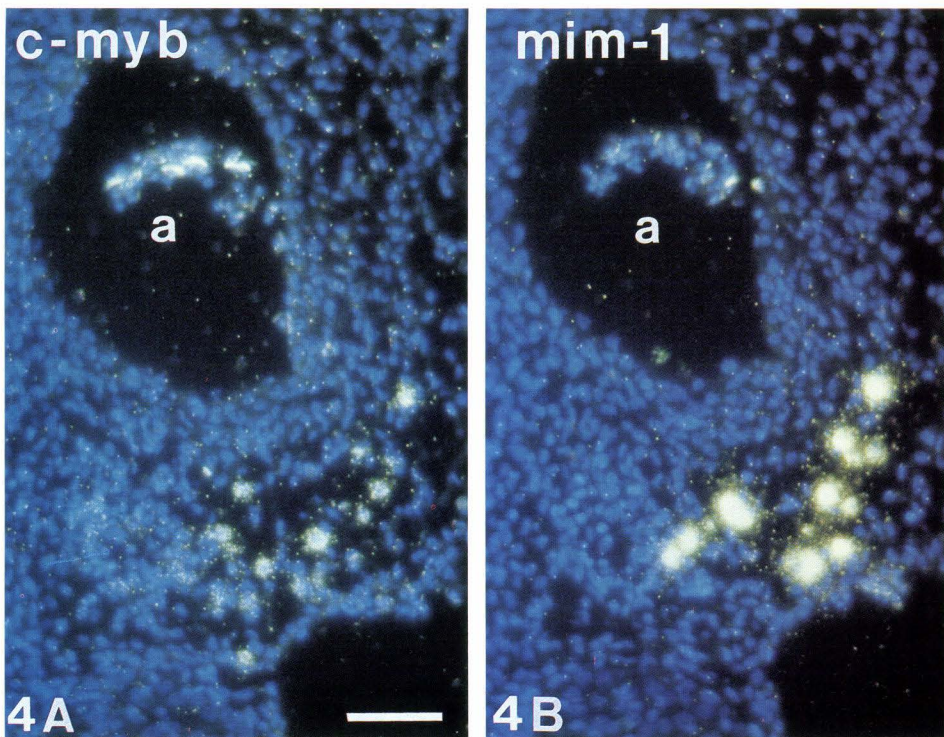
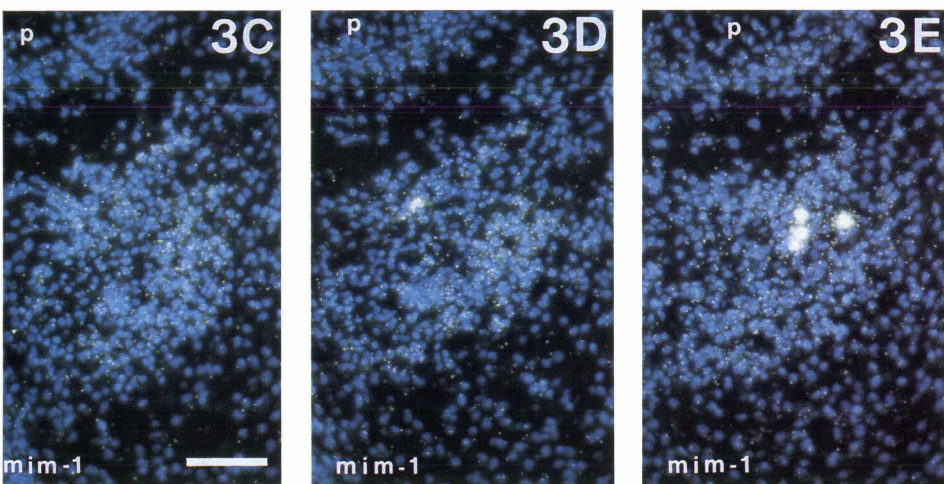
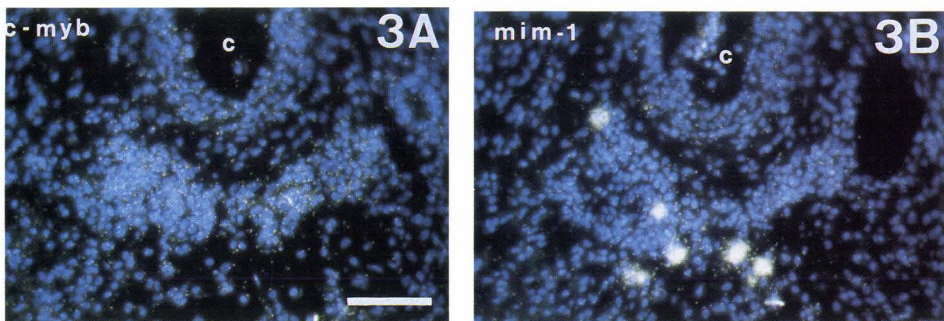
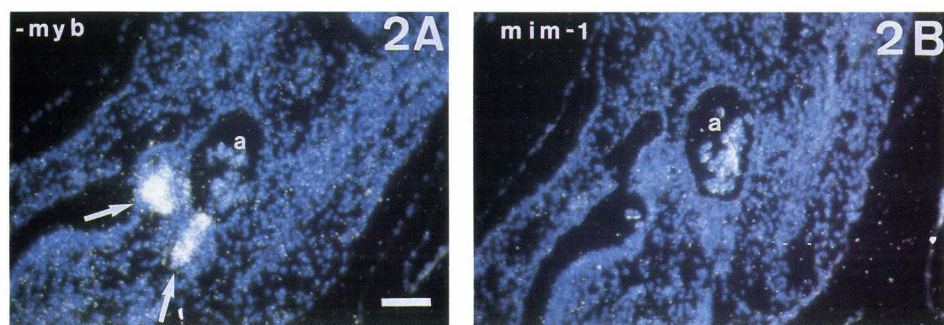
Between the seventh and the ninth day of incubation, granulopoiesis occurs transiently into the pancreas (Dieterlen-Lièvre, 1965). Granulocytes are the only hemopoietic cells to differentiate in this organ. They form aggregates in the vicinity of blood vessels where they are easily recognized by their refringent cytoplasm. In the E8 pancreas, these promyelocytes expressed both *c-myb* and *mim-1* transcripts (Fig. 6A,B). Before the onset of granulopoiesis or later in the pancreas, no signal was obtained either with the *c-myb* or with the *mim-1* probe (data not shown).

During the spleen ontogeny, three hemopoietic lineages are observed in different overlapping phases (Yassine et al., 1989). Beginning at E10 the spleen is first erythropoietic. From E13 to hatching granulopoiesis is active, becoming the dominant process at E15 as erythropoiesis decreases. During the last days of incubation, the lymphocytes start immigrating into the spleen. As early as E11 granulocytic precursors cells, which are confined by a network of stromal cells, expressed both *c-myb* and *mim-1* (Fig. 7A,B). Their number increased until they reached a peak at E15 when the signal either with the *c-myb* or the *mim-1* probe was at its maximum (data not shown). At hatching granulocytes begin to leave the spleen. One week after hatching when granulopoiesis is over in the spleen, no signal was observed with the *c-myb* probe (Fig. 7C) and only a few cells still expressed *mim-1* (Fig. 7D). Thus *c-myb* and *mim-1* were coexpressed throughout the ontogeny of the pancreas and the spleen, which suggests that the *c-myb* gene product might be a transcriptional activator of the *mim-1* gene during granulopoiesis in these organs.

*In the thymus, c-myb does not induce the expression of mim-1*

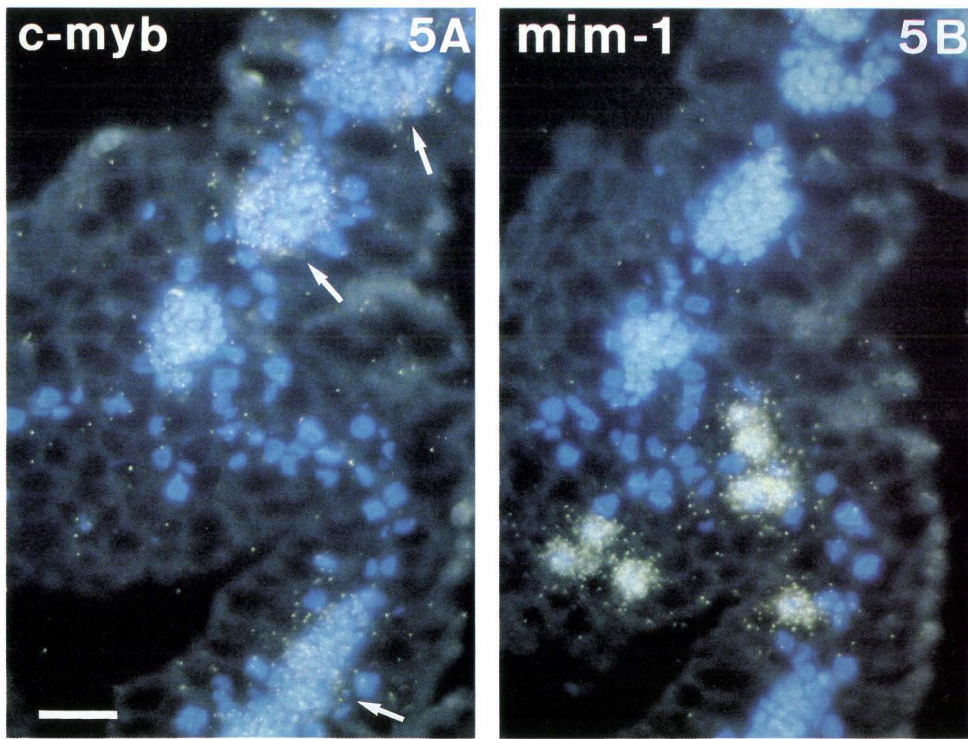
Previous reports on the expression of *c-myb* in the thymus have described a higher level of *c-myb* mRNA found in immature thymocytes than in fully differentiated T-cells *in vivo* and *in vitro* (Sheiness and Gardinier, 1984; Thompson et al., 1986). Our own results corroborated these studies. The *c-myb* probe revealed a higher expression in the cortical immature and proliferative lymphocytes than in the medullary lymphocytes (Fig. 8A). In contrast, a few scattered cells expressed *mim-1* in the thymus of the chick embryo (Fig. 8B), corresponding to a few granulocytic foci, which have been previously reported (Dieterlen-Lièvre, 1988). Thus in lymphoid cells the expression of *c-myb* does not induce the transcription of *mim-1*.

At this point it is worth noticing that *c-myb* transcripts were also detected in proliferating epithelia

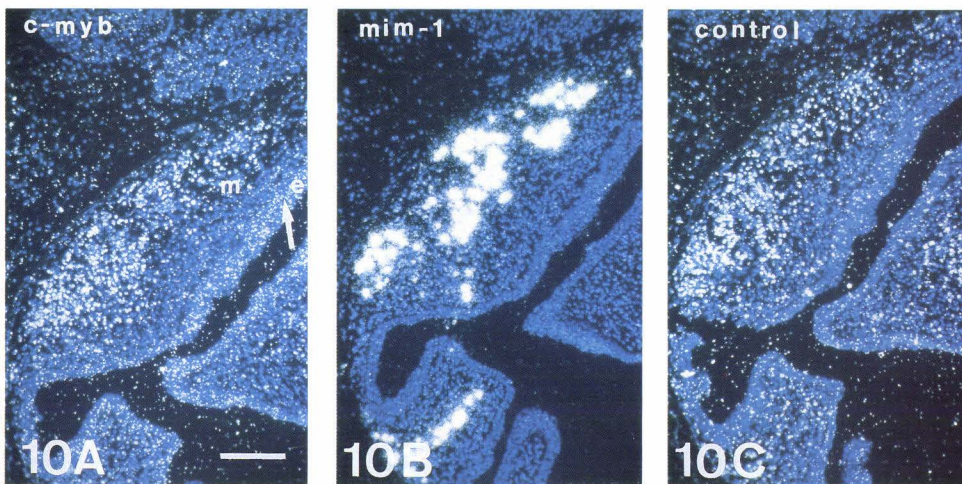


**Fig. 2.** *c-myb* and *mim-1* in periaortic clusters at E3. (Bar: 50  $\mu$ m). Transverse sections from E3 embryos at trunk level (a, aorta). (A) *c-myb* expression is restricted to hemopoietic clusters, on the ventrolateral wall of the aorta (arrows). (B) No labeling is observed with the *mim-1* probe on the next section. Circulating erythrocytes in the aorta display a non-specific light scattering.

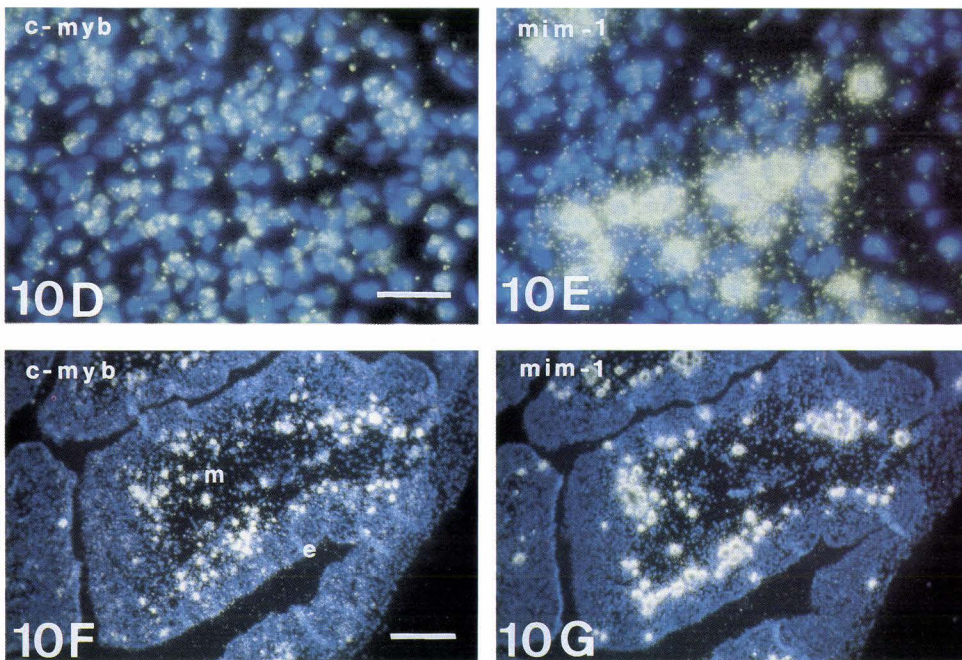
**Fig. 3.** *c-myb* and *mim-1* in hemopoietic clusters at E6 (Bar: 50  $\mu$ m). (A) *c-myb* transcripts are detected all over an hemopoietic cluster in the vicinity of carotid (c, carotid). The intensity of the *c-myb* signal is lower in this experiment because the probe used was synthesized with a shorter 350 bp *v-myb* fragment. (B) On the neighbouring section, only a few cells with an intense labeling for the *mim-1* probe are quite noticeable in this cluster and its surrounding. (C,D,E) Serial transverse sections through an E6 embryo hybridized with the *mim-1* probe (p, pharynx). Near the pharynx a cluster of cells is weakly labeled with *mim-1* (C). The sense probe hybridized on a next section gave no signal above background, indicating that the signal with the antisense probe is specific (data not shown). On the next section, one cell appears more intensely labeled (D). On another section, four cells display a strong signal (E).  
**Fig. 4.** At E6 in the mesentery ventral to aorta, the patterns of expression of *c-myb* (A) and *mim-1* (B) obtained on neighboring sections superimpose (a, aorta). (Bar: 50  $\mu$ m).



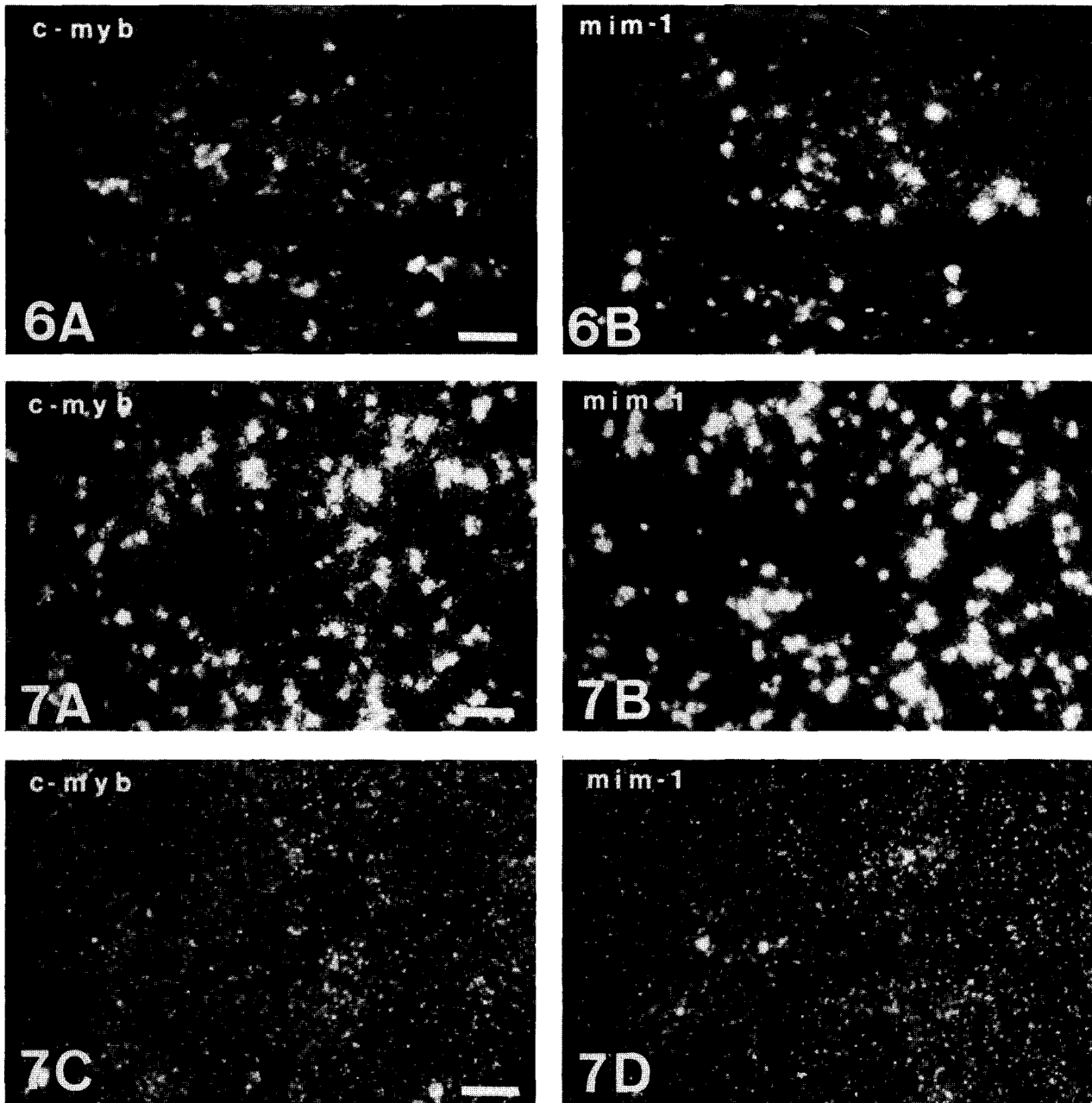
**Fig. 5.** *c-myb* and *mim-1* in the yolk sac at E10. (Bar: 25  $\mu\text{m}$ ). (A) The *c-myb* proto-oncogene is expressed only on the bulk of some blood islands (arrows). (B) In contrast *mim-1* transcripts are detected in promyelocytes, which differentiate extravascularly. No signal is detected on blood islands.



**Fig. 10.** *c-myb* and *mim-1* in granulopoietic cells of the bursa of Fabricius. (e, epithelia, m, mesenchyme) (A-E) Serial sections through the bursa of Fabricius at E11. (A) *c-myb* transcripts are only detected in the proliferative epithelium (arrows). (B) Numerous cells in the mesenchyme already express high levels of *mim-1* mRNAs. (C) A control section hybridized with the *c-myb* sense probe reveals that cells that are positive for *mim-1* mRNA are not labeled with the *c-myb* probe. These cells contain cytoplasmic granules which diffuse the light and give them the same aspect with a dark-field illumination on the section hybridized with the *c-myb* sense probe and on the section hybridized with the *c-myb* antisense probe. At a higher magnification these granules appear as white spots within the cells (D; section hybridized with the *c-myb* antisense probe) which are readily distinguishable from the tiny white dots above the cells which are the silver grains (E; section hybridized with the *mim-1* antisense probe). (F, G) Serial sections through the bursa of Fabricius at E15. (F) *c-myb* transcripts are now detected in the mesenchyme as well as in the epithelia. (G) The mesenchymal cells that express *c-myb* also express *mim-1*. (A, B, C, F, G - Bar: 100  $\mu\text{m}$ ). (D, E - Bar: 25  $\mu\text{m}$ ).







**Fig. 6.** *c-myb* (A) and *mim-1* (B) in the pancreas at E8. (Bar: 50  $\mu\text{m}$ ). Promyelocytes located in the vicinity of blood vessels express both *c-myb* and *mim-1* transcripts.

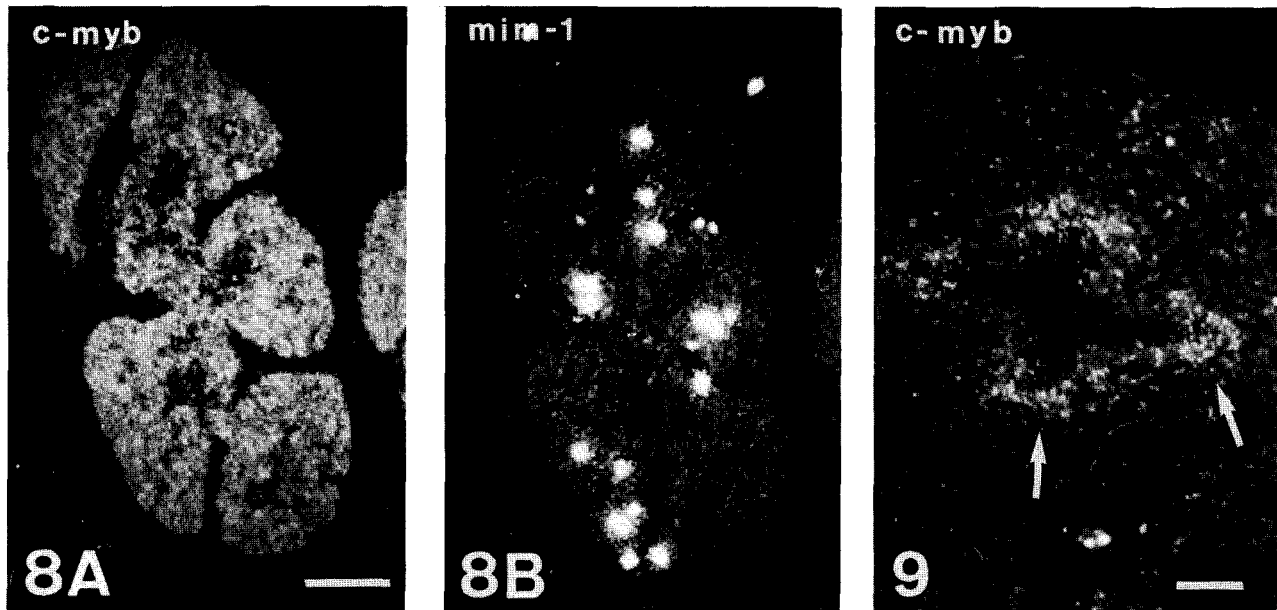
**Fig. 7.** *c-myb* and *mim-1* in the spleen. (Bar: 50  $\mu\text{m}$ ). (A,B) Serial sections through the spleen at E11. (A) Granulocytic precursor cells are labeled with the *c-myb* probe. (B) An intense level of *mim-1* mRNA is found in the same population of cells. (C,D) Serial sections through the spleen, six days after hatching. At this time granulopoiesis is over in the spleen. (C) No signal is observed with the *c-myb* probe. (D) Only a few scattered cells still express *mim-1*.

either from ectodermal (epidermis), neuroectodermal or from endodermal origin (oesophagus, gizzard, intestine, cloaca; Fig. 9). Likewise in these cells *c-myb* transcripts were not associated with *mim-1* transcripts (data not shown).

*During the ontogeny of the bursa of Fabricius mim-1 transcription precedes c-myb transcription*

In the bursa of Fabricius, hemopoietic differentiation is

dependent on the colonization of the bursal rudiment by two distinct extrinsic hemopoietic precursors. According to Houssaint (1987), at E9 the first cells belonging to myelomonocytic lineage enter. About one day later the bursal rudiment is colonized by lymphoid precursors. The seeding of both lineages takes place first in the mesenchyme where these hemopoietic stem cells are located until E11. As shown in Fig. 10 (A, C, D), at E11 *c-myb* transcripts were only detected in the



**Fig. 8.** *c-myb* and *mim-1* in the thymus at E15 (c: cortex, m: medulla). (Bar: 100  $\mu$ m). (A) A higher signal is obtained with the *c-myb* probe in the cortical thymocytes than in the medullar thymocytes. (B) On the neighbouring section only a few scattered cells express *mim-1*.

**Fig. 9.** *c-myb* transcripts in the epithelium of the gut at E8. The regions of growing epithelium where mitotic divisions are more frequent (arrows) are labeled with the *c-myb* probe. (Bar: 50  $\mu$ m).

proliferative epithelium of the bursa. Surprisingly, however, many cells in the mesenchyme of the bursa already expressed *mim-1* (Fig. 10B, E). After E12 the first myelomonocytic cells migrate and start to colonize the epithelium where they differentiate in cells belonging to the macrophage and dendritic lineage. These cells initiate the formation of epithelial buds, which are later colonized by the B lymphoid precursor cells. The cells remaining in the mesenchyme differentiate into granulocytes (Houssaint, 1987). At E13 *c-myb* was still expressed in the bursal epithelium but a few refringent cells in the mesenchyme were weakly labeled by the *c-myb* probe. *mim-1* transcripts were abundant in scattered cells in the central part of the mesenchyme (data not shown). At E15 the signal detected with the *c-myb* probe decreased in the densified epithelium. Numerous cells at the periphery of the mesenchyme are labeled with the *c-myb* probe. At this stage in the mesenchyme the distribution of *c-myb* and *mim-1* transcripts superimposed (Fig. 10F, G).

Granulopoiesis in the bursa of Fabricius disappears around hatching. In the one-day-old chick, lymphoid follicles had greatly developed and expressed neither *c-myb* nor *mim-1*. The mesenchymal component of the bursa was reduced to a few cells between the follicles. No cell in these sites expressed *c-myb* and only a weak signal was detected with the *mim-1* probe (data not shown).

## Discussion

The *mim-1* gene has been identified as a target of activation by the product of the E26 *v-myb* oncogene

(Ness et al., 1989). We show here that *c-myb* can transactivate an exogenously added as well as the endogenous *mim-1* promoter. The *mim-1* protein was shown to be expressed in normal immature granulocytes from chicken bone marrow and to be down-regulated during the terminal differentiation of granulocytes (Ness et al., 1989). Our *in situ* experiments confirm that *mim-1* is specifically expressed during granulopoiesis. An extensive survey throughout the development of the chick embryo shows that *mim-1* transcripts are found in granulopoietic organs, at the time and in the place where granulopoiesis occurs. Therefore, to our knowledge, *mim-1* is the first described marker for the cells that are differentiating into the granulocytic lineage. We describe here a spatial and a temporal correlation between the transcription of *c-myb* and *mim-1* in some hemopoietic foci in the dorsal mesentery at E6, in the pancreas and in the spleen. Providing that translational controls, which have been documented in rare occasions for gene regulatory proteins (Dollé et al., 1990), do not delay the *c-myb* protein expression, our data suggest that *c-myb* triggers *mim-1* in these situations.

Quite unexpectedly however, both in the yolk sac and in the bursa of Fabricius at E11, we detect a high level of *mim-1* transcripts in cells where *c-myb* transcripts are not detected. The interpretation of this result indeed relies upon the presumption that the lack of signal signifies no expression. Assuming 100% hybridization efficiency (optimistic) and 2% detection efficiency (pessimistic) with a 3kb <sup>35</sup>S-labeled *c-myb* probe, one mRNA molecule will give one silver grain after two weeks of exposure, which is the actual duration of the

experiments presented here. Further, for the yolk sac and the bursa of Fabricius at E11, after one month exposure, no hybridization signal is observed with the *c-myb* probe. Therefore these estimates suggest that one single copy of *c-myb* mRNA could be detected by *in situ* hybridization under the conditions used in this study. The sensitivity of the *in situ* hybridization can be also evaluated by the detection of a specific *c-myb* signal in proliferating epithelia (Fig. 9) where the abundance of *c-myb* transcripts is more than ten times lower than in hemopoietic cells (Thompson et al., 1986). The absence of *c-myb* transcripts accumulation cannot be readily ascertained by an independent method such as the reverse transcriptase-polymerase chain reaction because, within the yolk sac or in the bursa of Fabricius at E11, there are together *mim-1*-positive *c-myb*-negative cells and *mim-1*-negative *c-myb*-positive cells. The absence of *c-myb* transcripts in *mim-1*-positive cells may be related to a different turnover for the *c-myb* and the *mim-1* mRNAs. Thus, after the induction of *mim-1* transcription by *c-myb*, one may speculate that *c-myb* transcripts are rapidly degraded whereas *mim-1* transcripts remain stable during several days in promyelocytes. According to this hypothesis, promyelocytes in the yolk sac and in the bursa of Fabricius at E11 would be more mature than promyelocytes in the pancreas or in the spleen when both *c-myb* and *mim-1* transcripts are detected. However, in the spleen where we have described the entire process of granulopoiesis from E10 to hatching, we have not observed cells where *mim-1* transcripts accumulate without a simultaneous transcription of *c-myb*. In the yolk sac, *c-myb* is transcribed within the bulk of some blood islands present in the vicinity of blood vessels. In contrast, *mim-1* transcripts are detected extravascularly in promyelocytes. The origin of these promyelocytes is still debated. If they originate from blood islands one may argue that the *c-myb* protein, which is expressed in blood islands is still present in promyelocytes where *mim-1* is transcribed. In our hands, all the attempts to detect the *c-myb* protein by immunocytochemistry gave inconclusive results. However, this hypothesis seems unlikely because the half-life of the *c-myb* protein is short (Klempnauer et al., 1986; Lüscher et al., 1988). Alternatively cells expressing *c-myb* and cells expressing *mim-1* in the yolk sac may not belong to the same hemopoietic lineage. In any case, the onset of *mim-1* transcription and the expression of *c-myb* seem unrelated in the yolk sac. We also found *mim-1* transcripts in the bursa of Fabricius at E11, two days before appearance of the first *c-myb* transcripts. These results suggest that granulopoiesis in the yolk sac as well as in the bursa at E11 is independent of *c-myb*, and that the expression of *mim-1* in this context is not induced by the *c-myb* protein. This hypothesis fits well with *in vitro* experiments showing that the *myb* protein-binding sites in the *mim-1* promoter bind a number of cellular proteins which are immunologically distinct from *v-myb* or *c-myb* proteins (S.A. Ness unpublished result). Thus other proteins, including products of other members of the *Myb* family are potential candidates for the

regulation of *mim-1* expression in the yolk sac and the bursa.

What is the physiological significance of different regulatory pathways for the transcription of *mim-1*? The inducibility of *mim-1* by different factors may result from different environmental conditions. Hemopoiesis *in vivo* requires a framework of stromal cells which provide the necessary environment for self-renewal, differentiation and maturation of the hemopoietic stem cells (for review see Dexter et al., 1984). Thus it is tempting to speculate that the differentiation of granulocytic precursor cells in different tissues involves different signaling molecules which in turn induce the transcription of *mim-1* through different regulatory pathways.

The amount of *mim-1* transcripts in promyelocytes is another point that suggests different steps in the regulation of *mim-1*. The high level of the hybridization signal with the *mim-1* probe in granulopoietic organs indicates that the *mim-1* mRNAs are very abundant in promyelocytes. Indeed western blot analysis indicated that the *mim-1* gene encodes one of the most abundant proteins found in these cells (Ness et al., 1989). However we show here that this high rate of transcription is not achieved in a single step in the hemopoietic foci (Fig. 3). A quantification of the number of transcripts per cell has not been possible because the signal obtained with the *mim-1* probe is very intense and because the average thickness of one cell is bigger than 4  $\mu\text{m}$ , the thickness of each serial section. Nevertheless the observation of cells expressing a low level of *mim-1* mRNA suggests that different regulatory elements cooperate to achieve the high level of transcription for *mim-1*.

The comparison between the expression patterns of *c-myb* and *mim-1* also provides new insights into the roles of *c-myb*. *c-myb* transcripts present in lymphoid or in epithelial cells seem to be merely associated with proliferation. Previous studies have indicated that *c-myb* is expressed during proliferation in hemopoietic cells as well as in chicken embryo fibroblasts. In MSB-1, a transformed T cell line, the induction of *c-myb* expression occurs not only during the initial activation of cells to proliferate, but also in subsequent cell cycles during exponential growth. Similarly the expression of *c-myb* is high in immature thymocytes and decreases during T-cell differentiation *in vivo* (Thompson et al., 1986). In related studies, we have shown that *c-myb* transcripts accumulate in proliferating epidermal cells of feather outgrowth (Desbiens et al., 1991). We show here that *c-myb* is expressed more generally in proliferative areas of developing epithelia from endodermal, ectodermal and neural origin. In all these situations *c-myb* transcripts are never associated with the transcription of *mim-1*.

Beside its role in proliferation, *c-myb* appears to have a specific function during myeloid cell differentiation. In regard to the transformation properties of *v-myb*, *c-myb* is usually considered as a master gene of myeloid differentiation. A particularly interesting feature of *v-myb* is that it does not simply block differentiation, but

it dictates the differentiation phenotype of the myeloid cells that it transforms. Thus, when introduced into normal or *v-myc* transformed macrophages, both AMV and E26 are capable of causing a "dedifferentiation" through the dominant induction of phenotypic changes characteristic of immature cells (Durban and Boettiger, 1981; Beug et al., 1987; Ness et al., 1987). By contrast, the cellular counterpart of *v-myb* is expressed in various cell lines and seems to act in the myeloid lineage as a specialized factor involved in a single pathway of differentiation. It seems unlikely that *c-myb* is responsible for the commitment and differentiation of granulocytic precursor cells by activating *mim-1* transcription. Rather we suggest that *c-myb* plays a role in regulating *mim-1* transcription in cells triggered to differentiate by the action of other factors that are located in granulocytic organs. Moreover, strict promyelocyte-specific expression of *mim-1* cannot be attributed only to the binding of *c-myb* to the *mim-1* promoter. Indeed several recent studies, including our results, suggest that the *c-myb* protein does not act alone and cooperates with other tissue-specific factors (Klempnauer et al., 1989; Ibanez and Lipsick, 1990). In this regard, it is interesting that the *myb*-related BAS1 protein of *S. cerevisiae* activates transcription of the HIS4 gene only in conjunction with BAS2, a homeo-domain protein (Tice-Baldwin et al., 1989).

Ness et al. (1989) have previously demonstrated that E26 *v-myc* activates the transcription of the promyelocyte-specific gene *mim-1*, suggesting that *c-myb* is part of the network of interacting transcription factors that regulates *mim-1* transcription. One may assume that each of these factors plays a specific role either in one tissue or at one stage of differentiation. The description of the spatial and temporal relationship between the transcription of *mim-1* and *c-myb* has allowed us to identify cells where *c-myb* could trigger the transcription of *mim-1*. We have also found cells where *mim-1* is transcribed in the absence of *c-myb*. These cells in the bursa of Fabricius at E11 or in the yolk sac should be amenable to a molecular analysis that will allow the identification of other transcription factors that regulate the expression of *mim-1*.

We would like to thank Drs F. Dieterlen, M. Fauquet, E. Houssaint, J. Coll, V. Laudet, D. LePrince and O. Albagli for critical reading of the manuscript, J. Lipsick for providing the 3 kb *c-myb* probe and the *c-myb* expression vector. We thank M.A. Mirabel, M.B. Raes and A. Marknell for excellent technical assistance, N. Devassine and M.C. Bouchez for patient typing. This work was supported by the Institut Pasteur de Lille, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Centre National de la Recherche Scientifique and Association pour la Recherche sur le Cancer. C.Q. is a recipient of a fellowship from the Ministère de la Recherche et de la Technologie.

## References

- Angerer, L. M., Cox, K. H. and Angerer, R. C. (1987). Identification of tissue-specific gene expression by *in situ* hybridization. *Methods Enzymol.* **152**, 649-661.
- Beug, H., Blundell, P. and Graf, T. (1987). Reversibility of differentiation and proliferative capacity in avian myelomonocytic cells transformed by tsE26 leukemia virus. *Genes Dev.* **1**, 277-286.
- Beug, H., Leutz, A., Kahn, P. and Graf, T. (1984). Ts mutants of E26 leukemia virus allow transformed myeloblasts, but not erythroblasts or fibroblasts, to differentiate at the non permissive temperature. *Cell* **39**, 579-588.
- Biedenkapp, H., Borgmeyer, U., Sippel, A. E. and Klempnauer, K.-H. (1988). Viral *myb* oncogene encodes a sequence specific DNA binding activity. *Nature* **335**, 835-837.
- Boyle, W. J., Lampert, M. A., Lipsick, J. S. and Baluda, M. A. (1984). Avian myeloblastosis virus and E26 virus oncogene products are nuclear proteins. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **81**, 4265-4269.
- Clarke, M. F., Kukowska-Latallo, J. F., Westin, E., Smith, M. and Prochownik, E. V. (1988). Constitutive expression of a *c-myb* cDNA blocks Friend murine erythroleukemia cell differentiation. *Molec. cell. Biol.* **8**, 884-892.
- Coll, J., Saule, S., Martin, P., Raes, M. B., Lagrou, C., Graf, T., Beug, H., Simon, I. E. and Stéhelin, D. (1983). The cellular oncogenes *c-myc*, *c-myb* and *c-erb* are transcribed in defined types of avian hematopoietic cells. *Expl. Cell Res.* **149**, 151-162.
- Cox, K. H., De Leon, D. V., Angerer, L. M. and Angerer, R. C. (1984). Detection of mRNAs in sea urchin embryos by *in situ* hybridization using asymmetric RNA probes. *Dev. Biol.* **101**, 485-502.
- Craig, R. W. and Block, A. (1984). Early decline in *c-myb* oncogene expression in the differentiation of human myeloblastic leukemia (ML-1) cells induced with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res.* **44**, 442-446.
- Desbiens, X., Queva, C., Jaffredo, T., Stéhelin, D. and Vandebunder, B. (1991). The relationship between cell proliferation and the transcription of the nuclear oncogenes *c-myc*, *c-myb* and *c-ets-1* during feather morphogenesis in the chick embryo. *Development* **111**, 699-713.
- De Wet, J. R., Wood, K. V., DeLuca, M., Helinski, D. R. and Subramani, S. (1987). Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Molec. cell. Biol.* **7**, 725-737.
- Dexter, T. M., Spooncer, E., Simmono, P. and Allen, T. D. (1984). Long-term marrow cultures. An overview of techniques and experience. In *Long-term Bone Marrow Culture* (ed. D.G. Wright, J.S. Greenberger) pp 57-96. New York: Liss.
- Dieterlen-Lièvre, F. (1965). Etude morphologique et expérimentale de la différenciation du pancréas chez l'embryon de poulet. *Extrait du Bulletin Biologique de la France et de la Belgique*. Tome **99**, fascicule 1.
- Dieterlen-Lièvre, F. (1984). Emergence of intraembryonic blood stem cells in avian chimeras by means of monoclonal antibodies *Devl. Comp. Immunol. Suppl.* **3**, 75-80.
- Dieterlen-Lièvre, F. (1988). Birds. In *Vertebrate Blood Cells* (ed. A.F. Rowley and N.A. Ratchiffe). Cambridge University Press.
- Dieterlen-Lièvre, F. and Martin, C. (1981). Diffuse intraembryonic hemopoiesis in normal and chimeric avian development. *Dev. Biol.* **88**, 180-191.
- Dollé, P., Castrillo, J. L., Theill, L. E., Deerinck, T., Ellisman, M. and Karin, M. (1990). Expression of GHF-1 protein in mouse pituitaries correlates both temporally and spatially with the onset of growth hormone gene activity. *Cell* **60**, 809-820.
- Duprey, S. P. and Boettiger, D. (1985). Developmental regulation of *c-myb* in normal myeloid progenitor cells. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 6937-6941.
- Durban, E. M. and Boettiger, D. (1981). Differential effects of transforming avian RNA tumor viruses on avian macrophages. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **78**, 3600-3604.
- Feinberg, A. J. and Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**, 6-13.
- Frykberg, L., Metz, T., Brady, G., Introna, M., Beug, H., Vennström, B. and Graf, T. (1988). A point mutation in the DNA binding domain of the *v-myb* oncogene of E26 virus confers temperature sensitivity for transformation of myelomonocytic cells. *Oncogene Res.* **3**, 313-322.
- Gerondakis, S. and Bishop, J. M. (1986). Structure of the protein

- encoded by the chicken proto-oncogene *c-myb*. *Molec. cell. Biol.* **6**, 3677-3684.
- Gewirtz, A. M. and Calabretta, B.** (1988). A *c-myb* antisense oligodeoxynucleotide inhibits normal human hematopoiesis *in vitro*. *Science* **242**, 1303-1306.
- Golay, J., Introna, M. and Graf, T.** (1988). A single point mutation in the *v-ets* oncogene affects both erythroid and myelomonocytic cell differentiation. *Cell* **55**, 1147-1158.
- Gonda, T. J. and Metcalf, D.** (1984). Expression of *myb*, *myc* and *fos* proto-oncogenes during the differentiation of a murine myeloid leukaemia. *Nature* **310**, 249-251.
- Gonda, T. J., Sheiness, D. K. and Bishop, J. M.** (1982). Transcripts from the cellular homologs of retroviral oncogenes: distribution among chicken tissues. *Molec. cell. Biol.* **2**, 617-624.
- Herbomel, P., Bourachot, B. and Yaniv, M.** (1984). Two distinct enhancers with different cell specificities coexist in the regulatory region of polyoma. *Cell* **39**, 653-662.
- Houssaint, E.** (1987). Cell lineage segregation during bursa of Fabricius ontogeny. *J. Immunol.* **138**, 3626-3634.
- Ibanez, C. E. and Lipsick, J. S.** (1990). Transactivation of gene expression by *v-myb*. *Molec. cell. Biol.* **10**, 2285-2293.
- Introna, M., Golay, L., Frampton, J., Nakano, T., Ness, S. A. and Graf, T.** (1990). Mutations in *v-myb* alter the differentiation of myelomonocytic cells transformed by the oncogene. *Cell* **63**, 1287-1297.
- Klempnauer, K.-H., Arnold, H. and Biedenkapp, H.** (1989). Activation of transcription by *v-myb*: evidence for two different mechanisms. *Genes Dev.* **3**, 1582-1589.
- Klempnauer, K.-H., Bonifer, C. and Sippel, A. E.** (1986). Identification and characterization of the protein encoded by the human *c-myb* proto-oncogene. *EMBO J.* **5**, 1903-1911.
- Klempnauer, K.-H. and Sippel, A. E.** (1987). The highly conserved amino-terminal region of the protein encoded by the *v-myb* oncogene functions as a DNA-binding domain. *EMBO J.* **6**, 2719-2725.
- Klempnauer, K.-H., Symonds, G., Evan, G. I. and Bishop, J. M.** (1984). Subcellular localization of proteins encoded by oncogenes of avian myeloblastosis virus and avian leukemia virus E26 and by the chicken *c-myb* gene. *Cell* **37**, 537-547.
- Kost, T. A., Theodorakis, N. and Hughes, S. H.** (1983). The nucleotide sequence of the chick cytoplasmic  $\beta$ -actin gene. *Nucl. Acids. Res.* **11**, 8287-8301.
- Leprince, D., Gegonne, A., Coll, J., de Taisne, C., Schneeberger, A., Lagrou, C. and Stéhelin, D.** (1983). A putative second cell-derived oncogene of the avian leukemia virus E26. *Nature* **306**, 395-397.
- Liebermann, D. A. and Hoffman-Liebermann, B.** (1989). Proto-oncogene expression and dissection of the myeloid growth to differentiation developmental cascade. *Oncogene* **4**, 583-592.
- Lüscher, L. and Eisenman, R. N.** (1988). *c-myc* and *c-myb* protein degradation: effect of metabolic inhibitors and heat shock. *Molec. cell. Biol.* **8**, 2504-2512.
- Lüscher, L. and Eisenman, R. N.** (1991). New light on *Myc* and *Myb*. Part II. *Myb*. *Genes Dev.* **4**, 2235-2241.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J.** (1982). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- McClinton, D., Stafford, J., Brents, L., Benter, T. P. and Kuehl, W. M.** (1990). Differentiation of mouse erythroleukemia cells is blocked by late up regulation of a *c-myb* transgene. *Molec. cell. Biol.* **10**, 705-710.
- Moelling, K., Pfaff, E., Beug, H., Beimpling, P., Bunte, T., Schaller, H. E. and Graf, T.** (1985). DNA binding activity is associated with purified *Myb* proteins from AMV and E26 viruses and is temperature-sensitive for E26 ts mutants. *Cell* **40**, 983-990.
- Moscovici, C. and Gazzolo, L.** (1982). Transformation of hemopoietic cells with avian leukemia viruses. In *Advances in Viral Oncology*, Vol. 1. Oncogene Studies, pp 83-106. (New York: Raven Press).
- Ness, S. A., Beug, H. and Graf, T.** (1987). *v-myb* dominance over *c-myc* in doubly transformed chick myelomonocytic cells. *Cell* **51**, 41-50.
- Ness, S. A., Marknell, A. and Graf, T.** (1989). The *v-myb* oncogene product binds to and activates the promyelocyte-specific *mim-1* gene. *Cell* **59**, 1115-1125.
- Nunn, M. F. and Hunter, T.** (1989). The *ets* sequence is required for induction of erythroblastosis in chicken by avian retrovirus E26. *J. Virol.* **63**, 398-402.
- Radke, K., Beug, H., Kornfel, 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.
- Rosson, D. and Reddy, E. P.** (1986). Nucleotide sequence of chicken *c-myb* complementary DNA and implications for *myb* oncogene activation. *Nature* **319**, 604-606.
- Roussel, M., Saule, S., Lagrou, C., Rommens, C., Beug, H., Graf, T. and Stéhelin, D.** (1979). Three new types of viral oncogene of cellular origin specific for haematopoietic cell transformation. *Nature* **281**, 452-455.
- Sakura, H., Kanei-Ishii, C., Nagase, T., Nakagoshi, H., Gonda, T. J. and Ishii, S.** (1989). Delineation of three functional domains of the transcriptional activator encoded by the *c-myb* proto-oncogene. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 5758-5762.
- Sheiness, D. and Gardinier, M.** (1984). Expression of a proto-oncogene (proto-*myb*) in hemopoietic tissues of mice. *Molec. cell. Biol.* **4**, 1206-1212.
- Thompson, C. B., Challoner, P. B., Neiman, P. E. and Groudine, M.** (1986). Expression of the *c-myb* proto-oncogene during cellular proliferation. *Nature* **319**, 374-380.
- Tice-Baldwin, K., Fink, G. R. and Arndt, K. T.** (1989). BAS1 has a *myb* motif and activates HIS4 transcription only in combination with BAS2. *Science* **246**, 931-935.
- Todokoro, K., Watson, R. J., Higo, H., Amanuma, H., Kuramochi, S., Yanagisawa, H. and Ikawa, Y.** (1988). Down regulation of *c-myb* gene expression is a prerequisite for erythropoietin-induced erythroid differentiation. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 8900-8904.
- Westin, E. H., Gallo, R. C., Arya, S. K., Eva, A., Souza, L. M., Baluda, M. A., Aaronson, S. A. and Wong-Staal, F.** (1982). Differential expression of the *myb* gene in human hematopoietic cells. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **79**, 2194-2198.
- Weston, K. and Bishop, J. M.** (1989). Transcriptional activation by the *v-myb* oncogene and its cellular progenitor, *c-myb*. *Cell* **58**, 85-93.
- Yassine, F., Fedeka-Bruner, B. and Dieterlen-Lièvre, F.** (1989). Ontogeny of the chick embryo spleen a cytological study. *Cell Differ. Dev.* **27**, 29-45.

(Accepted 9 October 1991)



## **C - Discussion.**

Le gène *mim-1* a été identifié comme le premier gène cible de la P135 $\Delta$ *gag-myb-ets* (Ness et al., 1989). Nous avons montré que le produit du proto-oncogène *c-myb* est aussi capable de transactiver le promoteur de *mim-1*, qu'il soit exogène, apporté par transfection ou endogène. La protéine Mim-1 a été détectée spécifiquement dans les granulocytes immatures de la moelle osseuse. Son expression diminue au cours de la différenciation terminale des granulocytes (Ness et al., 1989). Nos expériences d'hybridation *in situ* confirment que *mim-1* est spécifiquement exprimé au cours de la granulopoïèse dans l'embryon de poulet. La corrélation spatio-temporelle étroite entre l'expression de *c-myb* et de *mim-1* dans des foyers hématopoïétiques de l'embryon de 6 jours, dans le pancréas et la rate, suggère très fortement que c-Myb contrôle la transcription de *mim-1* dans ces cellules.

Par contre, nous avons pu montrer que *mim-1* était transcrit dans les précurseurs granulocytiques du sac vitellin et au début de la colonisation de la bourse de Fabricius, là où les transcrits *c-myb* n'était pas détectés. Plusieurs hypothèses peuvent être proposées pour expliquer ces résultats.

- La première est que le seuil de détection de notre technique d'hybridation *in situ* est supérieur au taux d'expression de *c-myb* dans ces cellules. Une évaluation de la sensibilité de notre technique permet d'estimer qu'une copie d'ARNm va générer un grain d'argent après 15 jours d'autoradiographie, temps d'exposition que nous pratiquons usuellement. De plus, si nous laissons nos lames 2 semaines supplémentaires en autoradiographie, aucun signal n'est détecté sur ces précurseurs granulocytiques avec la sonde *c-myb*. Enfin, cette technique est suffisamment sensible pour détecter un faible niveau d'expression de *c-myb* dans les épithéliums en prolifération où les transcrits *c-myb* sont pourtant 10 fois moins abondants que dans les cellules hématopoïétiques (Thompson et al., 1986). Il est donc probable que l'absence de signal *c-myb* sur les promyélocytes de la bourse de Fabricius ne soit pas due à un manque de sensibilité de notre technique.

- Une deuxième hypothèse selon laquelle l'absence de *c-myb* dans les cellules positives pour *mim-1* serait due à une stabilisation différente des transcrits, a été également envisagée. Ainsi, après induction de la transcription de *mim-1* par *c-myb*, on peut imaginer que les transcrits *c-myb* sont dégradés rapidement, alors que les transcrits *mim-1* restent stables pendant plusieurs jours. Selon cette hypothèse, les promyélocytes du sac vitellin et de la bourse de Fabricius seraient plus matures que ceux de la rate et du pancréas, où l'expression de *c-myb* et de *mim-1* sont corrélées. Cela ne semble pas être le cas, au moins dans la rate où nous avons suivi la granulopoïèse depuis le 10ème jour de développement jusqu'à l'éclosion et où nous n'avons pas pu noter une disparition des transcrits *c-myb* avant ceux de *mim-1*.

- Troisièmement, les transcrits *c-myb* pourraient être dégradés rapidement, la protéine par contre serait présente dans les promyélocytes et stimulerait la transcription de *mim-1*. Une manière

définitive de répondre à cet argument eut été de détecter directement la protéine c-Myb par immunocytochimie avec l'ARN *mim-1* sur une même section. Hélas, tous nos efforts pour détecter la protéine c-Myb ont été infructueux. Seul un argument indirect peut être opposé à cette hypothèse. Nous sommes parvenus à détecter les ARNs *mim-1* dans la bourse de Fabricius dès le 10ème jour d'incubation, trois jours avant la détection des premiers transcrits *c-myb*. Cela signifie que la protéine c-Myb aurait du être stabilisée pendant une durée qui n'est pas en accord avec sa demi-vie de moins d'une heure (Boyle et al., 1985; Klempnauer et al., 1986; Lüscher et Eisenman, 1988).

Ces résultats indiquent donc que la granulopoïèse dans le sac vitellin et dans la bourse de Fabricius à E11 est indépendante de c-Myb, et que l'expression de *mim-1* dans ces promyélocytes n'est pas induite par c-Myb mais par d'autres facteurs. Cette hypothèse a été confortée récemment par des résultats du laboratoire d'A. Leutz qui a isolé le facteur appelé NF-M, qui est capable de transactiver le promoteur de *mim-1 in vitro* (Sterneck et al., 1992). Parmi les autres membres caractérisés de la famille Myb chez le poulet, seul A-Myb pourrait être candidat pour activer la transcription de *mim-1*. B-Myb ne transactive pas le promoteur de *mim-1* et inhibe au contraire la transactivation médiée par la p75<sup>c-myb</sup> et la p48<sup>v-myb</sup> (Foos et al., 1992).

L'existence de différents modes d'activation de *mim-1* n'est pas surprenante physiologiquement et pourrait refléter des différences dans l'environnement où se différencient les granulocytes. L'hématopoïèse requiert *in vivo* un réseau de cellules stromales qui apportent aux cellules hématopoïétiques les signaux nécessaires à leur renouvellement et à leur différenciation (pour revue Dexter et al., 1984). La différenciation des précurseurs granulocytiques dans différents tissus pourrait impliquer différents signaux conduisant à des voies alternatives de régulation de l'expression de *mim-1*.

L'abondance variable des transcrits *mim-1* dans les promyélocytes est un autre point qui suggère une régulation multifactorielle de l'expression de ce gène. Une analyse en western blot indique que *mim-1* code une des protéines les plus abondantes dans les promyélocytes (Ness et al., 1989). Ce résultat est en accord avec le signal d'hybridation intense observé avec la sonde *mim-1* dans les organes granulocytiques. Néanmoins, nous avons pu observer que ce haut niveau d'expression n'est pas atteint en une seule étape dans les foyers hématopoïétiques à E6. L'observation de cellules qui expriment plus faiblement *mim-1*, suggère que plusieurs facteurs doivent coopérer avec c-Myb pour induire un haut niveau d'expression. Un autre argument soutient cette hypothèse. La p75<sup>c-myb</sup>, la P135<sup>Δgag-myb-ets</sup> et la p48<sup>v-myb</sup> transactivent le promoteur de *mim-1* cloné en amont du gène de la luciférase en tests de cotransfection. Par contre, seules la p75<sup>c-myb</sup> et P135<sup>Δgag-myb-ets</sup> sont capables d'induire l'expression du gène *mim-1* endogène (Ness et al., 1989). Cette différence entre v-Myb<sup>E26</sup> et c-Myb d'une part et v-Myb<sup>AMV</sup> d'autre part réside dans 3 acides aminés localisés dans le domaine de fixation à l'ADN. Si au moins l'une de ces 3 mutations présentes dans v-Myb<sup>AMV</sup> est révertée pour se retrouver dans la configuration de c-Myb



ou de v-Myb<sup>E26</sup>, alors les cellules transformées par ce virus recombinant ressemblent à des promyélocytes et expriment *mim-1* (Introna et al., 1990). Ces acides aminés sont localisés dans le premier motif répété de v-Myb<sup>AMV</sup>; un seul de ces acides aminés est sensé être en contact avec l'ADN. Si l'on se fie à l'homologie de Myb avec les protéines à homéodomaine, les deux autres acides aminés sont situés sur la face externe des hélices 1 et 2 dans une région réputée importante pour l'interaction avec d'autres protéines (Frampton et al., 1991). Il est donc tentant de spéculer que v-Myb<sup>AMV</sup> ne peut pas induire l'expression de *mim-1*, parce qu'il ne peut pas établir de contacts avec des cofacteurs nécessaires à cette opération. Plusieurs candidats sont en lice pour coopérer avec c-Myb, parmi eux le facteur de transcription à *leucine zipper*, BZLF1 du virus d'Epstein Barr (Kenney et al., 1992) ou NF/M et c-Ets-2 qui pourraient coopérer avec c-Myb sur le promoteur de *mim-1* (Dudek et al., 1992; Sterneck et al., 1992) (Fig.13).

L'étude de l'expression de *c-myb* au cours du développement de l'embryon de poulet a permis de réaffirmer le lien entre ce proto-oncogène et la prolifération ou la différenciation de cellules n'appartenant pas à la lignée myéloïde. Ainsi, les transcrits *c-myb* sont détectés dans le thymus au 15ème jour de développement. L'expression de *c-myb* semble plus intense dans la zone corticale du thymus, qui contient des thymocytes immatures en prolifération, que dans la zone médullaire. Ces résultats confirment ceux obtenus dans des lignées cellulaires et *in vivo* chez la souris (Mountz et al., 1984; Sheiness et Gardinier, 1984; Thompson et al., 1986; Yokota et al., 1987; Mountz et Steinberg, 1989). Nous avons de plus étendu la description de l'expression de *c-myb* à des cellules n'appartenant pas au système hématopoïétique. Nous avons montré précédemment une accumulation des transcrits *c-myb* dans les cellules de l'épiderme en prolifération lors de l'édification des plumes (Desbiens et al., 1991). Les transcrits *c-myb* sont exprimés de manière plus générale dans les cellules en prolifération des épithéliums d'origine endodermique (intestin, gésier, oesophage), ectodermique (épiderme), et neurale (tube neural, neurorétine). Dans toutes ces situations, l'expression de *mim-1* n'est jamais associée à celle de *c-myb*.

En plus de ce rôle général dans la prolifération, *c-myb* est considéré comme une pièce maîtresse de la différenciation de la lignée myéloïde, en particulier à cause des propriétés transformantes de ses homologues viraux. Une de leurs caractéristiques particulièrement intéressantes est qu'ils ne bloquent pas uniquement la différenciation mais déterminent le phénotype des cellules transformées. Ainsi lorsque des macrophages normaux ou transformés par l'oncogène *v-myc* sont infectés par E26 ou AMV, ceux-ci provoquent une dédifférenciation de ces cellules qui acquièrent alors des caractéristiques de cellules myélomonocytiques immatures (Durban et Boettiger, 1981; Beug et al., 1984; 1987; Ness et al., 1987). De plus des changements subtils d'un acide aminé dans le domaine de fixation à l'ADN de v-Myb<sup>AMV</sup> peuvent perturber de manière drastique le phénotype des cellules transformées (Introna et al., 1990). Cependant, il est

improbable que *c-myb* soit responsable de la détermination et de la différenciation des cellules myéloïdes, lorsque sa fonction est d'activer l'expression de *mim-1*. Il semble même que *c-Myb* active l'expression de *mim-1* dans des cellules qui ont été déterminées vers cette voie par d'autres facteurs. Ainsi, *c-myb* ne serait pas un facteur décisif de la détermination de la lignée granulocytaire, mais il contribuerait à l'installation du phénotype différencié. Cependant, on ne peut pas espérer révéler par l'isolement d'un seul gène cible la totalité du rôle de *c-myb*. D'autres gènes cibles de *v-Myb* et de *c-Myb*, impliqués dans la transformation et la détermination de la lignée myéloïde pourraient expliquer l'effet des rétrovirus E26 et AMV.

L'identification des gènes cibles sera donc fondamentale pour la compréhension du rôle biologique de *c-Myb*. Les gènes cibles de ce facteur de transcription, qui ont été caractérisés à présent sont soit des marqueurs de la différenciation qui n'expliquent pas les multiples effets de *c-Myb* soit des gènes impliqués dans les mécanismes généraux de la prolifération et qui sont régulés de manière indirecte. *c-myc*, le seul facteur de transcription, cible potentielle de *c-Myb*, a été qualifié de "citadel of incomprehensibility" (Lüscher et Eisenman, 1990a) et ses relations avec *c-Myb* n'ont pas encore été clarifiées. La situation se complique encore par le fait que *Myb*, non content d'activer la transcription de manière classique après fixation sur des séquences spécifiques, serait capable de transactiver de manière indirecte soit en interagissant avec le promoteur du gène à réguler via le domaine de fixation à l'ADN d'un autre facteur de transcription, soit par un mécanisme de *snatching* en sequestrant un facteur qui réprime la transcription du gène considéré. La route vers l'isolement de ces gènes cibles est donc encore longue et tortueuse, mais l'expression relativement spécifique de *c-myb* dans l'hématopoïèse, ainsi que les outils constitués par les homologues viraux et les chimères *v-Myb/ER* construites récemment par Burk et Klempnauer (1991) devraient faciliter notre cheminement avec la promesse d'une manne substantielle à l'arrivée. En effet, ces auteurs ont utilisé des clones pris au hasard dans une banque d'ADNc de monoblastes transformés par AMV pour cribler des northern blot de HD11 transfectés par la chimères *v-Myb/ER*. Le criblage de seulement 400 clones a été nécessaire pour isoler 2 gènes cibles: *mim-1* déjà décrit et *MD-1*. Ceci peut suggérer que ces gènes représentent une bonne part des ADNc de cette banque, mais aussi, si l'on est optimiste, que les gènes cibles de *v-Myb* sont très nombreux. Cette abondance obligera à procéder à une sélection des gènes cibles régulés directement par *v-Myb* et qui seraient importants pour la transformation des cellules myélomonocytiques et érythroïdes. Un indice pour repérer ce type de gènes, du moins pour la transformation érythroïde, pourrait être la présence de sites de fixation pour les protéines *Myb* et *Ets* dans leur séquence promotrice. Un tel gène, décisif pour la détermination des cellules hématopoïétiques, régulé à la fois par *c-Myb* et *c-Ets-1 in vivo*, coexistant au sein d'un complexe transitoire dont les membres seraient stabilisés dans la  $P135^{\Delta gag-myb-ets}$  est une vision simpliste

auquelle je rêve parfois. Cette évocation onirique servira de transition pour aborder maintenant le chapitre consacré aux protéines Ets.

## **IV - LE PROTO-ONCOGENE C-ETS-1.**

## IV - LE PROTO-ONCOGENE C-ETS-1.

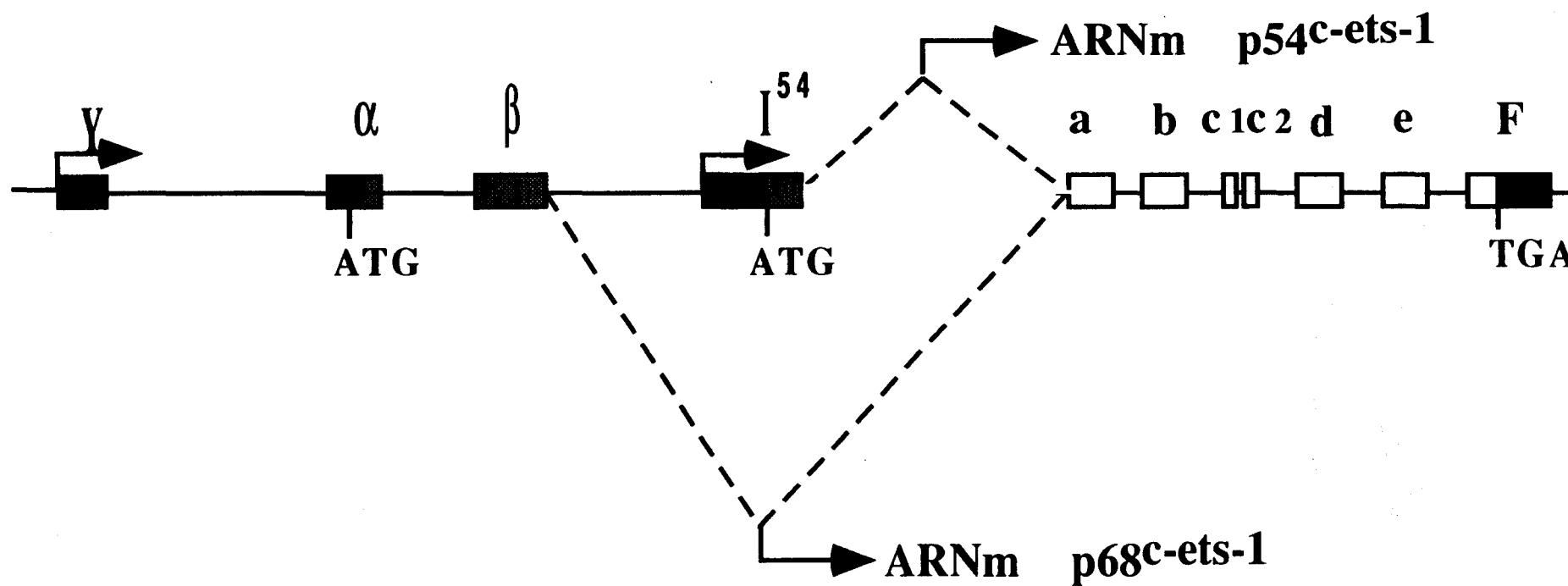
### A - Introduction.

La première évidence de l'existence d'une séquence d'origine cellulaire en plus de *v-myb* dans le génome du rétrovirus E26 a été apportée par M. Roussel et coll. (1979). Ces auteurs ont montré que les séquences spécifiques des rétrovirus AMV et E26, ie les séquences ne codant pas pour des gènes de structure ne présentaient que des homologies partielles. Trois hypothèses avaient été formulées : soit ces 2 virus avaient acquis des séquences cellulaires différentes au départ, soit ils avaient transduit le même oncogène qui avait évolué différemment en fonction des passages du virus, soit E26 avait subi une recombinaison secondaire et avait transduit en plus de *v-myb* un second oncogène. Le clonage de l'ADN proviral de E26 et d'un ADNc codant pour la protéine de 135kD, produit de E26, a permis de valider cette dernière hypothèse. La séquence de E26 se décompose en 650bp du gène *gag*, 1430pb de *v-myb*, 1400pb de *env* et d'environ 1500pb de séquence alors inconnue qui s'intercale entre *v-myb* et *env*. Cette séquence inconnue a été dénommée *ets* pour *E-twenty-six specific* (Leprince et al., 1983a) ou *E26 transformation-specific* (Nunn et al., 1983) (Fig.4). La séquence *v-ets* présente toutes les caractéristiques d'un oncogène. Elle est traduite et constitue le domaine carboxy-terminal de la protéine de fusion P135 $\Delta$ *gag-myb-ets*. Elle est d'origine cellulaire, conservée au cours de l'évolution (du moins en partie, voir plus loin), et elle est transcrite en ARNm de 7,5, 2,2 et 2,0 kb détectables dans certaines cellules normales aviaires (Leprince et al., 1983a). Les sondes synthétisées à partir de cette séquence *v-ets* ont permis le clonage de son homologue cellulaire: le proto-oncogène *c-ets-1*.

#### 1 - Le locus *c-ets-1* de poulet code deux facteurs de transcription.

Le locus *c-ets-1* couvre au moins 80kpb d'ADN génomique chez le poulet (Fig.14). Les régions d'homologie à *v-ets* sont séparées en deux domaines de part et d'autre d'une séquence de 40kpb non apparentée au gène viral. Le domaine homologue aux 224 premiers nucléotides de *v-ets* est représenté dans deux séquences exoniques appelées  $\alpha$  et  $\beta$ , qui n'ont pas été trouvées dans l'ARNm *c-ets-1* de 7,5kb majoritaire qui s'accumule en particulier dans les cellules lymphoïdes (Gégonne et al., 1987a, b; Watson et al., 1988a, b). Le deuxième domaine comporte 7 régions d'homologies a, b, c1, c2, d, e, F qui rendent compte des 1250pb restantes de séquence virale. Un anticorps dirigé contre la partie amino-terminale de *v-ets* codée par  $\alpha$  et  $\beta$  immunoprécipite la P135 $\Delta$ *gag-myb-ets* mais non la protéine majeure de poids apparent 54kD, codée par *c-ets-1*. Des anticorps dirigés contre la partie carboxy-terminale sont par contre capables d'immunoprécipiter ces

**Figure 14 : le locus c-ets-1 aviaire**



deux protéines (Ghysdael et al., 1986a; Gégonne et al., 1987b). L'isolement d'un ADNc codant la p54<sup>c-ets-1</sup> a montré que ses 27 premiers acides aminés n'avaient pas d'équivalent dans la P135<sup>Δgag-myb-ets</sup> (Duterque-Coquillaud et al., 1988; Watson et al., 1988b). Le reste de l'ADNc est colinéaire à *v-ets* sauf pour la région la plus en 3', F, qui est tronquée, les 13 derniers codons de *c-ets-1* (les 13 derniers codons de l'exon F) ayant été remplacés par 16 codons dans *v-ets*, codés par le brin antisens de l'extrémité 3'codante de *c-ets-1* (Cette séquence de *v-ets* a été appelée f). Les premiers acides aminés de la p54<sup>c-ets-1</sup> sont en fait codés par un exon, appelé I<sup>54</sup> localisé dans les 40kpb de séquence entre les exons β et α (Duterque-Coquillaud et al., 1988).

Seule l'origine des séquences α et β, homologues à la partie 5' de *v-ets* restait obscure. D. Leprince et coll. (1988) ont montré que α et β étaient des exons fonctionnels du locus *c-ets-1*: une sonde spécifique de ces exons hybride avec des ARNm de 7,5kb détectés uniquement dans la rate de poulet. 2 ARNm de 7,5kb sont donc transcrits à partir du locus *c-ets-1* chez le poulet par un processus d'initiation de la transcription et d'épissage alternatifs (Leprince et al., 1988; Crépieux et al., en préparation). Le premier type d'ARNm est initié dans un promoteur en amont de l'exon I<sup>54</sup> et comprend cet exon plus les 7 exons de α à F communs à *v-ets*; il code le produit "majoritaire" de ce locus: la p54<sup>c-ets-1</sup>. La deuxième espèce d'ARNm est initiée en amont de l'exon α. Un processus d'épissage alternatif élimine I<sup>54</sup> et génère un ARNm qui est le progéniteur cellulaire de *v-ets*, et qui comprend les exons α et β accolés aux exons α à F. Cet ARNm code une protéine de 68kD, la p68<sup>c-ets-1</sup>, immunoprécipitée spécifiquement dans la rate par un sérum dirigé contre le peptide codé par les exons α et β. Il faut souligner que des séquences apparentées à α et β n'ont été retrouvées que chez les sauropsidiés, reptiles et oiseaux mais non pas pu être détectées chez les mammifères (Albagli et al., 1992). Chez les mammifères la p63<sup>c-ets-1</sup> murine (Chen, 1985) et la p55<sup>c-ets-1</sup> humaine (Pognonec et al., 1988) sont des homologues de la p54<sup>c-ets-1</sup> aviaire.

Le locus *c-ets-1* de poulet code donc deux protéines différentes par leur extrémité aminoterminal (Fig.14). La p54<sup>c-ets-1</sup> et la p68<sup>c-ets-1</sup> sont toutes deux des facteurs de transcription qui se fixent sur une séquence spécifique de l'ADN (pour revue, MacLeod et al., 1992). Leur structure moléculaire est moins bien caractérisée que celle de *c-myb*. Cependant des domaines fonctionnels ont pu y être délimités, ce qui a permis de révéler les premières différences dans leur fonction (Fig.15).

## 2 - Le domaine de fixation à l'ADN de *c-ets-1*.

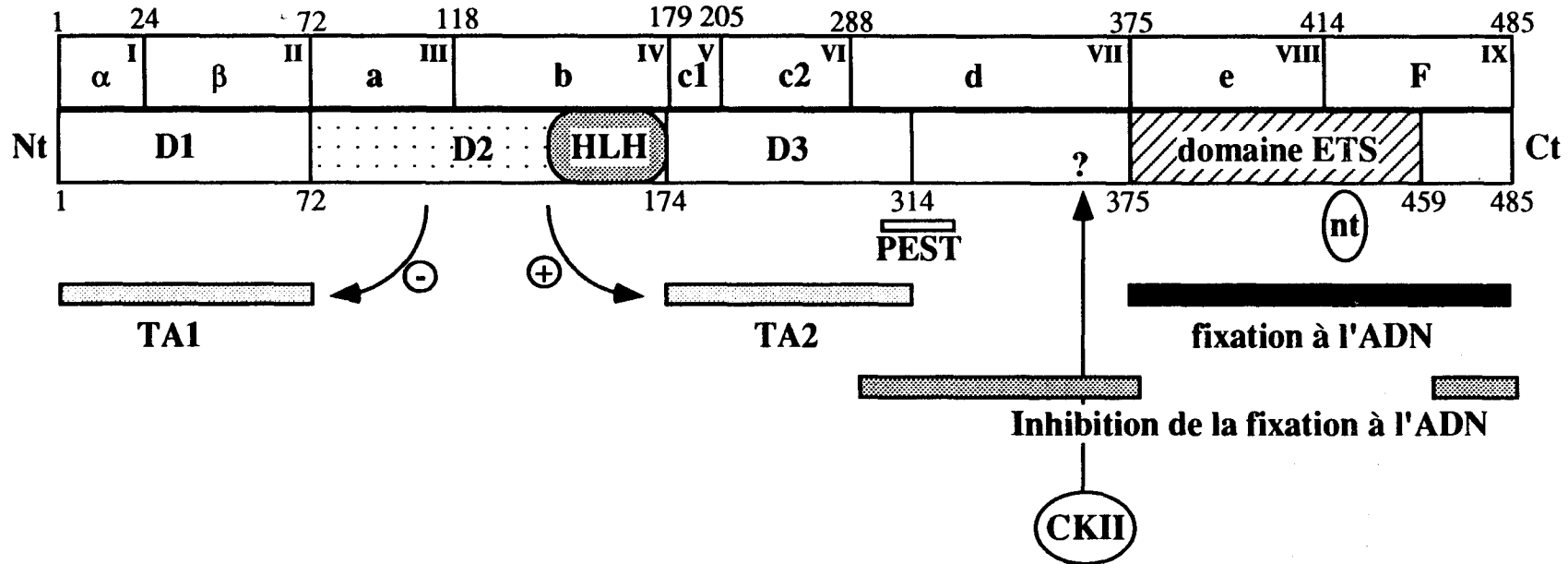
### a) Caractérisation.

Les protéines c-Ets-1 sont nucléaires, associées à la chromatine *in vivo* et fixent l'ADN *in vitro* (Boulukos et al., 1989; Pognonec et al., 1989; Leprince et al., 1990). Le domaine

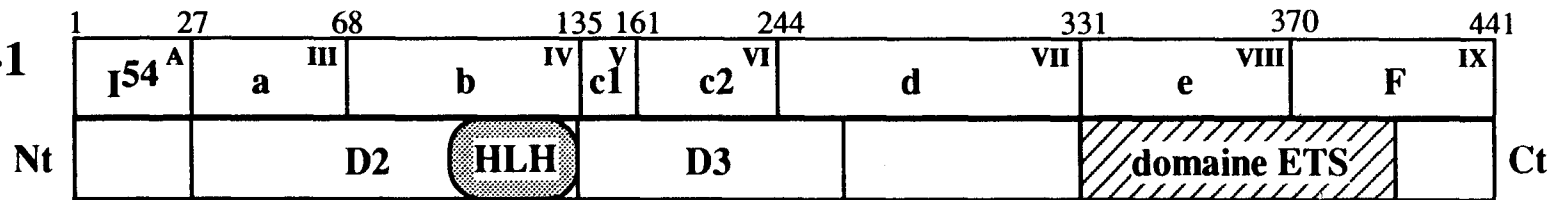
**figure 15 : structure et domaines fonctionnels des différentes protéines c-Ets-1**

TA, domaine transactivateur; CKII, séquence consensus de phosphorylation par le caséine kinase II; nt, séquence d'envoi dans le noyau; HLH, zone d'homologie avec un domaine hélice-boucle-hélice.

**p68c-ets-1**

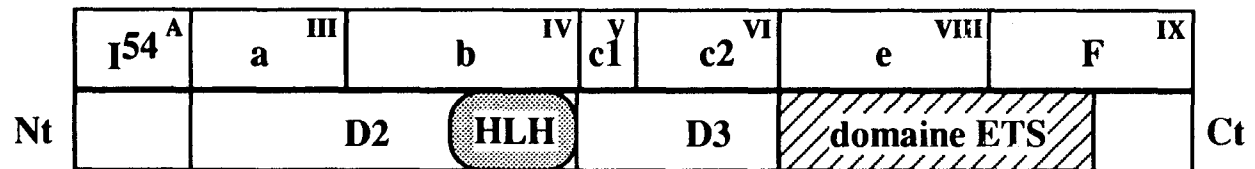


**p54c-ets-1**



**p42c-ets-1Δd**

décrite dans l'espèce murine et humaine





responsable de cette activité est localisé dans la partie carboxy-terminale des protéines c-Ets-1 (résidus 379 à 458 de la p68<sup>c-ets-1</sup>) (Boulukos et al., 1989; Reddy et Rao, 1990; Gégonne et al., 1992; Lim et al., 1992; Nye et al., 1992; Wang et al., 1992; Wasylyk et al., 1992). Il couvre un peptide de 85 acides aminés très conservés, appelé domaine ETS qui définit la famille des protéines ETS (Karim et al., 1990; MacLeod et al., 1992) (Fig.15,16). Il ne présente pas d'homologie structurale avec des domaines de fixation à l'ADN déjà connus. La présence de trois résidus tryptophanes dans le domaine ETS espacés de 17-18 acides aminés peut faire penser au domaine de fixation à l'ADN des protéines Myb, qui possède cependant ces trois résidus répétés trois fois dans chaque motif répété (R1, R2, R3) (Fig.8). De plus, PU-1, un des membres de la famille ETS a une tyrosine à la place du tryptophane le plus amino-terminal (Klemsz et al., 1990). Les amateurs de telles comparaisons de séquence font valoir le fait que la mutation d'un tryptophane en tyrosine n'affecte pas la fixation de c-Myb à l'ADN (Saikumar et al., 1990, Frampton et al., 1991). Les protéines c-Ets-1 aviaire, murine et humaine, réduites à ce domaine d'homologie, plus les 27 acides aminés carboxy-terminaux (acides aminés 325 à 441 de la p55<sup>c-ets-1</sup> humaine), se fixent spécifiquement à l'ADN avec une affinité plus forte que les protéines de pleine longueur (Nye et al., 1992; Wang et al., 1992; Wasylyk et al., 1992; Wasylyk et Wasylyk, 1992). Des délétions affectant les 27 amino-acides carboxy-terminaux de la p68<sup>c-ets-1</sup> réduisent fortement la fixation à l'ADN indiquant que des éléments autres que le domaine ETS sont impliqués dans le contact avec l'ADN ou dans sa stabilisation (Wasylyk et Wasylyk, 1992). Dans le contexte du fragment 325 à 441 de la p55<sup>c-ets-1</sup>, les mutations du premier et du troisième tryptophane respectivement en sérine et en arginine abolissent la fixation à l'ADN; la mutation du deuxième tryptophane en leucine ne la réduit que légèrement. Un comportement absolument similaire est observé pour c-Myb, où le remplacement des résidus tryptophanes par un acide aminé hydrophobe ne semble perturber que modérément la structure tertiaire du domaine de fixation à l'ADN (Saikumar et al., 1990; Frampton et al., 1991). Ces mutations dans les tryptophanes du domaine ETS sont donc trop ou trop peu drastiques pour permettre de tirer une conclusion claire sur l'importance de ces résidus. Une analyse informatisée de la séquence du domaine ETS prévoit une structure en hélice  $\alpha$  séparée d'un domaine riche en acides aminés basiques par une région charnière de 23 acides aminés (Wang et al., 1992). Les mutations de 4 acides aminés au centre de l'hélice putative ou de 4 acides aminés basiques très conservés abolissent la fixation à l'ADN de la protéine c-Ets-1 tronquée. Cette proposition d'organisation spatiale est confortée par l'analyse de la conservation phylogénique du domaine ETS, qui montre que les acides aminés qui formeraient l'hélice  $\alpha$  ou le domaine basique sont mieux conservés parmi les autres membres de la famille ETS que la région charnière (Laudet et al., soumis) (Fig.15). La partie carboxy-terminale riche en acides aminés basiques est faiblement homologue au domaine de fixation à l'ADN des protéines HMG (High Mobility Group) (Waterman et al., 1991). Ces dernières sont définies comme des protéines non histones associées à la chromatine; leur domaine de fixation à l'ADN a été également retrouvé dans un grand nombre de

	Hélice $\alpha$				Charnière				Domaine basique				
	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100			
HETS1	GSG---PI	QLWQFLELLTLDKS	--CQSFISWTG-DGWEFKLS--	DPDEVA	RRWGKRK-NKPKMNYEKLSRGLRYYYDKNI	IHKTA-GKRYVYRFVCDL	QSLLG	93					
CETS1	GSG---PI	QLWQFLELLTLDKS	--CQSFISWTG-DGWEFKLS--	DPDEVA	RRWGKRK-NKPKMNYEKLSRGLRYYYDKNI	IHKTA-GKRYVYRFVCDL	QSLLG	93					
VETS	GSG---PI	QLWQFLELLTLDKS	--CQSFISWTG-DGWEFKLS--	DPDEVA	RRWGKRK-NKPKMNYEKLSRGLRYYYDKNI	IHKTA-GKRYVYRFVCDL	QSLLG	93					
XETS1A	GSG---PI	QLWQFLELLTLDKS	--CQSFISWTG-DGWEFKLS--	DPDEVA	RRWGKRK-NKPKMNYEKLSRGLRYYYDKNI	IHKTA-GKRYVYRFVCDL	QSLLG	93					
XETS1B	GSG---PI	QLWQFLELLTLDKS	--CQSFISWTG-DGWEFKLS--	DPDEVA	RRWGKRK-NKPKMNYEKLSRGLRYYYDKNI	IHKTA-GKRYVYRFVCDL	QSLLG	93					
HETS2	GSG---PI	QLWQFLELLSDKS	--CQSFISWTG-DGWEFKLA--	DPDEVA	RRWGKRK-NKPKMNYEKLSRGLRYYYDKNI	IHKTS-GKRYVYRFVCDL	QNLG	93					
CETS2	GSG---PI	QLWQFLELLTLDKS	--CQSFISWTG-DGWEFKLA--	DPDEVA	RRWGRRK-NKPKMNYEKLSRGLRYYYDKNI	IHKTS-GKRYVYRFVCDL	QNLG	93					
XETS2A	GSG---PI	QLWQFLELLTLDKS	--CQSFISWTG-DGWEFKLT--	DPDEVA	RRWGKRK-NKPKMNYEKLSRGLRYYYDKNI	IHKTS-GKRYVYRFVCDL	HNLG	93					
XETS2B	GSG---PI	QLWQFLELLTLDKS	--CQSFISWTG-DGWEFKLA--	DPDEVA	RRWGKRK-NKPKMNYEKLSRGLRYYYDKNI	IHKTS-GKRYVYRFVCDL	HNLG	93					
SUETS2	GSG---PI	QLWQFLELLTLDKT	--CQHFISWTG-DGWEFKLS--	DPDEVA	RRWGKRK-NKPKMNYEKLSRGLRYYYDKNI	IHKTA-GKRYVYRFVCDL	QSLG	93					
DETS2	GSG---PI	QLWQFLELLLDKT	--CQSFISWTG-DGWEFKLT--	DPDEVA	RRWGIRK-NKPKMNYEKLSRGLRYYYDKNI	IHKTA-GKRYVYRFVCDL	QNLG	93					
ERG	GSG---QI	QLWQFLELLSDSS	--NSSCITWEG-TNGEFKMT--	DPDEVA	RRWGERK-SKPNMNYDKLSRALRYYYDKNI	IMTKVH-GKRYAYKF--DF	HGIAQ	91					
FLI	GSG---QI	QLWQFLELLSDSA	--NASCITWEG-INGEFKMI--	DPDEVA	RRWGERK-SKPNMNYDKLSRALRYYYDKNI	IMTKVH-GKRYAYKF--DF	HGIAQ	91					
SUERG	?SG---QI	QLWQFLELLSDSS	--NANCITWEG-TNGEFKMT--	DPDEVA	RRWGERK-SKPNMNYDKLSRALRYYYDKNI	IMTKVH-GKRYAYKF--DF	AGLAQ	90					
DETS3	GSG---QI	QLWQFLELLSDSN	--NASCITWEG-TNGEFKLT--	DPDEVA	RRWGERK-SKPNMNYDKLSRALR??	??	?????	64					
DETS4	GG---SHI	HLWQFLKELLASPQ	VNGTA-IRWIDRSKGIFKIE--	DSVRVA	KLWGRRK-NRPAMNYDKLSRSIRQYKKGIMKKT	TERSQRLVYQF-CHP	---	92					
DETS6	GSG---GQI	QLWQFLELLADSS	--NANAIWEG-QSGEFRLI--	DPDEVA	RRWGERK-AKPNMNYDKLSRALRYYYDKNI	IMTKVH-GKRYAYKF--DF	HGLMA	92					
GABP	G---NNGQI	QLWQFLELLTLDKD	--ARDCISWVG-DEGEFKLN--	QPELVA	QKWGQRK-NKPTMNYEKLSRALRYYYDGD	MI CKVQ-GKRFVYKFVCDL	KTLIG	94					
DELG	GSGNNGQV	QLWQFLLEYLTDCE	--HTDVIEWVG-TEGEFKLT--	DPDRVA	RLWGEKK-NKPAMNYEKLSRALRYYYDGD	MI SKVS-GKRFAYKFDCDL	KLLIG	96					
POK	NTN---GRL	-LWDFLQQLLNDRN	QKYSDLIAWKCRTDGVFKIV--	DPAGLA	KLWGIQK-NHLSMNYDKMSRALRYYYR	VNI LRKVQ-GERHCYQFLRNP	TELKN	96					
SAP1	---MDSAI	TLWQFLLOLQKQ	--NKHMI CWTSMDG-QFKLL--	QAEVA	RLWGIRK-NKPNMNYDKLSRALRYYYV	KNI IKKVN-GQKFVYKFVS-Y	PEILN	92					
ELK	---MDPSV	TLWQFLLOLREQ	--NGHIISWTSRDGGEFKLV--	DAEVA	RLWGLRK-NKTNMNYDKLSRALRYYY	DKNI IRKVS-GQKFVYKFVS-Y	PEVAG	93					
PEA3	PYQRRGAL	QLWQFLVALLDDPT	--NAHFIAWTG-RGMEFKLI--	EPEVA	RLWGIQK-NRPAMNYDKLSRSLRYYYE	KGIMQKVA-GERYVYKFVCEP	EALFS	93					
ELF1	K-G---NTI	YLWFLALLQDKA	T-CPKYIKWTQREKGIFKLV--	DSKAVS	RLWGKHK-NKPDNNEYTMGRALRYYY	QRGILAKVE-GGRLVYQFKEMP	KDLIY	95					
E74	REG---STT	YLWFLKLLQDRE	Y-CPRFIKWTNREKGVFKLV--	DSKAVS	RLWGMHK-NKPDNNEYTMGRALRYYY	QRGILAKVD-GQRLVYQFVDVP	KDII E	96					
SPI1	GSKKK---I	RLYQFLDLRLSGD	MK--DSIWWVDKDKGTQFSSKHKEALA		HRWGIQKGNRKMRTYQKMARALRNY	GKTGEVKKVKK--KLTQFSGEV	--LGR	95					
SPI2	GTRKK---L	RLYQFLGLLTRGD	MR--ECVWVVEPAGVGFQFSSKHKEALA		RRWGOQKGNRKMRTYQKLARALRNY	AKTGEIRKVKR--KLTQFDSAL	--LPA	95					
CONS		L**FL *L	* W	F*	*	WG K M*Y * R *R*Y*	K * Y F						

**Figure 16 : Alignement des domaines ETS des membres de la famille ETS. Les acides aminés invariants sont indiqués dans la ligne consensus. \* désigne un résidu conservé dans un gène sur quatre. Cadeau généreux de Laudet et coll. soumis**

facteurs de transcription (Ner et al., 1992). Pour résumer, ces quelques études préliminaires ne permettent pas de proposer une structure pour le domaine de fixation à l'ADN des protéines c-Ets-1 qui soit étayée par des données mutationnelles ou physico-chimiques. Elles montrent simplement que ce domaine de fixation est d'un type entièrement nouveau. Le fait que des domaines homologues soient retrouvés dans un nombre toujours plus grand de facteurs de transcription dans différentes espèces animales, va sans doute permettre une amélioration rapide de nos connaissances sur ce sujet.

#### b) La famille de gènes ETS.

La famille de gène ETS est définie par rapport à la présence du domaine ETS, responsable de la fixation à l'ADN (Fig.16). Dans ce domaine, une homologie de 100% est trouvée entre les produits des gènes *c-ets-1* caractérisés chez le xénope, le poulet, la souris et l'homme (Watson et al., 1988a; Chen, 1990; Stiegler et al., 1990; Watson et al., 1990). Le plus proche homologue de *c-ets-1* a été découvert en recherchant des séquences homologues à *v-ets* chez l'homme. Deux loci différents ont été décrits, l'un *c-ets-1* sur le chromosome 11q23 (De Taisne et al., 1984), l'autre *c-ets-2* sur le chromosome 21q22 (Watson et al., 1985, 1986). K. Boulukos et coll. (1988) ont montré que ce locus était présent aussi chez le poulet. *c-ets-2* code des protéines de 58 à 64kD exprimées en particulier dans des macrophages activés (Ghysdael et al., 1986b; Boulukos et al., 1988, 1990). L'homologie entre *c-Ets-1* et *c-Ets-2* est supérieure à 95% dans le domaine ETS. Comme *c-ets-1*, *c-ets-2* est également présent chez le xénope sous la forme de deux gènes, *c-ets-2* a et b, cette particularité étant due au génome essentiellement tétraploïde de cette espèce (Wolf et al., 1991). *c-ets-2* chez le xénope est exprimé sous la forme d'un messenger maternel et il a un rôle important dans la maturation des ovocytes (Chen et al., 1990). Un seul gène homologue à *c-ets-1* et à *c-ets-2* a été caractérisé chez la drosophile et l'oursin (Chen et al., 1988; Pribyl et al., 1988). La conservation de ces gènes est remarquable puisque l'homologie entre les gènes humains et le gène de drosophile dans le domaine ETS est supérieure à 90%.

La famille ETS n'est pas limitée aux homologues de *c-ets-1* dans le règne animal. Au sein d'une même espèce, plusieurs facteurs de transcription, qui présentent des homologies plus lointaines avec le domaine ETS de *c-Ets-1*, ont été décrits (pour revue voir Karim et al., 1990; MacLeod et al., 1992; Lautenberger et al., 1992; Laudet et al., soumis) (Fig.16). L'alignement des séquences des domaines ETS définit les différents membres de la famille ETS. Cette famille peut être séparée en 9 groupes différents: ceux des gènes *Spi*, les plus divergents; *pokkuri* et *D-ets-4* de drosophile; *elf*, *elk*, *PEA3*, *elg*, *erg* et *ets*. La famille ETS est très ancienne, puisque les duplications qui ont généré les différents groupes actuels ont eu lieu avant la séparation arthropodes vertébrés, il y a environ 500 millions d'années (Lautenberger et al., 1992; Laudet et al., soumis). Voulant éviter l'ennui d'un catalogue, et bien que chacun de ces gènes mérite à lui seul un chapitre,

je n'irai pas plus loin dans la présentation de la famille ETS. L'isolement des différents membres de la famille ETS et la détermination de leurs homologues sont très instructifs, ne serait-ce que du point de vue biologique, puisqu'on peut imaginer que des facteurs de transcription appartenant à un même groupe puissent se lier à des séquences nucléotidiques voisines et entrer en compétition pour réguler la transcription de gènes cibles communs. Des protéines Ets, qui répondent différemment à l'environnement cellulaire, ou qui interagissent avec différents facteurs transcriptionnels, assureraient une régulation complexe de l'expression d'un gène cible considéré grâce à un seul site de fixation. L'examen des séquences reconnues par les protéines Ets révèle que celles-ci sont effectivement voisines.

### c) Les séquences de fixation des protéines ETS.

La première évidence indiquant que les protéines Ets reconnaissent une séquence spécifique, est venue en criblant une banque d'expression d'ADNc avec un oligonucléotide représentant une région du LTR du virus MSV (Moloney murine Sarcoma Virus) protégée par des extraits nucléaires de lymphocytes T (Gunther et al., 1990). Cette expérience a permis d'isoler un ADNc codant les 272 acides aminés carboxy-terminaux de la p63<sup>c-ets-1</sup> murine, qui se fixent de manière spécifique sur cet oligonucléotide. La séquence de fixation des protéines Ets a pu être définie plus précisément après la découverte que la p68<sup>c-ets-1</sup>, la p54<sup>c-ets-1</sup> et les p58/64<sup>c-ets-1</sup> transactivent l'*enhancer* du virus du polyôme qui médie la réponse aux oncogènes *v-src*, moyen T du polyôme, *c-Ha-ras*, *v-mos*, *v-raf*, au TPA et au sérum (Wasylyk et al., 1989, 1990). Cet *enhancer* est composé de deux sites juxtaposés, AP1 et PEA3 (*Polyoma Enhancer Activity 3*), qui coopèrent en *cis* pour induire une transactivation maximale. B. Wasylyk et coll. (1990) ont montré que la p68<sup>c-ets-1</sup> n'a plus d'effet sur cet *enhancer* s'il est muté dans la séquence PEA3 (mais pas dans AP1) et que la p68<sup>c-ets-1</sup> se fixe spécifiquement sur cette séquence. Cette séquence 5'-GCAGGAAGT-3' contient le noyau GGA que l'on retrouve dans tous les sites de fixation des protéines Ets, mais elle ne représente pas le site optimal de fixation pour les protéines c-Ets-1 et c-Ets-2. Les séquences possibles de fixation appelées EBS pour Ets Binding Site, ont été déterminées par la technique de sélection des sites de fixation couplée à la PCR et par la technique de retard sur gel quantitatif, soit avec le domaine ETS, soit avec la protéine c-Ets-1 totale préparée à partir d'extraits nucléaires de lymphocytes T (Fisher R.J. et al., 1991; Wasylyk et al., 1991; Nye et al., 1992; Woods et al., 1992). 5'-RCMGGAWRY-3' (M = A ou C; R = A ou G; W = A ou T; Y = C ou T) correspond aux séquences consensus pour les protéines c-Ets-1 et c-Ets-2, qui sont aussi reconnues par les protéines apparentées PEA3, SAP-1, Erg-1 et Elk-1 (Wasylyk et al., 1990; Reddy et Rao, 1991; Wasylyk et al., 1991; Dalton et Treisman, 1992; Rao et Reddy, 1992; Woods et al., 1992; Xin et al., 1992). Les protéines PU-1 et Elf-1 et GABP- $\alpha$  semblent avoir d'autres

spécificités (Pongubala et al., 1992; Thompson et al., 1991; Thompson et al., 1992; Wang et al., 1992; Wasylyk et al., 1992).

Le domaine de fixation à l'ADN de c-Ets-1 se lie à la séquence **MGGA** localisée probablement dans le grand sillon de l'ADN. La zone de contact s'étend dans les petits sillons adjacents et recouvre en tout une vingtaine de bases (Nye et al., 1992). Selon ces auteurs, ce mode de fixation n'a jamais été observé pour d'autres facteurs de transcription; il est donc tout à fait particulier au domaine ETS. Il sera intéressant de confronter ces observations à la structure tridimensionnelle de ce domaine, lorsque des modèles seront disponibles.

Des sites EBS ont été identifiés dans d'autres séquences de régulation de la transcription de gènes viraux et cellulaires. Citons le promoteur de la stromélysine 1, un enzyme qui dégrade la matrice extracellulaire (Wasylyk et al., 1991), celui de *c-ets-1* et de *c-ets-2* (Mavrothalassitis et Papas, 1991; Oka et al., 1991; Ascione et al., 1992; Majerus et al., 1992, Crépieux et al., en préparation) (Fig.18). Les séquences EBS sont souvent retrouvées dans les régions régulatrices de gènes exprimés dans les cellules lymphoïdes: le LTR du virus HTLV-1 (Human T-Lymphotropic Virus-type 1) (Bosselut et al., 1990; Gitlin et al., 1991); les *enhancers* des récepteurs  $\alpha$  et  $\beta$  des cellules T (TCR $\alpha$  et TCR $\beta$ ) (Ho et al., 1990; Prosser et al., 1992); le promoteur de *mb-1*, un gène exprimé au cours de la différenciation des lymphocytes B (Hagman et Grosschedl, 1992).

### 3 - La régulation de la transcription par c-Ets-1

#### a) Les gènes cibles des protéines c-Ets-1.

La détermination de la séquence consensus de fixation des protéines c-Ets-1 a permis l'identification de gènes cibles potentiels. Ainsi, la mutation de l'EBS dans l'*enhancer* du TCR $\alpha$ , qui empêche la fixation de la protéine c-Ets-1 humaine, abolit l'activité de cet élément dans les cellules T (Ho et al., 1990). Ces résultats, ainsi que l'induction simultanée de l'expression de *c-ets-1* et du TCR $\alpha$  dans les thymocytes au 18ème jour du développement de l'embryon de souris suggèrent que la protéine c-Ets-1 participe à la régulation de la transcription de ce gène dans les lymphocytes T (Bhat et al., 1989). Dans la lignée lymphoïde, les sites EBS de l'*enhancer* du TCR $\beta$  médient l'expression de ce gène qu'elle soit basale ou induite lors de l'activation des cellules T (Prosser et al., 1992). Ces deux gènes sont également coexprimés dans les lymphocytes T (Bhat et al., 1989). Mais de manière surprenante, l'expression de *c-ets-1* conduit à la répression de l'activité basale ou induite de cet *enhancer*. L'effet inhibiteur de c-Ets-1 sur la transcription du TCR $\beta$  est spécifique de cette protéine puisque l'expression de *c-ets-2* n'a aucun effet. L'activité de c-Ets-1 dépend donc du contexte du promoteur et du type cellulaire. Ainsi, toujours dans les cellules lymphoïdes, les protéines c-Ets-1 et c-Ets-2 transactivent le LTR du virus HTLV-1 (Bosselut et al.,

1990). Cette transactivation est médiée par 2 sites EBS protégés de l'attaque à la DNase I et des agents méthylant après fixation de la protéine c-Ets-1 (Gitlin et al., 1991).

c-Ets-1 est aussi capable de transactiver son propre promoteur, du moins en test de cotransfection dans des fibroblastes (Oka et al., 1991; Ascione et al. 1992; Majerus et al., 1992). Il faut cependant interpréter avec précaution ce genre d'analyse puisque un site EBS est aussi présent dans le promoteur de *c-ets-2*, et que les complexes activateurs et inhibiteurs qui s'y fixent *in vivo* ne semblent pas contenir de protéines c-Ets-1 et c-Ets-2, du moins dans les lignées cellulaires étudiées (Mavrothalassitis et Papas, 1991).

Des sites EBS ont été localisés dans les régions promotrices des gènes responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire comme la stromélysine, la collagénase I et l'activateur du plasminogène de type urokinase (uPA) (Gutman et Wasylyk, 1990; Rorth et al., 1990; Nerlow et al., 1991, 1992; Wasylyk et al., 1991). Les protéines c-Ets-1 (p54<sup>c-ets-1</sup> et p68<sup>c-ets-1</sup>) et c-Ets-2 activent le promoteur de la stromélysine de rat en cotransfection. Les deux sites EBS de ce promoteur sont aussi efficaces que la séquence PEA3 du virus du polyome répétée 4 fois (Wasylyk et al., 1991). En général, un seul site EBS dans un promoteur n'est pas suffisant pour que ce dernier soit inductible par les protéines Ets *in vitro*. Plus que l'espacement des sites et leur orientation, c'est le nombre de sites EBS qui est important pour observer une transactivation maximale. Le mécanisme moléculaire qui rend compte de ces observations est toujours inconnu. Les protéines c-Ets-1 ne coopèrent pas pour la fixation à l'ADN et s'y fixent sous forme monomérique (Wasylyk et al., 1991; Fischer et al., 1992; Hagman et Grosschedl, 1992; Nye et al., 1992). L'*enhancer* du polyome, du TCR $\alpha$ , le LTR du virus MSV, le promoteur de la collagénase et de l'activateur du plasminogène, qui ne contiennent qu'un seul site EBS, indispensable à l'activité *enhancer*, pourraient être régulés par les protéines Ets d'une manière plus subtile, en association avec des cofacteurs. Ainsi, le promoteur de la collagénase I et l'*enhancer* du polyome ont des sites EBS et AP1 imbriqués et qui pourraient être régulés par une coopération entre les protéines ETS et AP1 (Gutman et Wasylyk, 1990; Wasylyk et al., 1990).

Les gènes cibles putatifs de c-Ets-1 peuvent être classés en 2 catégories, la première regroupe des gènes exprimés au cours de la différenciation de la lignée lymphoïde, la seconde, des gènes impliqués dans le modelage de la matrice extracellulaire. Ces observations permettent de formuler des hypothèses quant aux rôles des protéines c-Ets-1 au cours de ces deux phénomènes. Ces hypothèses seront explicitées à la lumière de la description des cartes d'expression de *c-ets-1*. Les séquences cibles de c-Ets-1 ont permis de définir des systèmes où étudier les activités de régulation de la transcription de ces protéines.

## b) Les domaines de régulation de la transcription.

Ces domaines ont été délimités en réalisant des protéines de fusion entre de larges régions de la p54<sup>c-ets-1</sup> et de la p68<sup>c-ets-1</sup> et un domaine de fixation à l'ADN hétérologue, celui du transactivateur bactérien LexA (Fig.15). Ces vecteurs recombinants qui expriment ces protéines de fusion ont été cotransfectés dans des fibroblastes de souris avec un plasmide contenant l'opérateur *lexA* cloné en amont du gène *reporter* de la globine (Schneikert et al., 1992). Par cette méthode, deux domaines d'activation de la transcription ont été définis dans la p68<sup>c-ets-1</sup> : le premier, D1, correspond aux 71 premiers acides aminés codés par les exons  $\alpha$  et  $\beta$ , le second, D3, aux acides aminés 175 à 314, codés par les exons c1, c2 et la partie 5' de d. D3 peut être sans doute écourté du produit de l'exon d, cette partie étant dispensable à l'activité transactivatrice chez l'homme (Gégonne et al., 1992) (Fig.15). Les domaines D1 et D3 fonctionnent de manière autonome, indépendamment l'un de l'autre. Ils ne sont pas homologues à des domaines transactivateurs déjà connus. L'observation de leur composition en acides aminés révèle, un bien grand mot, que D1 est plutôt riche en cystéine et en proline et pauvre en acides aminés basiques. D3 est lui un peu plus riche en sérine par rapport au reste de la molécule et de nature acide. D1 et D3 ne présentent pas de caractères particuliers et leur structure tridimensionnelle est difficile à prévoir. Toutefois, un *doigt de zinc*, homologue au domaine transactivateur de la protéine Tat codée par le rétrovirus HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus-1) a été proposé pour D1 (Schneikert et al., 1992). Le doigt de zinc de Tat (CX<sub>2</sub>CX<sub>1</sub>CX<sub>2</sub>CX<sub>0</sub>CX<sub>2</sub>CX<sub>2</sub>C où C = cystéine et X est un acide aminé quelconque) est différent des doigts de zinc présents dans d'autres protéines régulatrices de la transcription comme par exemple les récepteurs nucléaires d'hormones (CX<sub>2</sub>CX<sub>13</sub>CX<sub>2</sub>C); il fixe 2 atomes de Zn<sup>2+</sup> qui médient la dimérisation de Tat (Frankel et al., 1988). Ces 7 cystéines de Tat sont toutes absolument requises pour l'activité transactivatrice de cette protéine (Kuppuswamy et al., 1989; Ruben et al., 1989). Outre la faible analogie entre le groupe de cystéines de Tat et celui de D1 de p68<sup>c-ets-1</sup> (séquence de D1: CX<sub>0</sub>CX<sub>6</sub>CX<sub>5</sub>CX<sub>0</sub>CX<sub>4</sub>CX<sub>0</sub>C), plusieurs évidences semblent indiquer que cette structure hypothétique n'est pas indispensable, en tout cas pas toute seule, puisque d'autres résidus en dehors sont requis pour que D1 transactive (Schneikert et al., 1992). De plus, 3 des cystéines sur 7 et 3 des prolines sur 7, une autre caractéristique de D1, ne sont pas conservées chez le canard (Albagli et al., 1992). Si la conservation phylogénique est un indice de l'importance de certains résidus, alors 2 caractères pourraient être mis en exergue: la séquence primaire de  $\alpha$ , et la nature très hydrophobe de la région entière codée par ces 2 exons. Ce dernier caractère serait particulièrement important pour établir des relations hydrophobes avec d'autres protéines, comme il a été montré pour une structure mieux définie comme le *leucine zipper* (Landschulz et al., 1988). Une structure dite en boucle  $\omega$ , qui prend en compte cette caractéristique a été proposée pour  $\alpha$  et  $\beta$  (Leprince et al., 1990). Cette boucle  $\omega$  serait exposée à l'extérieur de la molécule et serait disponible pour d'éventuelles interactions avec des facteurs de la machinerie transcriptionnelle.

Le domaine transactivateur D1 n'est présent que dans un seul produit du locus *c-ets-1*: la p68<sup>c-ets-1</sup> (Fig.15). L'extrémité amino-terminale de la p54<sup>c-ets-1</sup> codée par l'exon I<sup>54</sup> est, au contraire de D1, très hydrophile et n'a pas d'activité transactivatrice lorsqu'elle est fusionnée à LexA (Schneikert et al., 1992). La région D3, comprise entre les acides aminés 175 et 314, est donc le seul domaine transactivateur de la p54<sup>c-ets-1</sup> et de ses homologues dans les autres espèces animales. Un domaine correspondant à D3 a été identifié dans la p55<sup>c-ets-1</sup> humaine, compris entre les acides aminés 131 et 242 (Gégonne et al., 1992). Il partage avec d'autres domaines transactivateurs un caractère acide assez marqué (charge nette négative de -10) (pour revue voir Mitchell et Tjian, 1989). Toutefois il n'adopte pas la structure en hélice amphipathique qui caractérise ce type de domaines dans autres facteurs de transcription comme Fos et Jun (Baichwal et Tjian, 1990; Abate et al., 1991). Les domaines d'activation de la transcription D1 et D3 ne sont pas retrouvés chez d'autres membres de la famille ETS, même chez *c-ets-2*, le gène le plus homologue à *c-ets-1*. Curieusement, la p68<sup>c-ets-1</sup> et la p58-64<sup>c-ets-2</sup> interagissent avec un même cofacteur présent en quantité limitante dans les cellules (Schneikert et al., 1992). Ces cofacteurs ou adaptateurs pourraient servir de relais entre les facteurs de transcription et l'ARN polymérase. Ainsi, l'expression de la p68<sup>c-ets-1</sup> inhibe la transactivation de l'opérateur *lexA* médiée par la protéine de fusion p58-64<sup>c-ets-2</sup>-LexA. Réciproquement, l'expression de *c-Ets-2* inhibe la transactivation par p68<sup>c-ets-1</sup>-LexA. Il reste à déterminer lequel de D1 ou de D3 est capable d'interagir avec le même cofacteur que *c-Ets-2*. Il se pourrait bien que ce soit D1 puisqu'il partage avec l'extrémité carboxy-terminale de *c-Ets-2* un caractère hydrophobe marqué. Il est intéressant de remarquer que des domaines non homologues sont capables d'interagir avec les mêmes coactivateurs de la transcription. Ceci suggère que ces adaptateurs méritent leur nom et sont capables d'interactions multiples, et /ou que la structure dans l'espace de ces domaines est voisine malgré leur séquence primaire différente.

Une région des protéines *c-Ets-1*, en plus du domaine de fixation à l'ADN, a été conservée chez *c-Ets-2* (70% d'homologie) et à un moindre titre chez *Erg-1* et *Fli-1*. Cette région appelée D2 est localisée entre les domaines transactivateurs D1 et D3, et elle a une fonction modulatrice de la transactivation (Schneikert et al., 1992) (Fig.15). D2 a un effet négatif sur D1 et positif sur D3. Dans la partie carboxy-terminale de D2 (acides aminés 141-176), une structure potentielle en hélice-boucle-hélice, comparable à celle des domaines de fixation à l'ADN des facteurs de transcription *c-Myc* ou *MyoD*, a été rapportée (Seth et Papas, 1990). Cette structure correspondrait aux acides aminés 135-169 de *c-Ets-2* de poulet (Boulukos et al., 1988) et serait aussi présente chez *Erg-1* et *Fli-1* (Bén-David et Bernstein, 1991). Elle est caractérisée par la présence de deux hélices amphipathiques séparées par une boucle de 15 acides aminés pour *c-Ets-1* et elle pourrait être impliquée dans l'interaction avec d'autres protéines (Jones et al., 1989).

Les domaines impliqués dans la régulation de la transcription des protéines *c-Ets-1* n'ont été délimités jusqu'à présent que d'une manière grossière. Un objectif essentiel pour l'avenir sera de



déterminer leur structure et comment cette dernière leur permet d'interagir avec le complexe de transcription, si cette interaction est directe ou médiée par des adaptateurs. Enfin, l'étude des promoteurs des gènes cibles permettra peut être de comprendre comment une protéine c-Ets-1 fixée sur une même séquence EBS peut avoir un effet activateur ou un effet represser de la transcription.

#### 4 - Régulation de la fonction des protéines c-Ets-1.

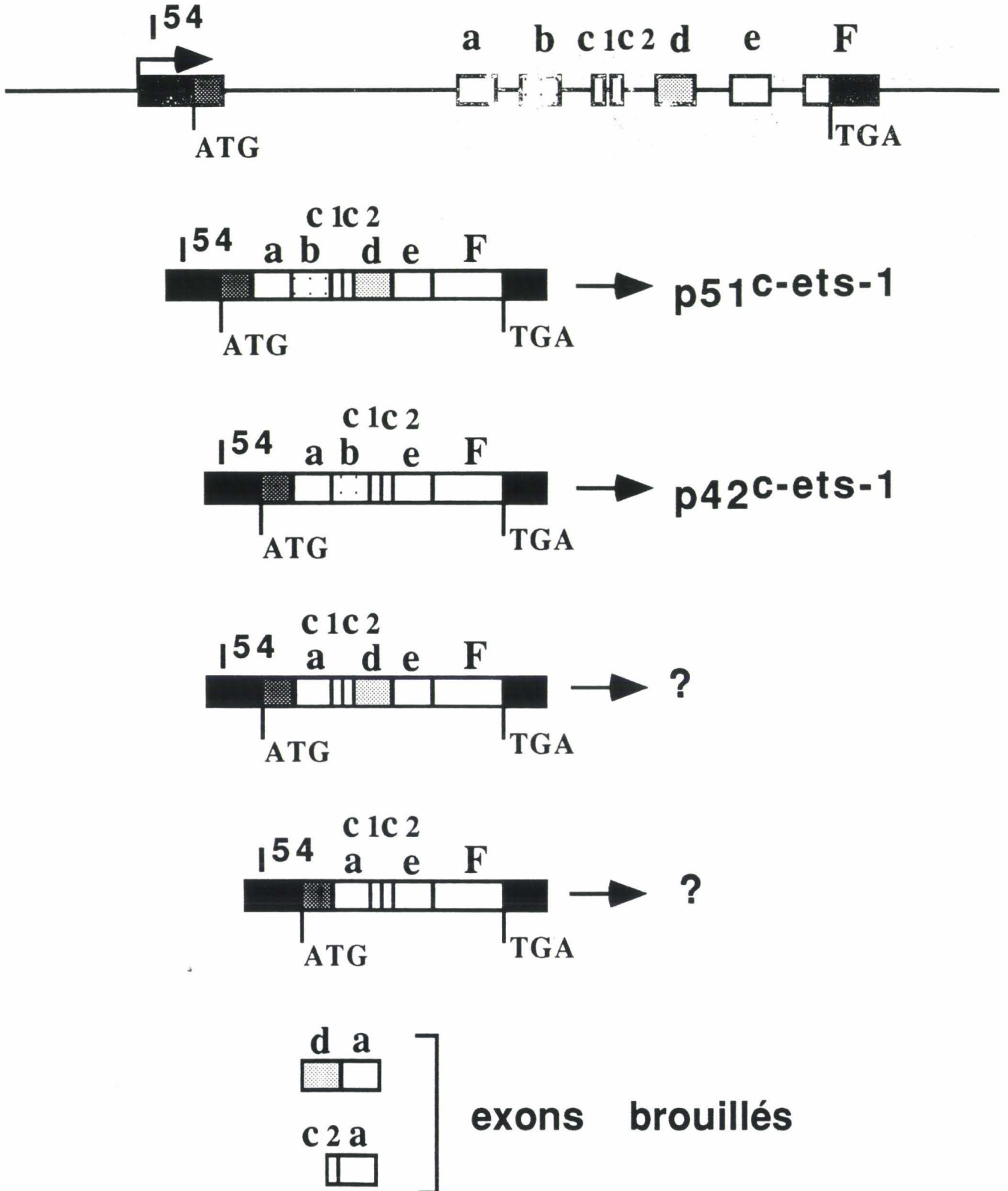
##### a) Répression de la fixation à l'ADN.

La protéine v-Ets ou le domaine de fixation à l'ADN des protéines c-Ets-1 pris isolément se lie beaucoup mieux à un site EBS que les protéines c-Ets-1 aviaire, murine ou humaine de pleine longueur. Cette observation suggère l'existence de régions impliquées dans la répression de la liaison à l'ADN (Lim et al., 1992; Nye et al., 1992; Wasylyk et al., 1992; Hagman et Grosschedl, 1992). Les protéines v-Ets et p68<sup>c-ets-1</sup> diffèrent par deux mutations ponctuelles et par le remplacement des 13 acides aminés carboxy-terminaux de c-Ets-1 par 16 acides aminés dans v-Ets, codés par le brin antisens de c-ets-1. Le remplacement de la valine de v-Ets par l'isoleucine de c-Ets-1 (en position 445 de la p68<sup>c-ets-1</sup>, dans le domaine ETS, Fig.16) diminue la capacité de la protéine v-Ets à fixer le site EBS du promoteur du gène *mb-1*. L'effet le plus important est obtenu lorsque l'on remplace les 16 acides aminés carboxy-terminaux de v-Ets par les 13 acides aminés de c-Ets-1. On observe alors une diminution drastique (30 fois) de la fixation à l'ADN de v-Ets (Hagman et Grosschedl, 1992). L'expérience inverse, c'est à dire le remplacement du bout carboxy-terminal de c-Ets-1 par celui de v-Ets augmente, au contraire la fixation à l'ADN de la protéine c-Ets-1. La fonction inhibitrice de la liaison à l'ADN de l'extrémité carboxy-terminale de c-Ets-1 a été confirmée par Lim et coll. (1992) qui montrent qu'une simple délétion des 8 derniers acides aminés de p68<sup>c-ets-1</sup> est suffisante pour augmenter sensiblement sa faculté à s'associer à l'ADN. Ce résultat a été obtenu pour des protéines de pleine longueur produites en lysat de réticulocytes. Cependant, une étude totalement contradictoire est parue avec une protéine de 35kD contenant les 311 acides aminés de la p68<sup>c-ets-1</sup>, ie le 2ème domaine transactivateur (D3) et le domaine de fixation à l'ADN. Dans ce contexte particulier, le remplacement des 13 acides aminés carboxy-terminaux de c-Ets-1 par les 16 acides aminés de v-Ets, et de l'alanine 285 et l'isoleucine 445 de c-Ets-1 par des valines dans v-Ets inhibet la fixation de la p35<sup>v-ets</sup> à la séquence PEA3 de l'*enhancer* du polyome (Leprince et al., 1992). Des résultats concordants ont été obtenus avec des protéines de pleine longueur synthétisées en lysat de réticulocytes ou avec des extraits nucléaires de cellules COS transfectées avec des vecteurs d'expression. La p68<sup>c-ets-1</sup> entre les mains de C. Wasylyk et de B. Wasylyk (1992) fixe très bien l'oligonucléotide EBS, alors que la p68<sup>v-ets</sup> ou la

P135 $\Delta$ *gag-myb-ets* ne donne qu'un faible retard sur gel. Les contradictions entre ces études ne semblent pas attribuables à des modifications post-traductionnelles qui pourraient affecter la fixation des protéines Ets. La p68<sup>c-ets-1</sup> est effectivement phosphorylée, cependant son incubation avec des phosphatases ne permet pas de lever l'inhibition de la fixation à l'ADN (Lim et al., 1992; Wasylyk et al., 1992). Il n'est toutefois pas évident que certains groupements phosphate n'aient pas pu résister à leur action. La migration en conditions non dénaturantes de v-Ets et celle de c-Ets-1 sont similaires (Lim et al., 1992). Ce dernier point suggère que l'inhibition n'est pas due à des interactions avec des cofacteurs. Des contingences plus triviales (mutation apparue dans l'un des clones, conditions expérimentales différentes) sont donc suspectées. En effet, dans notre laboratoire la p68<sup>c-ets-1</sup> produite en lysat est utilisée en tant que témoin positif de la fixation à l'ADN et est donc parfaitement capable de s'associer efficacement à la séquence EBS (Duterque Coquillaud et al., soumis). Il faut donc parfois que la raison abdique devant l'adversité expérimentale et se décide à attendre des cieux et des retards sur gel plus propices.

Une deuxième région impliquée dans l'inhibition de la fixation à l'ADN a été localisée dans le centre de la molécule (Lim et al., 1992; Nye et al., 1992; Wasylyk et al., 1992) (Fig.15). Des délétions amino-terminales successives ont impliqué les résidus 207 à 377 de la p68<sup>c-ets-1</sup> (Lim et al., 1992). Des délétions plus fines ont montré que ce domaine inhibiteur était codé entièrement par l'exon d (VII), acides aminés 291 à 377 de la p68<sup>c-ets-1</sup> (Wasylyk et al., 1992). Cet exon peut être éliminé des transcrits c-ets-1 par épissage alternatif. Il code un peptide riche en sérines, sites possibles de phosphorylation. Le domaine de fixation à l'ADN isolé ou associé au répresseur partagent la même spécificité de fixation au site EBS, cependant le domaine ETS isolé est 10 fois plus affine pour s'associer à sa séquence cible (Lim et al., 1992). De plus, la présence du répresseur empêche la reconnaissance entre le domaine de fixation à l'ADN de c-Ets-1 et un sérum dirigé spécifiquement contre lui (Wasylyk et al., 1992). Ces arguments tendent à montrer que le domaine répresseur agit en masquant ou en modifiant la structure de la zone de contact entre la protéine c-Ets-1 et l'ADN. Un modèle séduisant a été proposé par Lim et coll. (1992). L'interaction entre les deux domaines répresseurs, localisés dans le milieu de la molécule et à son extrémité carboxy-terminale, maintiendrait la protéine c-Ets-1 dans un état fermé incapable de fixer l'ADN. Le changement conformationnel conduisant à un état de la protéine ouvert actif serait médié par la perte d'un domaine répresseur, comme cela est illustré par v-Ets, ou par un mécanisme cellulaire encore inconnu. Des éléments structuraux viennent à l'appui de cette hypothèse. En effet, de part et d'autre du domaine de fixation à l'ADN, on trouve des régions riches en proline et en alanine, qui, comme dans les immunoglobulines ou les histones sont très flexibles et pourraient jouer le rôle de charnière pour permettre le repliement et l'interaction de domaines éloignés (Lim et al., 1992, Wasylyk et al., 1992). Ce mécanisme de répression intramoléculaire de la fixation à l'ADN existerait aussi pour la protéine c-Ets-2, médié par des domaines homologues (Wasylyk et al., 1992, Hagman et Grosschedl, 1992).

**Figure 17 : Les transcrits du locus *c-ets-1* humain, et leur produit**



### b) L'épissage alternatif des transcrits du locus *c-ets-1*.

Chez le poulet, un seul processus différentiel d'initiation de la transcription et d'épissage a été décrit pour le locus *c-ets-1* (Leprince et al., 1988; Crépieux et al., en préparation) (Fig.14, 15). Il permet de générer deux facteurs de transcription : la  $p68^{c-ets-1}$  et la  $p54^{c-ets-1}$  qui diffèrent par leur nombre de domaines d'activation de la transcription (Schneikert et al., 1992). Nous avons vu que la  $p68^{c-ets-1}$  possède 2 de ces domaines, représentés par les régions D1 et D3 de la molécule. D1 est codé par les exons  $\alpha$  et  $\beta$  spécifiques de la  $p68^{c-ets-1}$ . D3 est le seul domaine transactivateur trouvé dans la  $p54^{c-ets-1}$ . Il semble alors clair qu'une initiation et une maturation différentielle des transcrits *c-ets-1* chez le poulet produisent des facteurs ayant des activités transactivatrices différentes. Cependant, jusqu'à présent les études *in vitro* n'ont pas révélé de différences fort significatives entre la  $p68^{c-ets-1}$  et la  $p54^{c-ets-1}$ . La  $p68^{c-ets-1}$  a été simplement rapportée comme transactivant mieux que la  $p54^{c-ets-1}$  le promoteur de la stromélysine de rat dans des tests de cotransfection exécutés dans des cellules humaines (Wasylyk et al., 1991). La présence d'un domaine transactivateur supplémentaire dans la  $p68^{c-ets-1}$  lui confère donc plus d'efficacité dans l'absolu mais pourrait surtout lui apporter plus de flexibilité. On peut imaginer que la présence du domaine D1 permette à la  $p68^{c-ets-1}$  d'interagir avec des cofacteurs supplémentaires par rapport à la  $p54^{c-ets-1}$ .

La quête de séquences homologues aux exons  $\alpha$  et  $\beta$  chez les mammifères a été infructueuse (Albagli et al., 1992). Cependant, d'autres transcrits alternatifs *c-ets-1* humains, ont été détectés dans lymphocytes T (Fig.17). Le plus fréquent ne contient pas l'exon d (VII) codant pour le domaine responsable de la répression de la fixation à l'ADN (Reddy et Rao, 1988. Koizumi et al., 1990; Jorcyk et al., 1991). Ainsi, plusieurs isoformes des protéines *c-Ets-1* de 52, 51,49, 48,42 et 39kD, ont été détectées dans des lymphocytes humains (Koizumi et al., 1990) (NB: que le lecteur m'excuse pour la variabilité des poids moléculaires apparents, la  $p51^{c-ets-1}$  prend du poids en traversant l'Atlantique et correspond à la  $p55^{c-ets-1}$  humaine précédemment décrite). Les protéines de 52 et de 49kD sont des formes phosphorylées de la  $p51$  et de la  $p48$  respectivement; nous reparlerons bientôt de ces modifications post-traductionnelles. La  $p48$  et la  $p39$  résultent d'une modification des fonctions thiol portées par les cystéines des  $p51^{c-ets-1}$  et  $p42^{c-ets-1\Delta d}$  respectivement. Cet artéfact est du à un inhibiteur de protéases utilisé au cours de la purification de ces protéines, qui provoque une migration altérée des protéines en gel dénaturant (Fischer et al., 1992). En résumé, deux isoformes des protéines *c-Ets-1* sont effectivement traduites, l'une de 51kD qui contient tous les exons et l'autre de 42kD qui ne contient pas le domaine responsable de la répression de la fixation à l'ADN, codé par l'exon d (VII). Cette dernière s'associe plus efficacement au site EBS que les protéines *c-Ets-1* longues (Wasylyk et al., 1992). La  $p52^{c-ets-1\Delta d}$

murine, une isoforme de la p62<sup>c-ets-1</sup> qui ne contient pas l'exon d (VII) se fixe aussi plus fortement à l'ADN cellulose (Pognonec et al., 1990).

En plus des transcrits n'utilisant pas l'exon d (VII), d'autres transcrits différentiels, plus rares, sans exon b (IV) ou sans exon b et d ont été décrits dans l'espèce humaine par la technique de RT-PCR (Jorcyk et al., 1991). Les messagers ne contenant pas l'exon b (IV) coderaient des protéines délétées du domaine D2 qui régule l'activité des transactivateurs (du moins chez le poulet). L'exon b (IV) code en particulier une structure potentielle en hélice-boucle-hélice, souvent impliquée dans des interactions avec d'autres protéines. Plus curieux, 1% des ARNm totaux du locus *c-ets-1* humain sont le résultat d'épissages brouillés, c'est à dire que dans ces transcrits l'ordre normal des exons est modifié (Cocquerelle et al., 1992). Ainsi, des ARNs (peut-on les appeler messagers ?) ayant les exons c2 ou d placés avant l'exon a ont été caractérisés par les techniques de RT-PCR et de protection à la RNase. Ces ARNs ne sont pas polyadénylés, tout comme une fraction des transcrits du gène DCC (Deleted in Colorectal Carcinomas) qui subissent le même brouillage dans la maturation des ARNm. On ne connaît pas actuellement les extrémités de ces transcrits *c-ets-1* en 5' des exons c ou d et en 3' de a, et encore moins leur fonction biologique ou même leur traductibilité.

### c) Phosphorylation des protéines c-Ets-1.

La phosphorylation est la seule modification post-traductionnelle qui ait été rapportée pour les protéines c-Ets-1 jusqu'à présent. Les protéines c-Ets-1, phosphorylées en majorité sur des résidus sérines et plus rarement sur des thréonines, ont un poids moléculaire apparent supérieur à celui des formes non phosphorylées (Pognonec et al., 1988; Koizumi et al., 1990). L'addition de résidus phosphate, en modifiant la structure tridimensionnelle des protéines c-Ets-1, ralentit alors leur migration électrophorétique. Ainsi, les formes phosphorylées de la p54<sup>c-ets-1</sup> aviaire ont des poids moléculaires apparents de 63 (majoritaire) et de 72kD (minoritaire), ce qui suggère l'existence et l'usage de plusieurs sites de phosphorylation (Pognonec et al., 1988; Fisher R.J. et al., 1991). Ces 3 formes sont également retrouvées chez l'homme et la souris. La proportion des formes phosphorylées dans les thymocytes de poulet est faible, ce qui suggère une fonction de régulation pour ces modifications. En accord avec cette hypothèse, la demie vie de la forme phosphorylée, en fait la stabilité des groupements phosphates sur la protéine est de 10mn, alors que la demie vie de la p54<sup>c-ets-1</sup> est de 45mn. Le traitement de ces cellules par divers agents pharmacologiques connus pour activer les protéines kinases A et C ne permet pas d'augmenter le taux de phosphoprotéines c-Ets-1. Par contre l'incubation des thymocytes en présence de l'ionophore de calcium A23187 résulte en une phosphorylation rapide de presque la totalité des protéines c-Ets-1 aviaire, murine ou humaine. Cette phosphorylation est dépendante de l'entrée d'ions Ca<sup>2+</sup> dans la cellule, puisqu'il peut être inhibé en présence d'ions cobalt ou en présence

d'EGTA qui chélate le  $\text{Ca}^{2+}$ . L'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , par relargage des stocks de la cellule sous l'effet des inositols triphosphates n'est pas suffisante pour provoquer la phosphorylation des protéines c-Ets-1, qui requiert l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  extérieur. Physiologiquement, dans les cellules lymphoïdes,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  est augmentée après stimulation mitogénique, par la lectine Concanavaleine A, ou par l'interaction du récepteur des cellules T (TCR) avec l'antigène présent à la surface d'une cellule présentatrice de l'antigène. Cette interaction peut être mimée par des anticorps monoclonaux dirigés contre les composants T3 et Ti du TCR des lymphocytes auxiliaires et cytotoxiques, respectivement. L'incubation des cellules lymphoïdes avec ces composants résulte après 5 min en la phosphorylation des protéines c-Ets-1, de manière dépendante de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Pognonec et al., 1988, 1990) (Fig.19). Dans la lignée lymphoïde B, l'activation est provoquée par la fixation de l'antigène sur son récepteur immunoglobulinique membranaire; elle conduit à l'augmentation de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  médiée par les inositols triphosphates et enfin à la phosphorylation des protéines c-Ets-1 au bout de 2 mn (Fischer R.J. et al., 1991). Ce dernier phénomène extrêmement rapide est encore sous la dépendance de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , mais ici la libération des réserves de  $\text{Ca}^{2+}$  stockées dans l'appareil de Golgi est suffisante pour induire la phosphorylation des protéines c-Ets-1. L'activation de la protéine kinase C ou la fixation d'autres ligands connus pour activer certaines des fonctions biologiques des lymphocytes B, comme le Tumor Growth Factor- $\beta$ -1, l'interleukine 4, l'interféron  $\gamma$ , n'ont pas d'effet sur la phosphorylation des protéines c-Ets-1 dans les lymphocytes B.

Dans les cellules lymphoïdes, ces modifications post-traductionnelles des protéines c-Ets-1 sont transientes et font penser à des événements de régulation impliqués dans les étapes précoces de la stimulation lymphocytaire par l'antigène. Cependant, nous sommes toujours dans l'ignorance de leur fonction biologique. De même, les kinases responsables de la phosphorylation des protéines c-Ets-1 sont toujours inconnues. Des sites consensus, substrats putatifs de la protéine kinase C, de la caséine kinase II et des kinases dépendantes du calcium/calmoduline ont été identifiés dans la p54<sup>c-ets-1</sup>; mais on ignore toujours si ces sites sont fonctionnels *in vitro* et *in vivo* et si ces kinases et leur cible sont localisées dans les mêmes compartiments cellulaires. Les deux sites substrats potentiels des kinases dépendantes du calcium/calmoduline sont intéressants à plusieurs titres, parce que l'activité de ces dernières est dépendante de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , qu'elle peut être localisée dans le noyau des cellules, et que l'un de ces sites est situé dans le domaine de répression de la fixation à l'ADN (acides aminés 308-311 de la p54<sup>c-ets-1</sup>) (Pearson et al, 1985; discussion de R.J. Fisher et al., 1991). Ces observations sont intéressantes puisque les formes phosphorylées des protéines c-Ets-1 perdent leur affinité pour l'ADN *in vitro*; elles sont alors retrouvées dans le cytoplasme, alors que les formes non-phosphorylées ont plutôt une localisation nucléaire (Pognonec et al., 1989). En d'autres termes, la stimulation lymphocytaire conduirait donc à l'inactivation des protéines c-Ets-1 et à leur détachement des régions régulatrices des gènes cibles, comme par exemple les gènes codant les récepteurs des cellules T.

Observons maintenant le comportement de l'isoforme qui ne possède pas le domaine de répression de la fixation à l'ADN, codé par l'exon d (VII) et qui se fixe par conséquent beaucoup mieux au site EBS que ses congénères de pleine longueur. Cette protéine c-Ets-1Δd (p52<sup>c-ets-1</sup> chez la souris et p42<sup>c-ets-1</sup> chez l'homme) n'est que faiblement phosphorylée dans des cellules lymphoïdes quiescentes. Après stimulation mitogénique, son statut n'est pas modifié (Pognonec et al., 1990; Koizumi et al., 1990). La fixation à l'ADN et la localisation nucléaire de c-Ets-1Δd ne sont donc pas affectées par l'augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$  (Pognonec et al., 1990). 13 sérines sur les 38 que compte la p54<sup>c-ets-1</sup> sont retrouvées dans les séquences codées par l'exon d. Les observations précédentes font qu'elles correspondent très probablement aux acides aminés phosphorylés dans la p54<sup>c-ets-1</sup> mais absents dans la forme résultante de l'épissage alternatif de l'exon d. Ces résidus, localisés dans un domaine important pour la régulation de la fixation à l'ADN, seraient les cibles majeures des événements de phosphorylation provoqués par l'augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$  et qui conduisent aux changements conformationnels des protéines c-Ets-1. Cet arbre ne doit cependant pas cacher la forêt de notre ignorance en ce qui concerne les résidus effectivement phosphorylés, ceux qui le sont dans les cellules quiescentes, donc en dehors de l'exon d (VII), notre ignorance sur les kinases impliquées dans ces processus et sur la façon dont la phosphorylation inhibe la fixation à l'ADN.

En conclusion de cette partie, des changements de conformation induits par des interactions avec d'autres protéines ou par des phosphorylations régulent la fixation des protéines c-Ets-1 à l'ADN (Pognonec et al., 1989; Lim et al., 1992; Wasylyk et al., 1992). Une hypothèse intéressante serait que ces deux mécanismes soient interdépendants. On pourrait imaginer que le maintien de la protéine c-Ets-1 dans une forme active, capable de s'associer au site EBS soit dépendant de l'interaction avec un cofacteur. La phosphorylation du domaine de c-Ets-1 responsable de cette interaction dissocierait ce complexe et activerait le mécanisme intramoléculaire de répression de la fixation à l'ADN.

#### d) c-Ets-1 interagit-il avec d'autres protéines ?

Ce champ d'investigations n'a pas encore été défriché. Cependant il existe certaines évidences impliquant les protéines ETS dans des interactions avec d'autres facteurs. La p68<sup>c-ets-1</sup> est capable de coopérer avec le complexe AP-1 (Fos-Jun) sur l'*enhancer* du virus du polyome qui possède un site EBS (PEA3) adjacent à un site AP1 (Wasylyk et al., 1990). Des résultats non publiés de Wasylyk et coll. (1990) suggèrent que l'intégrité des sites AP-1 et EBS est requise pour observer un effet coopératif entre le complexe AP-1 et la p68<sup>c-ets-1</sup>. Cette coopération pourrait donc être attribuée à une amélioration de la fixation à l'ADN de ces facteurs lorsque l'autre partenaire est déjà fixé. Néanmoins, l'expression de la p68<sup>c-ets-1</sup> abaisse le niveau basal de transactivation à partir de l'*enhancer* du polyome lorsque le site EBS est muté mais seulement si le site AP1 est intact. Ceci

suggère un mécanisme de *sqelching* impliquant soit des interactions directes entre la p68<sup>c-ets-1</sup> et les protéines Fos et Jun, soit entre la p68<sup>c-ets-1</sup> et un cofacteur des protéines Fos/Jun. En dépit de recherches intensives, une interaction directe entre la p68<sup>c-ets-1</sup> et les composants du complexe AP1 n'a pas pu être démontrée (Wasylyk et Wasylyk, 1992). Dans le même ordre d'idées, nous avons vu que l'expression de la p68<sup>c-ets-1</sup>, celle de c-Ets-2 ou celle de v-Jun (selon des expériences non publiées) sont capables d'inhiber par compétition la transactivation médiée par les protéines de fusion p68<sup>c-ets-1</sup>Lex-A; ce qui semble montrer que ces facteurs de transcription interagissent avec le même coactivateur de la transcription dont la quantité est ainsi titrée (Schneikert et al., 1992).

Les autres indices soutenant l'hypothèse de l'interaction des protéines c-Ets-1 avec des cofacteurs sont beaucoup plus indirects et proviennent de l'étude du comportement d'autres membres de la famille ETS. Citons 3 exemples parmi les mieux connus: celui du facteur p62<sup>TCF</sup>, du GABP $\alpha$  et de PU-1. p62<sup>TCF</sup> forme un complexe ternaire avec le SRF (*Serum Response Factor*) et la séquence cible de ce dernier, le SRE (*Serum Response Element*). p62<sup>TCF</sup> ne se fixe pas de manière autonome à l'ADN, mais il est indispensable à la fixation du SRF sur le SRE. Récemment, on a pu montrer que Elk-1, l'un des premiers membres découverts de la famille ETS, était fonctionnellement équivalent au p62<sup>TCF</sup> (Hipskind et al., 1991). Un autre membre, SAP-1 est aussi capable de former un complexe ternaire avec le SRF sur le SRE du promoteur de *c-fos* et comme Elk-1 sa fixation à l'ADN dépend de son interaction avec le SRF (Dalton et Treisman, 1992).

Dans les deux exemples suivants, ce sont les protéines de la famille ETS qui vont permettre la fixation à l'ADN d'un second facteur. GABP $\alpha$  (*GA binding protein*), un membre de la famille ETS, s'associe avec GABP $\beta$ . L'ensemble forme un complexe qui se fixe à la séquence (CGGAAA/G)<sub>3</sub> identifiée dans le promoteur des gènes précoces du virus de l'herpes (LaMarco et al., 1991; Thompson et al., 1991). Cette association requiert le domaine ETS et une région carboxy-terminale à ce domaine pour GABP $\alpha$ , et 4 motifs de 33 acides aminés de GABP $\beta$ . Ces motifs sont appelés *ankyrin repeats* et sont impliqués dans de nombreuses interactions protéines-protéines. GABP $\alpha$ , au contraire de GABP $\beta$ , fixe seul l'ADN, mais uniquement en conditions de basse force ionique. L'hétérodimère GABP $\alpha$ /GABP $\beta$  s'associe à l'ADN de manière beaucoup plus stable. Cette stabilité est encore renforcée par l'association de 2 sous-unités GABP $\beta$ , qui conduit à la formation d'un tétramère (GABP $\alpha$ )<sub>2</sub>/(GABP $\beta$ )<sub>2</sub>.

PU-1, le membre le plus éloigné phylogénétiquement de c-Ets-1, s'associe sur l'*enhancer* des chaînes légères des immunoglobulines  $\kappa$  avec le facteur de transcription NF-EM5 trouvé dans les lymphocytes B (Pongubala et al., 1992). La fixation de NF-EM5 sur ces séquences dépend de leur association préalable avec PU-1. Le domaine de PU-1 impliqué dans l'association avec NF-EM5 recouvre la séquence PEST, riche en proline (P), acide glutamique (E), sérine (S) et thréonine (T), qui pourrait être impliquée dans la dégradation des protéines (Rogers et al., 1986).



### e) Régulation du transport du cytoplasme vers le noyau.

Les protéines p54<sup>c-ets-1</sup> et p68<sup>c-ets-1</sup> sont localisées principalement dans le noyau, du moins lorsqu'elles sont produites dans des cellules COS à partir d'un vecteur d'expression (Boulukos et al., 1989; Pognonec et al., 1989; Leprince et al., 1990). Le domaine des protéines c-Ets-1 nécessaire au transport nucléaire a été défini. Il comprend une petite région riche en acides aminés basiques GKRKNKPK (Glycine 376 pour la p54<sup>c-ets-1</sup>) similaire aux séquences d'envoi dans le noyau de l'antigène T de SV40 ou de l'oncoprotéine c-Myc. L'analyse informatique de cette séquence révèle qu'elle fait partie d'une boucle qui s'étend à la surface de la protéine, supportant l'évidence que ce signal interagisse avec un facteur responsable du transport actif de la protéine vers le noyau comme cela a été proposé pour T de SV40 (Adam et Gerace, 1991). Des mutants délétés de cette séquence sont détectés par immunocytochimie pour une large part dans le cytoplasme, mais un marquage subsiste encore dans le noyau (Boulukos et al., 1989). Une distribution cytosolique totale est observée si les 77 acides aminés carboxy-terminaux de la p54<sup>c-ets-1</sup> sont délétés, ce qui indique que l'intégrité des séquences en amont de l'acide aminé 386 est requise pour induire une localisation nucléaire complète de la p54<sup>c-ets-1</sup>.

Dans la première phrase de ce chapitre, j'ai écrit que les protéines c-Ets-1 étaient localisées **principalement** dans le noyau. Plusieurs auteurs ont même trouvé qu'elles fractionnaient de manière préférentielle dans le cytoplasme (Ghysdael et al., 1986a; Fujiwara et al., 1988; Koizumi et al., 1990). Dans les conditions de fractionnement "plus douces" employées par Pognonec et coll. (1989), la p54<sup>c-ets-1</sup> aviaire et la p62<sup>c-ets-1</sup> murine sont détectées en majorité dans la fraction nucléaire des thymocytes. Il semble donc que les protéines c-Ets-1 soient effectivement nucléaires, mais faiblement associées à la chromatine, ce qui expliquerait qu'elles puissent facilement fuir dans le cytoplasme au cours de la procédure de fractionnement cellulaire. Alternativement, nous avons vu que leur localisation à l'intérieur d'une même cellule peut varier en fonction des modifications post-traductionnelles et donc des conditions environnementales (Pognonec et al., 1989). Ainsi, les formes phosphorylées perdent leur affinité pour la chromatine, et sont retrouvées pratiquement de manière exclusive dans le cytoplasme. Il est tentant de penser que la phosphorylation provoque une redistribution des protéines c-Ets-1 modifiées dans la fraction cytosolique; cependant on ne peut exclure que cet effet soit dû à une perte des espèces phosphorylées au cours de la préparation des noyaux. En dépit de ces observations, peu d'éléments soutiennent l'hypothèse que l'activité des protéines c-Ets-1 soit régulée par des navettes entre les compartiments cytoplasmique et nucléaire. Il semble que la phosphorylation et l'interaction avec d'autres protéines, impliquées possiblement dans la modulation de la transactivation et de la fixation à l'ADN soient les points majeurs de contrôle de l'activité des protéines c-Ets-1.

## f) Régulation de la dégradation des protéines c-Ets-1.

Comme pour de nombreux facteurs de transcription la demi-vie des protéines c-Ets-1 est courte de 60 à 90mn (Pognonec et al., 1988; Koizumi et al., 1990). Les mécanismes qui conduisent à sa dégradation sont encore obscurs. Comme dans la protéine c-Myb, une séquence PEST, riche en proline (P), acide glutamique (E), sérine (S) et thréonine (T) est présente dans les protéines c-Ets-1. Elle est localisée entre le domaine transactivateur et le domaine de fixation à l'ADN. Si le rôle de ces séquences dans la protéolyse est démontré et si la coupure a lieu à cet endroit, elle générerait deux fragments contenant chacun de ces deux domaines qui pourraient alors interférer comme des mutants négatifs dominants avec la fonction des protéines c-Ets-1 non dégradées.

## **5 - c-ets-1 et la transformation cellulaire.**

### a) Ets est-il oncogène ?

Il semble bien que l'on puisse répondre par l'affirmative à cette question car selon le test consacré, la p54<sup>c-ets-1</sup> transforme les fibroblastes de souris NIH3T3 (Seth et Papas, 1990). Les lignées cellulaires dérivées des foyers de cellules transformées sont capables de pousser sans ancrage et sont tumorigènes chez la souris nue. Le pouvoir transformant de c-ets-1 est faible et ne se révèle qu'en basse concentration (0,05%) de sérum et après sélection des cellules qui expriment l'oncogène. La capacité à induire des foyers sur NIH3T3 est 50 fois plus importante si les cellules sont transfectées par ME26, le virus murin qui exprime la P135 $\Delta$ gag-myb-ets, même si cette protéine est amputée du produit de gag et des 100 premiers acides aminés de v-myb (Yuan et al., 1989). Toutefois, les cellules infectées par ME26 n'induisent pas des tumeurs chez la souris athymique, ce qui suggère que les cellules transformées par c-ets-1 ont subi après sélection des changements supplémentaires qui ont accru leur pouvoir oncogénique.

Peu de données sont actuellement disponibles sur les différences de propriétés biologiques entre v-ets et c-ets-1 et on attend avec impatience l'effet de mutants de E26 dans lesquels v-ets a été remplacé par son homologue cellulaire sur des cultures de cellules hématopoïétiques. Les premiers résultats montrent que toutes les modifications trouvées entre v-Ets et c-Ets-1 contribuent au spectre oncogénique de E26. En particulier la fusion de v-Myb à v-Ets et la mutation en valine de l'isoleucine 445 (Fig.16) dans le domaine ETS de la p68<sup>c-ets-1</sup> sont absolument requises pour la transformation de cellules érythroïdes immatures et l'induction de leucémies (Metz et Graf, 1991b; D. Leprince, communication personnelle). D'après des données non publiées, Lim et coll. (1992) indiquent qu'un virus exprimant la p68<sup>c-ets-1</sup> transforme des cellules érythroïdes avec une efficacité réduite par rapport au virus exprimant une p68<sup>v-ets</sup> construit par Metz et Graf. (1991a). Les

relations entre ces différences d'activité biologique et les modifications moléculaires existant entre *v-ets* et *c-ets-1*, ont été investiguées par Leprince et coll. (1992). Nous avons vu que les résultats de ces auteurs sont interprétables dans le contexte d'une protéine *c-Ets-1* tronquée, de 35kD. Cette *p35<sup>c-ets-1</sup>* est toutefois capable de se fixer à la séquence PEA3 et elle est très proche de la protéine utilisée par Nye et coll. (1992) pour étudier la fixation à l'ADN. Il est donc extrêmement troublant de constater que, lorsque l'on introduit dans la *p35<sup>c-ets-1</sup>* toutes les mutations de *v-ets*, on abolisse la fixation à la séquence PEA3 (Leprince et al., 1992). L'effet inhibiteur le plus impressionnant est obtenu lorsque l'on remplace l'extrémité carboxy-terminale de *c-Ets-1* par celle de *v-Ets*. Dans l'ordre décroissant, on trouve ensuite la mutation de l'isoleucine 445 dans le domaine de fixation à l'ADN de *c-Ets-1* en une valine, et enfin la mutation de l'alanine 285 en valine qui n'a plus qu'un effet modeste sur la fixation à PEA3. Le résultat final obtenu par les techniques de retard sur gel et de *south western*, est que la *p35<sup>v-ets</sup>* ne se fixe plus du tout sur la séquence PEA3, bien qu'elle possède un domaine de fixation à l'ADN complet. Ces résultats ont été confirmés récemment avec une protéine *p68<sup>c-ets-1</sup>* produite en lysat de réticulocytes (Wasylyk et Wasylyk, 1992). Il semble de plus que la fusion de *v-Ets* à *v-Myb* ne restaure pas la capacité de *v-Ets* à fixer au site EBS. Il se pourrait donc que *v-Ets* reconnaisse une séquence légèrement différente. La détermination de la séquence qui s'associe préférentiellement à *v-Ets* permettra de tester cette hypothèse et peut-être de proposer un modèle pour l'activation oncogénique de *c-Ets-1*.

#### b) *c-ets-1* et tumeurs humaines.

Le locus *c-ets-1* a été impliqué dans des translocations du chromosome 11 vers les chromosomes 1, 4, 9, détectées chez des patients atteints de leucémies myéloïdes (Watson et al., 1990, pour revue). Cependant, les sondes utilisées (*v-ets* en général) en Southern blot n'ont pas permis de localiser le point de cassure du chromosome dans le locus *c-ets-1*. Toutefois, l'existence de réarrangements de ce locus dans des zones régulatrices ou dans des zones codantes non couvertes par ces sondes ne peut pas être totalement éliminée. Une seule étude a montré de manière formelle un réarrangement du locus *c-ets-1* dans un cas de leucémie myélomonocytaire aiguë et dans un cas de lymphome (Rovigatti et al., 1986). Par Southern blot, un fragment supplémentaire d'ADN génomique hybride avec une sonde *v-ets* par rapport à des témoins sains. L'analyse densitométrique de ce blot a révélé que *c-ets-1* était également amplifié chez ces patients. Le rôle de *c-ets-1* dans la genèse ou dans la maintenance de ces leucémies est encore à démontrer. Une translocation de *c-ets-1* était également suspectée dans le sarcome d'Ewing et dans d'autres types de tumeurs neuroectodermiques. Ces translocations  $t(11;12)(q24;q12)$  n'affectent pas *c-ets-1*, mais un gène de la même famille, *fli-1*, dont le domaine de fixation à l'ADN est exprimé dans une protéine de fusion avec le produit du gène sur le chromosome 22 qui aurait pour fonction normale de s'associer à l'ARN (Delattre et al., 1992). *fli-1* et *PU-1* (appelé aussi *spi-1*), un autre membre

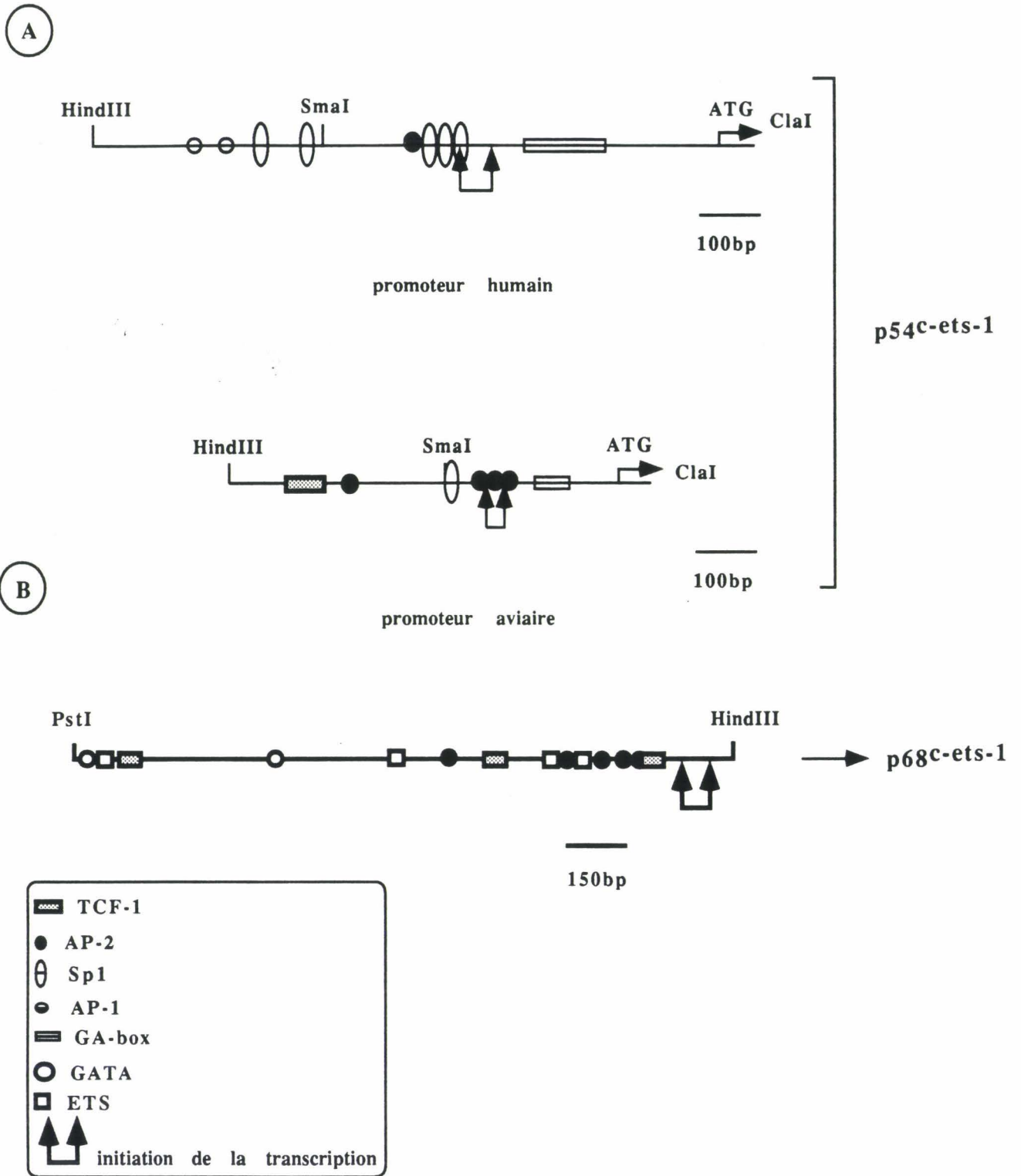
de la famille ETS, sont aussi directement impliqués dans les leucémies érythroïdes induites par le virus de Friend. L'intégration du virus à proximité des gènes *fli-1* et *PU-1* et leur activation sont en effet fréquemment observés dans ce type de leucémies (Ben-David et Bernstein, 1991, pour revue)

Plus récemment, *c-ets-1* a été impliqué de manière indirecte dans la tumorigenèse chez l'homme. Dans différents carcinomes invasifs, du sein et du poumon notamment, les transcrits *c-ets-1* ne sont pas détectés dans les cellules tumorales. Par contre, *c-ets-1* s'exprime dans l'endothélium des vaisseaux sanguins en formation et dans les fibroblastes qui constituent le stroma de la tumeur (Wernert et al., 1992). La formation de nouveaux vaisseaux sanguins va conditionner le développement de la tumeur en lui donnant accès aux éléments nutritifs et aux échanges gazeux. Les nouveaux vaisseaux vont fournir aux cellules tumorales une voie pour s'échapper de la tumeur primaire et aller former des métastases. Le rôle de *c-ets-1* au cours de la formation du stroma n'a pas encore été démontré. Cependant il est troublant de constater que dans ces conditions pathologiques comme au cours de l'organogenèse embryonnaire l'expression de *c-ets-1* est détectée dans des processus impliquant une réorganisation des tissus et donc un remodelage de la matrice extracellulaire. Le fait que *c-ets-1* code un facteur de transcription capable de se fixer spécifiquement sur une séquence de l'ADN, et que certaines de ces séquences participent à la régulation de l'expression d'enzymes, comme la stromélysine 1, la collagénase 1, l'activateur du plasminogène du type urokinase, impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire, suggère que *c-ets-1* puisse jouer un rôle dans la formation du stroma tumoral.

## 6 - Régulation de l'expression de *c-ets-1*.

La régulation de l'expression de *c-ets-1* a été essentiellement étudiée au niveau de l'initiation de la transcription. Les séquences promotrices en amont de l'exon I<sup>54</sup> dans le locus *c-ets-1* humain et aviaire ont été clonées et commencent à être caractérisées du point de vue fonctionnel (Jorcyk et al., 1991; Oka et al., 1991; Majerus et al., 1992; Chen, sous-presse; Crépieux et al., en préparation) (Fig.18). Le promoteur est riche en GC et ne possède pas de boîte TATA. Ces différents auteurs s'accordent pour trouver plusieurs sites d'initiation de la transcription, ce qui n'est pas étonnant avec ce type de promoteur. Dans le détail, la position et la fréquence d'utilisation de ces sites varient, sans doute parce que ces travaux ont été réalisés dans des lignées cellulaires différentes. L'activité maximale du promoteur est observée pour un fragment de 900pb en amont du codon d'initiation de la p51<sup>*c-ets-1*</sup> qui contient des sites putatifs de fixation pour les facteurs de transcription Sp1, AP2, AP1 et Ets... On dispose d'essais fonctionnels pour un certain nombre d'entre eux.

La protéine AP2 purifiée se fixe spécifiquement sur un fragment de 34pb du promoteur de *c-ets-1* humain qui contient un site de fixation pour ce facteur. En cotransfection, AP2 est capable



**Figure 18 :**

**A:** Représentation schématique des promoteurs humain et aviaire qui dirigent la transcription des ARNm codant la p54<sup>c-ets-1</sup>. Les séquences consensus de fixation de facteurs de transcription sont figurées comme le précise la légende.

**B:** Représentation schématique du promoteur aviaire qui dirige la transcription des ARNm codant la p68<sup>c-ets-1</sup>. (cadeau généreux de P. Crépieux et coll., en préparation.)

de transactiver le promoteur de *c-ets-1* (Oka et al., 1991). La fonction de ce site pourrait être établie si sa mutation provoque une perte de l'inductibilité par AP2 du promoteur de *c-ets-1*. L'expression de AP2 a été étudiée par hybridation *in situ* chez la souris, celle de *c-ets-1* chez le poulet (Vandenbunder et al., 1989; Mitchell et al., 1992; Quéva et al., soumis). Les transcrits AP2 et *c-ets-1* sont détectés dans les cellules de crêtes neurales et dans certaines populations de cellules mésenchymateuses (mésenchyme de la face, du mésonéphros, du bourgeon de membre). Dans ces situations, AP2 serait un bon candidat pour induire l'expression de *c-ets-1*. Toutefois, dans de nombreux endroits, aucune corrélation n'est observée entre l'expression de ces deux gènes.

L'expression de *c-ets-1* est également faiblement induite (2 à 3 fois), par le sérum, par le produit de *c-jun* et de *c-ets-1* lui-même en test de cotransfection (Oka et al., 1991; Majerus et al., 1992). La réponse au sérum est lente et atteint son maximum seulement 8 heures après stimulation (Majerus et al., 1992). La présence de 2 ou 3 sites AP1, nombre variable selon la liberté prise avec la séquence consensus, a été rapportée dans le promoteur de *c-ets-1* humain et aviaire, ce qui pourrait expliquer la transactivation par c-Jun (Oka et al., 1991; Majerus et al., 1992; Crépieux et al., en préparation). Les sites AP1 sont protégés de l'attaque de la DNase 1 en présence d'extraits nucléaires de cellules épithéliales murines (Majerus et al., 1992). Il est permis de s'interroger sur la signification de ces empreintes puisqu'il est montré que *c-ets-1* ne s'exprime pas dans les épithéliums (Vandenbunder et al., 1989; Quéva et al., soumis). D'autre part, les familles de gènes apparentés à *c-jun* et à *c-fos* sont larges, et les cellules où s'expriment *c-ets-1* peuvent évidemment contenir d'autres facteurs capables de reconnaître la séquence AP1. Ces sites AP1 sont acoquinés avec des motifs PEA3 relativement approximatifs présentant un nucléotide de différence avec la séquence canonique. Malgré cela, un fragment de 40pb, protégé de la DNase et contenant 4 sites approximatifs, 2 AP1 et 2 PEA3 est transactivable par c-Jun et par c-Ets-1 (Majerus et al., 1992). Le seul site PEA3 noté dans cette publication et qui soit protégé par des extraits nucléaires de cellules épithéliales est vraiment très approximatif puisqu'il ne contient pas le noyau GGAA/T mais qu'il a pour séquence ACAGGACGT. On peut à nouveau s'inquiéter de la pertinence de ces résultats, à moins d'imaginer que la protéine c-Ets-1 apportée en grande quantité par le vecteur d'expression se combine à des facteurs répresseurs et transactive donc de manière indirecte. L'autorégulation de c-Ets-1 sur sa propre expression pourrait être médiée par d'autres sites EBS dans le promoteur et mise en évidence par délétion de ces sites putatifs et cotransfection avec un vecteur d'expression de p54<sup>c-ets-1</sup>. A cet égard, d'autres séquences de régulation positive de la transcription de *c-ets-1* viennent d'être caractérisées dans un fragment de 600pb en 5' du promoteur de 900pb utilisé précédemment (Chen, sous presse). Ces séquences contiennent des sites putatifs de reconnaissance pour les facteurs de transcription c-Ets-1 et Oct.

Si on ajoute ce fragment 5' de 600pb en entier au promoteur de 900pb, on observe plutôt une diminution de l'activité basale de ce promoteur plus long dans des lignées de cellules T et B (Jorcyk et al., 1991; Oka et al., 1992). Ceci suggère l'existence d'éléments répresseurs dans ce

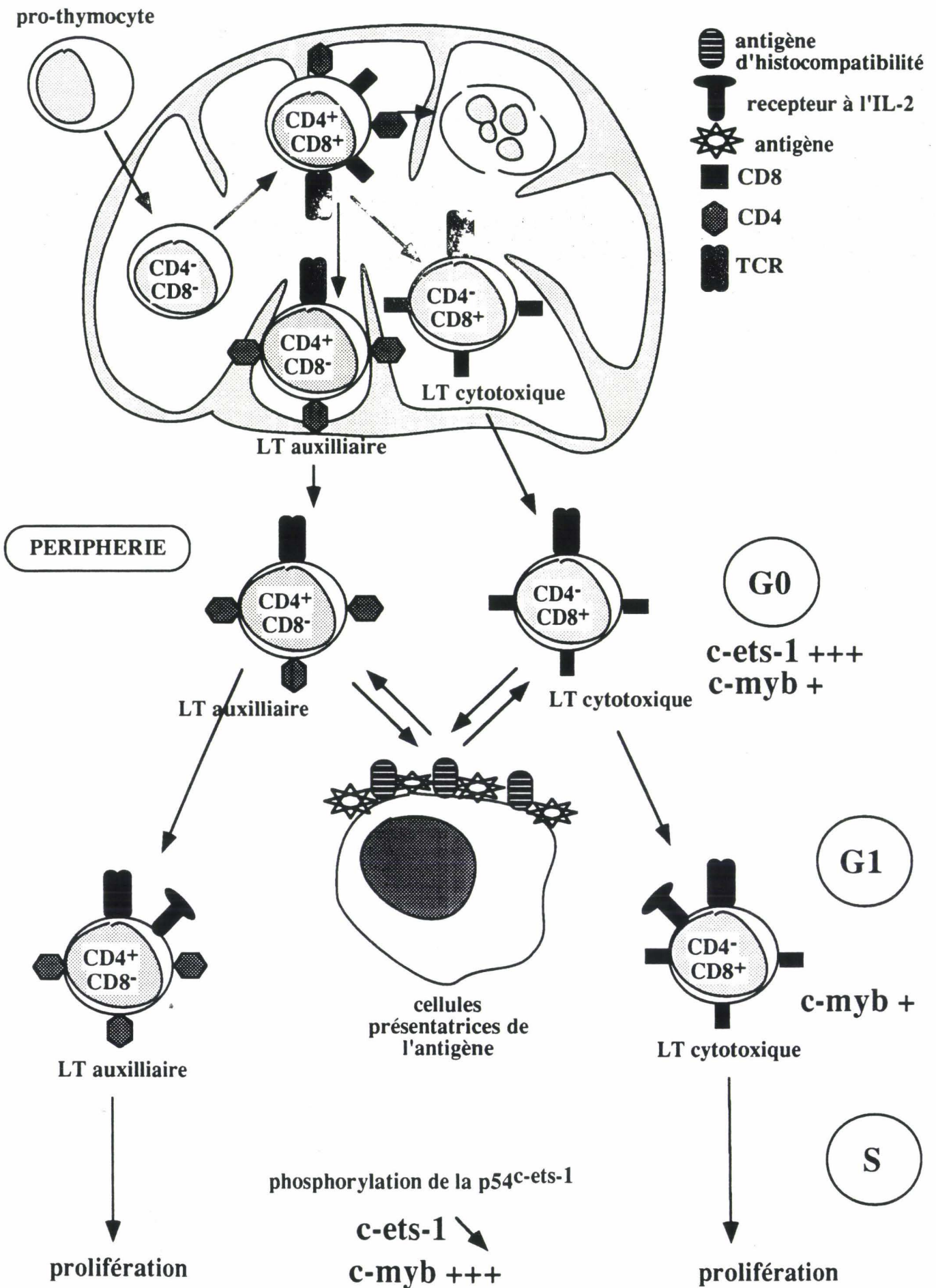
fragment de 600pb. G.H. Chen (sous presse) a localisé par délétions deux de ces sites, appelés NRE1 de 230pb et NRE2 de 320pb. Ces NRE sont capables de fonctionner, ie de médier une transrépression, dans un promoteur hétérologue. Des extraits nucléaires de cellules lymphoïdes T (HPB), B (Daudi) et érythromyéloïdes (K562) forment un complexe majeur et plusieurs complexes mineurs avec NRE-1 et NRE-2. Aucun complexe n'est détecté avec la lignée promyélocytaire HL60, où les transcrits *c-ets-1* ne sont pas détectés. De manière étonnante, les facteurs capables de s'associer avec les NRE sont présents uniquement dans les cellules où le promoteur de *c-ets-1* humain est actif (Oka et al., 1991; Chen, sous presse). D'autres mécanismes de répression doivent donc être envisagés pour expliquer pourquoi l'élément promoteur de 1,5kpb en amont du codon d'initiation de la *p51<sup>c-ets-1</sup>* est inactif dans les HL60, mais aussi pourquoi il est actif dans les K562 alors que cette lignée *c-ets-1* n'est pas exprimé.

Chez le poulet deux régions promotrices ont été caractérisées (Crépieux et al., en préparation) (Fig.18). L'une se trouve en amont de l'exon I<sup>54</sup> et initie la synthèse des ARNm codant la *p54<sup>c-ets-1</sup>*. Ce promoteur est très homologue au promoteur caractérisé chez l'homme. Le deuxième promoteur est localisé en 5' de Y, un exon non codant en amont de  $\alpha$  et  $\beta$ ; il génère la synthèse des messagers codant la *p68<sup>c-ets-1</sup>* après l'élimination de l'exon I<sup>54</sup>. Ce promoteur fonctionne dans des fibroblastes embryonnaires de poulet. Il comporte des sites de fixation pour les facteurs de transcription AP2, *c-Ets-1* et GATA. De plus, des sites de haute affinité pour TCF-1, un membre de la famille des protéines à boîte HMG (High Mobility Group) et pour Elf-1, un membre de la famille Ets ont été décrits dans ce promoteur (Van de Wetering et al., 1991; Thompson et al., 1992). La présence de ces sites de reconnaissance pour des facteurs de transcription exprimés dans des lymphocytes T est intéressante parce qu'elle pourrait expliquer la répression de l'expression de la *p68<sup>c-ets-1</sup>* dans la lignée lymphoïde T (Leprince et al., 1988, 1990; Quéva et al., soumis).

## 7 - Expression de *c-ets-1*.

Des sondes correspondant à *v-ets* hybrident dans les tissus normaux chez le poulet avec trois espèces d'ARNm à 7,5; 2,0 et 1,5 kb transcrits à partir du locus *c-ets-1* (Leprince et al., 1983a). Les transcrits *c-ets-1* et la *p54<sup>c-ets-1</sup>* sont détectés préférentiellement dans les lignées et les organes lymphoïdes comme la rate, le thymus et la bourse de Fabricius chez le poulet (Chen 1985; Ghysdael et al., 1986a; Pognonec, 1988; Vandebunder et al., 1989; Quéva et al., soumis). Des résultats identiques ont été rapportés chez la souris et l'homme (Bhat et al., 1987, 1989). Dans le thymus de la souris, l'expression de *c-ets-1* augmente au cours de l'ontogenèse pour se stabiliser après la naissance (Pognonec, 1988; Bhat et al., 1987, 1989). La différenciation des thymocytes est un phénomène qui a été relativement bien décrit, grâce à deux marqueurs, CD4 et CD8 (Couture et Potworowski, 1992) (Fig.19). La zone corticale du thymus est peuplée de cellules immatures

**Figure 19** : schéma de la différenciation de la lignée lymphoïde T et expression de *c-ets-1* et de *c-myb* dans cette lignée





doublement négatives (CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup>) pour ces deux antigènes. Leur maturation se fait au cours de leur progression du cortex vers la médulla, où elles deviennent d'abord doublement positives (CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>). Les thymocytes autoréactifs sont alors éliminés. Les survivants dont le récepteur (TCR) est susceptible de reconnaître un antigène présenté par le complexe majeur d'histocompatibilité sont sélectionnés et se différencient en lymphocytes "simple négatifs", auxiliaires CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup> ou cytotoxiques CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>+</sup>. Il était très intéressant de décrire l'expression de *c-ets-1* au cours de ce processus; ceci étant relativement aisé puisque ces 4 populations cellulaires coexistent dans le thymus de souris adultes. Les 2 études qui ont été réalisées sur ce sujet ont, hélas, abouti à des résultats contradictoires. La première utilise l'affinité différentielle des thymocytes matures ou immatures pour certains substrats, puis leur lyse par le complément pour les fractionner (Bhat et al., 1989) La pureté des populations, supérieure à 90%, est contrôlée par cytofluorimétrie de flux. Ces auteurs observent en dépit de l'opacité de leurs films une plus forte accumulation des transcrits et des protéines *c-Ets-1* dans les lymphocytes (CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup>) auxiliaires. L'autre étude utilise une technique de tri automatique des thymocytes marqués par les anticorps anti CD4 et CD8 (Pognonec, 1988). Grâce à cette technique, une pureté supérieure à 95% est obtenue plus rapidement que précédemment, et les cellules ont sans doute moins le temps de changer de métabolisme. Les thymocytes ainsi fractionnés sont marqués métaboliquement et les protéines *c-Ets-1* sont immunoprécipitées. La p63<sup>*c-ets-1*</sup> murine est détectée à un niveau égal dans les 4 populations lymphocytaires. En dépit des messages contradictoires, ces deux études montrent que *c-ets-1* est exprimé à un niveau élevé dans les thymocytes quelque soient les marqueurs qu'ils expriment. Il semble donc improbable que *c-ets-1* joue un rôle spécifique dans la détermination de la voie de différenciation fonctionnelle des thymocytes. *c-ets-1* n'est pas non plus liée à la prolifération cellulaire puisque les thymocytes corticaux, double négatifs ou double positifs, plus proliférant n'expriment pas plus *c-ets-1* que les thymocytes médullaires différenciés.

L'expression de *c-ets-1* est toutefois moins intense dans les lymphocytes périphériques, qui peuplent de nombreux organes comme les ganglions lymphatiques ou qui circulent dans le sang. Ces lymphocytes sont dans un état quiescent, en phase G<sub>0</sub> du cycle cellulaire. L'interaction du complexe CD3-récepteur des cellules T avec l'antigène conduit au terme d'un processus qui dure 7 à 10 jours, à la division cellulaire et à l'activation des fonctions immunologiques. L'expression de nombreux gènes tels *c-myc*, *c-fos*, *elf-1* est induite dans les minutes (Crabtree et al., 1989). Il était très intéressant de déterminer le comportement de *c-ets-1* fortement exprimé dans les cellules lymphoïdes. Une heure après la stimulation mitogénique des lymphocytes circulants par un anticorps anti CD3, qui mime l'interaction TCR-antigène ou par un mélange de PMA et d'ionophores de calcium, une baisse drastique de l'expression de *c-ets-1* est observée (Bhat et al., 1990). Ces résultats, ainsi que l'inhibition de la fixation à l'ADN de *c-Ets-1* par phosphorylation après l'afflux de Ca<sup>2+</sup> en réponse à l'interaction TCR-antigène, suggèrent que l'expression et l'activité de *c-Ets-1* doivent être réprimées lors de l'activation lymphocytaire. *c-Ets-1* est donc

plutôt associé à l'état quiescent des lymphocytes T circulants, dans la phase G<sub>0</sub> du cycle cellulaire. Ces résultats, bien que convaincants, demandent à être complétés et confirmés, en particulier à cause de quelques études discordantes. La première décrit par northern blot une induction de *c-ets-1*, après 90mn de stimulation d'une lignée de cellules T cytotoxiques (Kaufmann et al., 1987). Il est possible que cette lignée ne réponde pas comme des cellules normales à l'activation antigénique; d'autre part, les lymphocytes circulants ne représentent pas une population homogène sensée répondre d'une manière uniforme. Deux autres études reportent une accumulation de transcrits *c-ets* (la sonde ne fait pas la différence entre *c-ets-1* et *c-ets-2*) (Reed et al., 1986) et de *p55<sup>c-ets-1</sup>* (Pognonec, 1988) 3 jours après la stimulation de lymphocytes circulants par la lectine PHA et l'interleukine 2. Ces composants pourraient avoir un effet différent sur l'expression de *c-ets-1* par rapport à l'anticorps anti CD3 utilisé par Bhat et coll. (1990), quoiqu'ils activent en théorie la même cascade de second messagers, impliquant la protéine kinase C et l'augmentation de la concentration intracellulaire de Ca<sup>2+</sup>. Alternativement, des évènements tardifs dans le processus d'activation de la fonction immunologique des lymphocytes T nécessiteraient une réexpression de *c-ets-1*.

Dans les cellules B, l'expression de *c-ets-1* n'a été investiguée que dans des lignées cellulaires représentant différents stades de la maturation des lymphocytes B (Pognonec, 1988). L'accumulation des transcrits *c-ets-1* et de la *p55<sup>c-ets-1</sup>* est d'autant plus importante que ce stade est avancé.

L'expression de *c-ets-1* a été également documentée dans des cellules d'origine neuroectodermiques, en particulier dans des astrocytomes et dans des astrocytes normaux sur des coupes de cerveau humain (Amouyel et al., 1988). Les transcrits *c-ets-1* ont été également détectés par hybridation *in situ* avec des sondes froides dans des cellules issues du sarcome d'Ewing et de tumeurs humaines du système nerveux périphérique, neuroblastome et neuro-épithéliome (Sacchi et al., 1991). Ces tumeurs ont une origine embryonnaire commune, puisqu'elles sont issues des cellules de la crête neurale. Dans l'embryon de poulet, *c-ets-1* est transcrit dans les cellules de crêtes neurales céphaliques et troncales en migration (Vandenbunder et al., 1989; Quéva et al., soumis). L'aspect le plus intéressant, apporté par la description *in situ* au cours de l'embryogenèse, a été la détection des transcrits *c-ets-1* dans les cellules endothéliales qui forment la paroi interne des vaisseaux sanguins. La sonde spécifique de *c-ets-1* induit la formation un liseret de grains d'argents, qui révèle la présence des transcrits recherchés, sur les cellules endothéliales des capillaires à la périphérie du tube neural et des sinusoides du foie et des reins. L'expression de *c-ets-1* est particulièrement remarquable dans les cellules endothéliales au cours de l'édification de l'arbre vasculaire. Aucun signal n'a été obtenu sur des gros vaisseaux ou même dans des capillaires lorsque la vascularisation est terminée. L'expression transiente de *c-ets-1* au début de la formation des vaisseaux a été confirmée dans l'embryogenèse humaine ainsi que dans des situations pathologiques, telles la cicatrisation des plaies et la vascularisation des tumeurs (Wernert et al., 1992).

Cette première description de l'expression de *c-ets-1* avait permis d'entrevoir d'autres terrains d'investigation. Un signal significatif en hybridation *in situ* était obtenu dans une grande variété de tissus d'origine mésodermique (Vandenbunder et al., 1989). Le derme, dont la morphogenèse a été bien décrite au cours de l'édification des plumes, a été plus particulièrement étudié par X.Desbiens et coll. (1991). *c-ets-1* est détecté dans ce tissu alors qu'il n'est constitué que d'une fine couche de cellules lâchement disposées sous l'épiderme. Le premier événement dans le programme de développement est la condensation de ces cellules pour former une couche dermique plus épaisse. Ces cellules vont ensuite migrer le long d'une trame de fibres de collagène pour venir se déposer sous une placode de cellules épidermiques à l'endroit où la future plume va apparaître. Les transcrits *c-ets-1* sont présents dans les cellules dermiques tout au long de ces processus migratoires. Lorsque les cellules s'arrêtent sous les placodes et au cours de l'édification de la plume, aucun signal n'est plus observé avec la sonde *c-ets-1* dans le derme; seules les cellules endothéliales sous le derme et dans la pulpe plumaire sont positives.

L'ensemble des résultats sur l'embryon de poulet suggérait un double rôle pour *c-ets-1*, dans la différenciation des cellules lymphoïdes et dans la morphogenèse de tissus d'origine mésodermique et mésothéliale (issus des crêtes neurales). Ces études ont été réalisées avec une sonde *c-ets-1* qui hybride avec les transcrits codant la  $p54^{c-ets-1}$  et la  $p68^{c-ets-1}$ . Il était légitime de se demander à quels transcrits correspondait le signal observé dans l'ensemble de ces situations. Les premières descriptions suggéraient que les mécanismes d'initiation de la transcription et d'épissage alternatif générant les deux produits du locus *c-ets-1* chez le poulet étaient spécifiques de certaines lignées. La  $p54^{c-ets-1}$  avait été détectée par immunoprécipitation dans les organes lymphoïdes (Chen, 1985; Ghysdael et al., 1986a). La  $p68^{c-ets-1}$  a été uniquement détectée dans la rate de poussin adulte (Leprince et al., 1988). Par fractionnement de cet organe, D.Leprince et coll., (1990) avaient pu montrer que la  $p68^{c-ets-1}$  n'est pas exprimée ni dans les cellules lymphoïdes ni dans les autres cellules hématopoïétiques, mais plutôt dans la fraction stromale de la rate constituée de tissu conjonctif et des vaisseaux sanguins. Afin de préciser ces premiers résultats et de proposer des fonctions biologiques pour la  $p54^{c-ets-1}$  et la  $p68^{c-ets-1}$ , nous avons décrit l'expression de ces deux facteurs de transcription au cours du développement embryonnaire du poulet. Les résultats de cette étude feront l'objet d'une seconde publication.

## **B - Résultats - Publication 2.**

### **Expression des deux facteurs de transcription codés par le locus *c-ets-1* chez le poulet.**

Cette étude de l'expression des transcrits codant la p54<sup>c-ets-1</sup> et la p68<sup>c-ets-1</sup> a été focalisée sur deux points: les étapes précoces du développement, lors de la mise en place du mésoderme au cours de la gastrulation et l'érythropoïèse à cause des propriétés transformantes de E26. Nous avons également réinvestigué l'expression de *c-ets-1* dans les différents organes au moment de leur édification et de leur vascularisation. Les cellules lymphoïdes, où nous avons confirmé la présence de la p54<sup>c-ets-1</sup> et l'absence de la p68<sup>c-ets-1</sup>, nous ont accompagné tout au long de cette étude comme contrôle de la spécificité de nos sondes.

### **COMMENTAIRES SUR LES METHODES :**

Les sondes spécifiques des transcrits codant la p54<sup>c-ets-1</sup> sont synthétisées à partir d'un fragment EcoRI/ClaI de 140pb contenant l'exon I<sup>54</sup> et une partie de la région 5' non traduite (Duterque-Coquillaud et al., 1988). Le fragment EcoRI/PstI de 190pb de l'ADNc de la p68<sup>c-ets-1</sup>, correspondant aux exons  $\alpha$  et  $\beta$  a été utilisé pour synthétiser les sondes ARN antisens et sens spécifiques des transcrits p68<sup>c-ets-1</sup> (Leprince et al., 1988). Ces sondes sont courtes et donc peu sensibles, ce qui est gênant lorsque l'on cherche à détecter des ARNm peu abondants. Leur détection a nécessité la synthèse de sondes avec une forte radioactivité spécifique et trois mois d'autoradiographie. A cause de ces difficultés, la description de l'expression de *c-ets-1* lors des étapes précoces du développement et au cours de l'érythropoïèse a été réalisée grâce à des sondes plus longues synthétisées à partir du fragment BglII/HindIII de 750pb du provirus E26 (Leprince et al., 1983a). Ce fragment couvre les exons b, c1, c2, d et e et ne permet donc pas de discriminer entre les transcrits codant la p54<sup>c-ets-1</sup> et la p68<sup>c-ets-1</sup>. Nous avons mis au point une technique plus rapide et "plus quantitative" que l'hybridation *in situ* pour détecter ces transcrits, la Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR), qui consiste à rétrotranscrire l'ensemble des ARNs de l'échantillon puis à amplifier les ADNc obtenus grâce à des oligonucléotides spécifiques. Dans cette publication, nous démontrons pour la première fois l'existence des protéines p54<sup>c-ets-1</sup> et p68<sup>c-ets-1</sup> dans le derme et dans des cellules endothéliales par immunoprécipitation avec des séra spécifiques.

## **Publication 2.**

**Differential expression of the two transcription factors encoded by the c-ets-1 locus during the development of the chick embryo.**

Christophe Quéva\*, Dominique Leprince, Dominique Stéhelin and Bernard Vandebunder.

CNRS URA1160, Institut Pasteur - 1 rue Calmette - 59019 Lille (France)

Running title : c-ets-1 alternative splicing in chick embryos.

Keys words : c-ets-1 / alternative splicing / transcription factor / mesoderm / erythropoiesis.

\* Corresponding author

**SUMMARY :**

The chicken c-ets-1 proto-oncogene encodes two distinct transcription factors : p54<sup>c-ets-1</sup> and p68<sup>c-ets-1</sup> differing by structurally and functionally non-related N-termini.

We have investigated the spatial and temporal distribution of the transcripts encoding p54<sup>c-ets-1</sup> and p68<sup>c-ets-1</sup> throughout the development of the chick embryo. We show that the expression of c-ets-1 is specific to the mesodermal and mesothelial lineages. c-ets-1 transcription is induced at gastrulation in mesodermal cells migrating into the blastocoele. Later, p54<sup>c-ets-1</sup> and p68<sup>c-ets-1</sup> are expressed in endothelial cells, in cells undergoing the epithelio-mesenchymal transition and in mesenchymal cells interacting with epithelium. However, whereas p54<sup>c-ets-1</sup> transcripts are detected in most cells, p68<sup>c-ets-1</sup> transcripts are restricted to a subset of these cells, randomly distributed. During erythropoiesis, we show that both p68<sup>c-ets-1</sup> and p54<sup>c-ets-1</sup> are expressed in immature erythroid cells which arise in extraembryonic blood islands. In lymphoid cells, p54<sup>c-ets-1</sup> accumulates, whereas p68<sup>c-ets-1</sup> is not detectable, as previously described.

These results reveal new features of c-ets-1 expression during gastrulation and during epithelio-mesenchymal transition. Furthermore, p68<sup>c-ets-1</sup> and p54<sup>c-ets-1</sup> appears to have distinct, tissue specific roles during embryonic development. Finally, these results provide the first clue that p68<sup>c-ets-1</sup>, the cellular progenitor of the v-ets oncogene is expressed in erythroid cells.

## INTRODUCTION

Alternative RNA processing has been described as a normal developmental strategy to generate multiple proteins with distinct biological activities. Several recent reports have emphasized the significance of this mechanism in the modulation of the activity of transcription factors. An alternatively spliced **FosB** mRNA encodes a truncated  $\Delta$ **FosB** protein which lacks the activation domain but retains the dimerization and DNA binding activities. This protein acts as a dominant negative form of the full-length **FosB** protein and inhibits **Fos-Jun** transcriptional activity (Mumberg et al., 1991; Nakabeppu and Nathans, 1991). Similarly alternative splicing of the **c-erbA**  $\alpha$  gene transcripts generates distinct products with opposing regulatory activities. Both proteins recognize the same DNA sequence but only one protein also binds the thyroid hormone. Thus the alternate protein acts as an inhibitor of the T3-mediated transcriptional regulation (Izumo and Mahdavi, 1988 ; Koenig et al., 1989). Another important example of modification of transcription factor functions by splicing is the cAMP-responsive element modulator (CREM) which switches from antagonist to activator during spermatogenesis (Foulkes et al. , 1992)

We previously reported that an alternative splicing event occurs within the chicken **c-ets-1** locus (Leprince et al., 1988). The **c-ets-1** protooncogene has been identified as the cellular progenitor of the **y-ets** oncogene which is associated with **y-myb** in the genome of the E26 avian leukemia virus (Leprince et al, 1983 ; Nunn et al., 1983). The chicken **c-ets-1** locus encodes two proteins : p68<sup>c-ets-1</sup>, the cellular progenitor of the **y-ets** oncogene and the related p54<sup>c-ets-1</sup>. These two nuclear proteins are generated by the alternative addition of the  $\alpha$  and  $\beta$  (p68<sup>c-ets-1</sup> specific) or I<sup>54</sup> (p54<sup>c-ets-1</sup> specific) exons onto a set of common exons (a to F) (Fig. 1) (Leprince et al., 1988). The **c-ets-1** products act as sequence-specific transcriptional activators (Bosselut et al., 1990 ; Gunther et al., 1990 ; Ho et al., 1990 ; B.Wasylyk et al., 1990 ; C.Wasylyk et al., 1991, 1992). p68<sup>c-ets-1</sup> and p54<sup>c-ets-1</sup> display sequence-specific DNA-binding activity mediated by a carboxy-terminal region common to the two **c-ets-1** products (Boulukos et al.,1989; Nye et al., 1992; Wasylyk et al.,1992). This C-terminal domain encompasses the **ETS** domain, a 85 amino acids region strongly conserved between the **ets** gene



family that includes the closely related: c-ets-2, erg, elk-1, SAP-1a/b, GABP $\alpha$  genes (for review, see MacLeod et al., 1992). The transcription activator regions of c-ets-1 proteins have been delineated by domain swap experiments using heterologous DNA-binding domains (Schneikert et al., 1992). p68<sup>c-ets-1</sup> contains two independent activation domains in its amino-terminal region, one of which is encoded by the p68<sup>c-ets-1</sup>-specific  $\alpha$  and  $\beta$  exons, the second being common to p68<sup>c-ets-1</sup> and p54<sup>c-ets-1</sup>. Thus alternative initiation and splicing of chicken c-ets-1 RNA generates transcription factors with different activation domains. Indeed, this structural difference may reflect functional differences, as suggested by the fact that p68<sup>c-ets-1</sup> was shown to be a more potent activator of the rat stromelysin promoter than p54<sup>c-ets-1</sup> (Wasylyk et al., 1991).

Several lines of evidence already suggested that these alternative splicing events at the c-ets-1 locus occur in a tissue-specific manner. Immunoprecipitation studies with chicken adult tissues have revealed that p54<sup>c-ets-1</sup> is preferentially expressed in lymphoid organs such as thymus, spleen, bursa of Fabricius (Chen, 1985, Ghysdael et al., 1986). p68<sup>c-ets-1</sup> was only detected in the spleen, and rather in a fraction that does not contain lymphoid cells (Leprince et al., 1988 ; 1990). To address the physiological role of these two transcription regulators, we have undertaken a detailed description of their expression pattern during the development of the chick embryo. We report here that before the formation of lymphoid organs p54<sup>c-ets-1</sup> as well as p68<sup>c-ets-1</sup> are expressed in a wide variety of cells of mesodermal origin. However, whereas p54<sup>c-ets-1</sup> transcripts are found uniformly distributed, p68<sup>c-ets-1</sup> transcripts appear restricted to a subset of cells. A detailed analysis of the expression of these two products during erythropoiesis is also presented here. In lymphoid organs, we confirm the expression of p54<sup>c-ets-1</sup> and the absence of p68<sup>c-ets-1</sup> in T and B lymphocytes.

## MATERIALS AND METHODS

### Probes

A 140 bp EcoRI-ClaI fragment containing the 5' untranslated region and exon I<sup>54</sup> of p54<sup>c-ets-1</sup> cDNA (Duterque-Coquillaud et al., 1988) was subcloned into pSP64 and pSP65 (Promega Biotech). These constructs were used to synthesize antisense and sense RNA probes specific for the transcripts encoding p54<sup>c-ets-1</sup>. Similarly a 190 bp EcoRI-PstI fragment from p68<sup>c-ets-1</sup> cDNA encompassing exons  $\alpha$  and  $\beta$  (Leprince et al., 1988) was used as template to synthesize the probe specific for the transcripts encoding p68<sup>c-ets-1</sup>. Another probe, derived from a 750 bp BglIII-HindIII fragment of the E26 provirus (Leprince et al., 1983) hybridized to the exons which are common to the two mRNAs encoding p54<sup>c-ets-1</sup> and p68<sup>c-ets-1</sup>. RNA probes were transcribed from truncated plasmids by the SP6 RNA polymerase (Boehringer Mannheim) using 200  $\mu$ Ci of [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S] CTP and 200  $\mu$ Ci of [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S] UTP ( $\approx$ 1300 Ci/mmol, NEN).

The specificity of probes was demonstrated by northern blot analysis of total RNA from different organs and cell lines (thymus and spleen of E15 embryos, myeloblasts transformed by E26 and HD11, a chicken macrophage cell line) (data not shown).

### In situ hybridization

The eggs of brown Leghorn chickens were incubated at 37°C in a humidified air chamber. The age of the embryos is indicated as E1, E2 etc.....E0 being the first day of incubation. Embryos or dissected organs were fixed at 4°C for 16 h in 4 % paraformaldehyde in PBS, dehydrated and embedded in paraffin. 4  $\mu$ m thick transverse sections were transferred to aminopropyltriethoxysilane (TESPA ; Aldrich) coated slides and incubated at 42°C for two days. Slides may be stored at 4°C for up to 1 year before hybridization.

*In situ* hybridization was performed according to Quéva et al. (1992). The best signal to background ratio was obtained at a concentration of 3  $\mu$ g  $\mu$ l<sup>-1</sup> for p54<sup>c-ets-1</sup> and p68<sup>c-ets-1</sup> specific probes and when hybridization and washes were performed at 70°C and 75°C respectively (because of the high GC% of the p54<sup>c-ets-1</sup> specific probe). 3 months exposure were necessary to detect a significant signal with these two probes. The use of the 750 bp c-ets-1

probe required less stringent conditions with a probe concentration of  $20 \text{ pg } \mu\text{l}^{-1}$ , hybridization and washes at  $60^{\circ}\text{C}$  and  $65^{\circ}\text{C}$  respectively and 2 weeks exposure. After exposure and development, labeling with the Hoescht dye 33258 (bisbenzimidazole) was performed to visualize the nuclei. Sections were examined under dark-field and epifluorescence illumination with Zeiss microscope (IM35). In parallel with antisense probes, we always used on serial sections sense control probes that never gave any signal.

### Fractionation of hemopoietic cells

Circulating red cells were isolated as described by Minie et al. (1992). Briefly, 60 embryos at E3 were collected in DMEM at  $4^{\circ}\text{C}$  and gently lacerated with scissors to promote bleeding. Once collection was completed, the embryo bodies were removed by filtration through gauze. The primitive erythroid cells were further purified on lymphocyte preparation medium (Lymphoprep<sup>TM</sup>, Nycomed) by centrifugation 10mn at 600g, and were recovered in the pellet. Cells of the definitive erythroid lineage were isolated from E19 embryos by venous puncture of 3 embryos and collection of blood into PBS, and purified as described above.

Cell suspensions of thymus and spleen at E15, and of yolk sac at E3 and E10 were obtained by disruption at  $+4^{\circ}\text{C}$  in a tissue homogenizer in DMEM followed by filtration through a fine nylon mesh screen (Blutax). Filtrable cells were further separated by centrifugation 10 mn at 600g on lymphocyte preparation medium into a light phase and a pellet. The nature of the cells recovered in the different fractions is specified in the results section.

A cytospin preparation of the cells obtained from the E3 yolk sac was stained with benzidine for the detection of hemoglobin (Orkin et al., 1975) and counterstained with Giemsa (RAL). Total cellular RNAs were isolated from these cell populations and from embryonic tissues by the method of Chirgwin et al. (1979).

### RT-PCR analysis

RT-PCR experiments were performed with the Gene Amp RNA PCR kit (Perkin Elmer cetus).  $1 \mu\text{g}$  of total RNA was retrotranscribed according to the indications of the supplier, using 50pM of random hexamer. Retrotranscription was continued in a  $20 \mu\text{l}$  reaction volume at  $42^{\circ}\text{C}$

during 30mn, stopped at 95°C for 5mn and hold at 4°C. Half of this reaction volume was immediately added to a PCR mix provided by the supplier. In this mixture the optimal MgCl<sub>2</sub> concentration was 2.8mM. 50pmol of each specific primer and 0.25μCi of [<sup>32</sup>P] α dCTP were added to each PCR reaction. Thirty cycles of PCR were performed in a thermojet thermocycler (Eurogentec), each cycle typically consisting of 1 mn of denaturation at 94°C, 1 mn of annealing at 65°C, and 1 mn of extension at 72°C. PCR products were analyzed after separation on polyacrylamide gels and detected by autoradiography and densitometry (Bioprofil, Vilbert Lourmat analysis system). To ascertain the linearity of the RT-PCR amplification, we performed RT-PCR experiments with known amounts of RNA transcribed *in vitro* by T7 RNA polymerase (Boehringer) from p54<sup>c-ets1</sup> and p68<sup>c-ets1</sup> cDNAs cloned into a pSG5 plasmid (Duterque-Coquillaud et al., 1988 ; Leprince et al., 1988). These RNAs were repeatedly treated with RQ1 DNase until they produced no PCR product in the absence of reverse transcription. The amount of *in vitro* transcribed RNA was quantitated by ethidium bromide staining. A signal linearly proportional to the RNA input was obtained between 0.01pg and 10pg (data not shown). Subsequently for each series of RT-PCR experiments with embryonic RNA, we added 2 control tubes containing 0.01pg and 0.1pg of a mixture of p54<sup>c-ets-1</sup> and p68<sup>c-ets-1</sup> synthetic RNA. As an internal control of amplification to compare relative amounts of c-ets-1 transcripts, 0.5pg of RNA synthesized from a human erg-1 cDNA (Duterque-Coquillaud, submitted) was added to each reverse transcription. These erg-1 RNA internal standards were co-amplified with c-ets-1 cDNAs using specific primers. The 5' erg-1 primer (sense) begins at nucleotide position 144 of the coding sequence; its sequence is 5'-GCAAGCGGATCCTACGCTATGGAGTA-3', The 3' primer (antisense) is at nucleotide position 286 and has the sequence 5'-TGTGAGAGAAGGATGTCGGCGTTG -3'. These oligonucleotides generated DNA fragments of 188 base pairs as predicted.

For p54<sup>c-ets-1</sup> specific PCR, the 5' primer used was designated oligonucleotide 54. Its sequence is 5'-GACCATCATCAAGACGGAGAAG-3' at nucleotide position 32 of the protein-coding sequence of the p54<sup>c-ets-1</sup> cDNA (Duterque-Coquillaud et al., 1988). The 5' primer specific for the amplification of p68<sup>c-ets-1</sup> cDNA is designated oligonucleotide 68. Its sequence is 5'-ACATGGACACAACCATTGGCAG-3' which corresponds to nucleotide position 14 of the

p68<sup>c-ets-1</sup> cDNA (Leprince et al., 1988). The 3' primer, designated as 3'c, is common for the amplification of p54<sup>c-ets-1</sup> and p68<sup>c-ets-1</sup> cDNAs. Its sequence is 5'-ACTCCCTTCAGGCTGAACTCAT-3' and corresponds to position 279 and 311 of p54<sup>c-ets-1</sup> and p68<sup>c-ets-1</sup> coding sequence respectively.

RT-PCR experiments using the 54/3'c oligonucleotide pair yielded 246 bp fragments, as predicted from the p54<sup>c-ets-1</sup> cDNA sequence. PCR experiments using the 68/3'c oligonucleotide pair yielded 397 bp fragments, as predicted from the p68<sup>c-ets-1</sup> cDNA sequence. No fragment were obtained in any embryonic sample after RT-PCR without adding reverse-transcriptase in the reaction mixture. Each experiment was at least duplicated to check the reproducibility of the result. Densitometric data for p54<sup>c-ets-1</sup> and p68<sup>c-ets-1</sup> mRNAs expression were normalized relative to the known erg-1 RNA input .

#### Immunoprecipitation

After dissection of the tissues (dermis and liver from E6 chicken embryos), cell suspensions were obtained by gentle disruption at +4°C in a tissue homogenizer in 10ml of DMEM supplemented with 10% of fetal calf serum. Metabolic labeling was performed in 3ml of methionine free Eagle medium supplemented with 5% dialyzed calf serum and L-[<sup>35</sup>S] methionine [0,5mCi/ml]. After 1 hour of labeling, the cell suspensions were centrifuged for 10min at 1000rpm. Pellets were lysed in 0,5ml of boiling 1% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, followed by dilution in 9 volumes of RIPA buffer without SDS (150mM NaCl, 1mM EDTA, 10mM Trishydrochloride pH7.4, 1% Triton X-100, 0,5% sodium deoxycholate, 1% Trasylol)(Leprince et al., 1990). Equal volumes (1,0ml) of each cell suspension were immunoprecipitated with specific or preimmune sera. Immunoprecipitation was followed by SDS-polyacrylamide electrophoresis and fluorography. The size of immunoprecipitated proteins was estimated by comparison with prestained molecular weight standarts run on the same gel (data not shown). We used in this study the anti ets-A serum (Ghysdael et al., 1986) which recognizes both c-ets-1 and c-ets-2 proteins, a peptide-directed anti β serum (Leprince et al., 1990) and a serum raised against peptide CLHAMLVDVKPDADE, corresponding to amino-acids 473-485 at the carboxy-terminal part of p68<sup>c-ets-1</sup>. This peptide was synthesized by the solid

phase method, and coupled to KLH by an added free cysteine. Immunization of rabbits were performed as previously described (Leprince et al., 1988) and the serum obtained was named anti Ct (Carboxy-terminal).

**RESULTS :**

Northern blot and immunoprecipitation analysis have previously emphasized the expression of c-ets-1 in lymphoid cells in the adult (Chen et al., 1985, Ghysdael et al., 1986). However, when we analysed c-ets-1 expression in the chick embryo between E2 and hatching using a 750-bp c-ets-1 probe hybridizing with both mRNAs encoding p54<sup>c-ets-1</sup> and p68<sup>c-ets-1</sup>, we found a signal in a variety of non lymphoid cells.

**Expression of p54<sup>c-ets-1</sup> and p68<sup>c-ets-1</sup> during the first stages of chick morphogenesis**

On the first day of incubation, during gastrulation (Hamburger and Hamilton stage 4 to 6), the 750-bp c-ets-1 probe detected c-ets-1 transcripts in mesodermal cells as soon as they come in contact with the endoderm and start to migrate into the blastocoele (Fig.2A). c-ets-1 expression is not found in the presumptive cordal and somitic mesoderm and is restricted to the lateral and extraembryonic mesoderm (Fig.2B).

At E2, a conspicuous expression is seen in sclerotomal cells, in endothelia and in extraembryonic blood islands, which appear in the mesoderm of the area opaca as tight clusters of cells in contact with the endoderm (Fig.2C). c-ets-1 is expressed in sclerotomal cells before the disaggregation of the somite epithelia. Later c-ets-1 transcripts are also found in mesenchymal sclerotomal cells (Fig.2D) whereas the dermomyotome is not labeled. c-ets-1 is also expressed at a lower level in the migrating neural crest cells (Fig.2C,D). RT-PCR experiments allow us to assess the relative level of the mRNAs encoding p54<sup>c-ets-1</sup> and p68<sup>c-ets-1</sup> at these early stages. Both mRNAs are found in the chick blastodisc at E1 and E2. The level of expression of p54<sup>c-ets-1</sup> is higher than the level of expression of p68<sup>c-ets-1</sup> (Fig.3, lane 1-6). There is no significant difference in the ratio between the expression of p54<sup>c-ets-1</sup> and p68<sup>c-ets-1</sup> mRNAs in the area opaca, where the extraembryonic blood islands are located, and in the area pellucida with the embryo proper (Fig.3, lane 3-6).

### **Expression of both p54<sup>c-ets-1</sup> and p68<sup>c-ets-1</sup> in mesodermal tissues during organogenesis.**

One of the most striking features of c-ets-1 expression in the chick embryo from E3 to E6 is the transient expression of c-ets-1 during blood vessels formation. At this stages, almost all endothelial cells express p54<sup>c-ets-1</sup> mRNAs. p54<sup>c-ets-1</sup> mRNAs are detected in the vessels of capillary size such as around the neural tube at E3 as well as in the endothelia of larger vessels, such as the aorta at E3 (Fig.4A). Likewise a positive signal is observed between the tubules of the mesonephros and in the glomeruli at E6 (Fig.5A), and in the sinusoids of the developing liver (Fig.5C). p68<sup>c-ets-1</sup> transcripts are also found in endothelial cells in the liver and in the kidney (Fig.4B, 5B, 5D), but they appear restricted to a subset of these cells. This uneven labelling is well documented for endothelial cells around the neural tube at E3 (Fig.4B). Furthermore, both p54<sup>c-ets-1</sup> and p68<sup>c-ets-1</sup> can be immunoprecipitated in the liver at E6, suggesting that these two proteins are indeed expressed in the endothelial lining of the sinusoids in the liver at E6 (Fig.7, lane1,3,4). The expression of p54<sup>c-ets-1</sup> and p68<sup>c-ets-1</sup> is transient during the formation of blood vessels, the fully differentiated capillaries of adult tissues being negative for c-ets-1 mRNAs (Vandenbunder et al., 1989, and data not shown). RT-PCR experiments on the whole embryo at E3 (Fig.3, lane 7,8) and on the brain and the liver at E6 (Fig.3, lane 21-24) allow us to evaluate the relative level of expression of p54<sup>c-ets-1</sup> and p68<sup>c-ets-1</sup> mRNAs. In all these tissues, p54<sup>c-ets-1</sup> transcripts are about 5 times more abundant than p68<sup>c-ets-1</sup> transcripts. *In situ* hybridization experiments suggest that this difference is due to a lower percentage of endothelial cells expressing p68<sup>c-ets-1</sup> transcripts, rather than a lower amount of these transcripts in positive cells.

Between E3 and E6, the expression of c-ets-1 is also particularly intense in organ rudiments in which mesenchyme and epithelium are interacting. c-ets-1 transcripts are found in mesenchyme interacting either with endodermal derivatives such as the gizzard and the gut (data not shown), with mesoderm-derived epithelium as the mesonephric blastema or with ectodermal



derivatives such as the limb bud (Fig.4A, B) or the dermis (Fig.6 ). In all these situations, c-ets-1 is not transcribed in epithelial cells.

The morphogenesis of the skin is an example of secondary induction involving the interaction of the epidermis with the subjacent dermis, where c-ets-1 expression is precisely regulated (Desbiens et al.,1991). Until E5, when the skin comprises a thin ectodermal layer and sparse mesodermal cells, p54<sup>c-ets-1</sup> and p68<sup>c-ets-1</sup> transcripts are both detected in these loose dermal cells and more deeply in clusters of endothelial cells in the hypoderm (Fig.6A,B). The first event in the developmental program is the densification phase leading to the formation of an uniform thick layer of dermal cells. p54<sup>c-ets-1</sup> is expressed all over the dermis at this stage (Fig.6C), whereas p68<sup>c-ets-1</sup> is intensively expressed in a restricted population of these dermal cells (Fig.6D). Immunoprecipitation experiments reveal that both p54<sup>c-ets-1</sup> and p68<sup>c-ets-1</sup> in the dermis are present at this stage (Fig.7, lane 6,8,9). After the appearance of epidermal placodes, a second wave of dermal condensation occurs at E7. The expression of p54<sup>c-ets-1</sup> and p68<sup>c-ets-1</sup> decreases in the mesenchymal cells that accumulate beneath the epidermal placode (Fig.6E, F). The signal displayed by p54<sup>c-ets-1</sup> probe is more widespread than the signal obtained with p68<sup>c-ets-1</sup> probe (Fig.6E, F). When the outgrowth of the feather bud begin, the transcription of p54<sup>c-ets-1</sup> and p68<sup>c-ets-1</sup> becomes restricted to the endothelial cells in the hypodermis and in the feather pulp (Fig.6G, H) .

#### **Expression of p54<sup>c-ets-1</sup> and p68<sup>c-ets-1</sup> during hemopoiesis.**

The v-ets oncogene, the cellular progenitor of p68<sup>c-ets-1</sup>, confers on the avian acute leukemia virus E26 the ability to transform cells of the erythroid lineage (Radke et al., 1982; Moscovici et al., 1983; Metz and Graf, 1991a, b). The E26 erythroid transformed cells were recently shown to be multipotent progenitors able to differentiate in 3 different hematopoietic lineages: erythro-thrombocytic, myelo-monocytic and eosinophilic (Graf et al., 1992). Keeping in mind the transforming properties of E26, we focused our attention during the course of this study on the expression of p54<sup>c-ets-1</sup> and p68<sup>c-ets-1</sup> in erythroid cells.

Erythropoiesis begins between the primitive streak and the head fold stages (Hamburger and Hamilton stages 4 to 6) in extraembryonic blood islands (for review, see Dieterlen-Lièvre, 1988). These tight clusters of cells called hemangioblasts, which appear in the mesoderm of the area opaca in contact with the endoderm, are labeled with the 750-bp c-ets-1 probe (Fig.2B,C). p54<sup>c-ets-1</sup> and p68<sup>c-ets-1</sup> mRNAs are detected by the RT-PCR technique in the whole blastodisc at E1 and in the area opaca at E2, indicating that these two transcripts are indeed expressed within the extraembryonic blood islands (Fig.3, lane 1-6). At about the 6-8 somite stage, the hemangioblasts give rise to two lineages : the cells on the surface of the blood islands flatten to become endothelial, whereas the central cells differentiate into the primitive erythroid lineage and begin to express hemoglobins specific to that period of development. In the chick embryo at E2 and E3, the c-ets-1 signal disappears from the central cells of the more mature blood islands but it remains on endothelia (Fig.2C, D, see also Vandebunder et al., 1989). The expression of p54<sup>c-ets-1</sup> and p68<sup>c-ets-1</sup> mRNAs has been investigated by the RT-PCR technique during erythropoiesis in the yolk sac at E3. After filtration throughout a fine nylon mesh which retain fibers and large aggregates, the cells were separated by centrifugation into a light and a dense fraction. In the light fraction, about 50% of the cells are not stained with benzidine (data not shown). Conversely, the dense fraction is considerably enriched in erythroid cells since up to 90% of the cells contain hemoglobin as revealed by benzidine staining. Heavily stained primitive erythrocytes are recovered in this last fraction. p54<sup>c-ets-1</sup> and p68<sup>c-ets-1</sup> transcripts are found both in the light and the dense fraction (Fig.3, lane 9-12). We have subsequently investigated more mature stages of erythroid differentiation and found that neither p54<sup>c-ets-1</sup> nor p68<sup>c-ets-1</sup> are expressed in circulating primitive erythrocytes prepared from blood of E3 embryo (Fig.3, lane 17,18). The faint band observed in the lanes 17 to 20 on figure 3 has a higher molecular weight than the fragment amplified in RT-PCR control experiment from p54<sup>c-ets-1</sup> standart RNA and is therefore considered as artifactual. These results provide the first evidence that p68<sup>c-ets-1</sup> is expressed in immature erythroid cells which differentiate in the extraembryonic blood islands from E1 to E3.

In the 3- 4-day avian embryo, after the first wave of erythropoiesis which occurs in the yolk sac from intrinsic precursors, multipotent hemopoietic progenitor cells emerge in the ventrolateral wall of the aorta (Dieterlen-Lièvre and Martin, 1981; Dieterlen-Lièvre 1984, 1988). Since these cells are closely aggregated onto the endothelium of the aorta, it is very difficult to attribute the signal observed with the p54<sup>c-ets-1</sup> probe to these hemopoietic cells rather than to the endothelial cells (Fig. 4A). p68<sup>c-ets-1</sup> transcripts are not detected in any of these cells (Fig.4B). At E6, erythroid progenitors become numerous in the dorsal mesentery and they assemble into dense foci around blood vessels. Neither the expression of p54<sup>c-ets-1</sup> nor the expression of p68<sup>c-ets-1</sup> were detected in these foci (data not shown). Intraembryonic progenitor cells immigrate from these foci into the rudiment of the hemopoietic organs. The spleen and the yolk sac are seeded by definitive erythroid progenitor cells of intraembryonic origin (Dieterlen-Lièvre, 1988). In the yolk sac, these cells form secondary blood islands where we have not detected any of the c-ets-1 transcripts by *in situ* hybridization (data not shown). RT-PCR analysis of the different fractions of the yolk sac at E10 confirms the absence of p54<sup>c-ets-1</sup> and p68<sup>c-ets-1</sup> transcripts in purified erythroid cells in the dense fraction (Fig.3, lane 15,16). A faint signal corresponding to p54<sup>c-ets-1</sup> transcripts is detected in the low density fraction which is most likely due to c-ets-1-positive endothelial cells (Fig.3, lane 14). No p68<sup>c-ets-1</sup> signal is detected in this fraction of the yolk sac at E10 (Fig. 3, lane 13). Likewise, c-ets-1 transcripts are not detected in mature circulating erythrocytes isolated from blood of E19 embryos (Fig.3, lane 19,20).

We were also interested in describing the expression of p54<sup>c-ets-1</sup> and p68<sup>c-ets-1</sup> in the spleen because p68<sup>c-ets-1</sup> was originally detected there (Leprince et al.,1988, 1990). p54<sup>c-ets-1</sup> and p68<sup>c-ets-1</sup> transcripts are detected by *in situ* hybridization in the spleen at E6 (Fig.5A,B) and at E15 (data not shown), but the complexity of this organ and the lack of molecular markers make difficult the identification of the labelled cells. At E6, the spleen rudiment is not yet colonized by erythroid progenitor cells, and a dense network of stromal and endothelial cells which will later harbor hemopoietic progenitor cells is being built (Yassine et al.,1989). Therefore, at E6, the c-ets-1 signal may be attributed essentially to endothelial and mesenchymal cells (Fig.5A,B). At E15 we

were able to divide spleen cells in a dense fraction rich in erythroid cells and a light one containing a mixture of erythroid, myeloid and lymphoid cells. The results obtained by RT-PCR are consistent with immunoprecipitation experiments which have shown the presence of p54<sup>c-ets-1</sup> and the absence of p68<sup>c-ets-1</sup> in splenic hemopoietic cells (Fig.3, lane 29-34) (Leprince et al., 1990).

Previous reports on the expression of c-ets-1 have emphasized the high level of expression of this proto-oncogene in lymphoid cells (Chen, 1985; Ghysdael et al., 1986). The thymus at E15 does display a strong hybridization signal with the p54<sup>c-ets-1</sup> probe (Fig.3, lane 26,28. Fig.8A). p54<sup>c-ets-1</sup> is also expressed in B lymphoid cells. Figure 8C shows an E15 bursal follicle, a cluster of differentiating lymphoid cells labeled with the p54<sup>c-ets-1</sup> probe. No signal is detected by *in situ* hybridization in lymphoid cells with the p68<sup>c-ets-1</sup> probe (Fig.8B,D), as previously described by other methods (Leprince et al., 1988, 1990). RT-PCR analysis of RNA samples extracted from thymocytes, recovered in the light fraction, confirms the absence of p68<sup>c-ets-1</sup> transcripts in these cells (fig.3, lane 27). The p68<sup>c-ets-1</sup> cDNA fragments amplified from RNA samples extracted from thymus at E15 (Fig.3, lane 25) presumably result from p68<sup>c-ets-1</sup> mRNA transcription in the endothelial cells of blood vessels irrigating the thymus.

**DISCUSSION :**

This paper extends and refines our previous description of c-ets-1 expression throughout the development of the chick embryo (Vandenbunder et al., 1989). We show that c-ets-1 transcription is transient and closely associated with organizing mesodermal tissues, as exemplified by three types of phenomena. Firstly, during the epithelial mesenchymal transition, c-ets-1 is expressed in the epithelium before its dissociation into mesenchyme. This process is well illustrated in the somites at E2, where c-ets-1 transcripts are found in the presumptive sclerotome before the somite epithelium disaggregates into a mesenchymal sclerotome (Fig.2C,D). Secondly, c-ets-1 transcription is also induced in mesenchymal cells under the inductive influence of epithelial cells. Examples of such epithelial-mesenchymal interactions are observed in limb buds, in mesonephretic blastema (Fig. 4), in the dermis (Fig. 6), in the gizzard and in the gut (data not shown). Finally c-ets-1 is highly expressed within endothelial cells during blood vessel formation (Fig.4,7). Endothelial cell expression is detected in embryos irrespective of the process through which the vessels are forming , ie., vasculogenesis (emergence of blood vessels occurring de novo) or angiogenesis (budding of new blood vessels from pre-existing ones) (Pardanaud et al., 1989).

c-ets-1 expression has been initially described in T and B lymphoid cells (Chen, et al., 1985; Ghysdael et al., 1986). In these cells, p68<sup>c-ets-1</sup> transcripts are not detected, either by *in situ* hybridization or by RT-PCR analysis. In mesodermal tissues undergoing extensive reorganization, the signal obtained with the p68<sup>c-ets-1</sup> probe is restricted to a subset of cells, randomly distributed within a population where most cells express p54<sup>c-ets-1</sup>. On these positive cells, the signal with the p68<sup>c-ets-1</sup> probe appears as intense as the signal with the p54<sup>c-ets-1</sup> probe. p68<sup>c-ets-1</sup> was previously considered as a minor spleen-specific product after its first description by RNase protection and immunoprecipitation experiments (Leprince et al., 1988, 1990). Here, we demonstrate that p68<sup>c-ets-1</sup> is expressed in a wide population of mesodermal cells and that the low intensity of the signals detected by northern blot or immunoprecipitation analysis is partly due to the low percentage of p68<sup>c-ets-1</sup> expressing cells in mesodermal tissues. An attractive hypothesis, which could explain this interesting pattern of expression, is that

p68<sup>c-ets-1</sup> transcription is triggered by higher concentrations of signal coming from the epithelia or with different kinetics than p54<sup>c-ets-1</sup> transcription. Alternatively, the expression p68<sup>c-ets-1</sup> could also be induced at a specific phase of the cell cycle as has recently been shown for the human cdc2 gene (Dalton,1992). However, a careful examination of the promoter region governing the synthesis of p68<sup>c-ets-1</sup> RNA does not reveal any binding site for the retinoblastoma susceptibility gene product, which is required for the repression of cdc2 expression in the G0/G1 phase of the cell cycle. In the chicken c-ets-1 locus, two promoter regions have already been mapped (Crépieux et al., in preparation). The first promoter is located upstream of exon  $\alpha$  and initiates the transcription of the mRNA encoding p68<sup>c-ets-1</sup>. The second is very homologous to the previously characterized human c-ets-1 promoter (Jorcyk et al., 1991 ; Oka et al., 1991) and it initiates the transcription of p54<sup>c-ets-1</sup> mRNA. Therefore the use of alternative promoters rather than a true mechanism of alternative splicing is probably responsible for the synthesis of the two c-ets-1 products. Analyzing the nucleotide sequence of p68<sup>c-ets-1</sup> promoter allows the identification of several consensus sequences for transcriptional activators, including several potential Ets binding sites. In addition, high affinity sites for TCF-1, an HMG-like sequence-specific binding protein, and for the NFAT complex have been found (Van de Wetering et al., 1991 ; Thompson et al., 1992). The binding of these lymphoid-specific factors to the p68<sup>c-ets-1</sup> promoter is intriguing and could possibly account for the absence of p68<sup>c-ets-1</sup> in lymphoid cells if these factors are acting to repress expression from the p68<sup>c-ets-1</sup> promoter.

It is important to emphasize here the contribution of the *in situ* hybridization technique in addressing the function of alternatively-spliced products. In most cases, examination at the single cell level reveals that the amount of mRNA varies from one cell to another, and the interpretation of data obtained after extraction of mRNAs from cell populations must be cautiously dealt with, due to this heterogeneity. Thus, from RT-PCR and RNase protection experiments, showing equal amounts of transcripts encoding Fos B and the antagonist truncated form  $\Delta$ Fos B (Mumberg et al., 1991; Nakabeppu and Nathans, 1991), one cannot predict what will be the net result of the balance between these two antagonist proteins at the level of a single cell. In the study presented here, we show that the low hybridization signal obtained with the p68<sup>c-ets-1</sup> probe on northern blot (data not shown) does not mean that the amount of p68<sup>c-ets-1</sup> is negligible

in most cells. Indeed, it is reasonable to hypothesize that p68<sup>c-ets-1</sup> is present in sufficient amounts to compete with p54<sup>c-ets-1</sup> for binding to the regulatory elements of the same target genes since these two proteins recognize the same DNA sequence. The activation domain encoded by the  $\alpha$   $\beta$  exons of p68<sup>c-ets-1</sup> may result in an altered transactivation effect on target genes compared with p54<sup>c-ets-1</sup> which lacks this domain. The additional activation domain of p68<sup>c-ets-1</sup> may permit this protein to interact with different cofactors which would modify its activity. Thus, the differential expression of c-ets-1 could signify that the c-ets-1 proteins may have different functions in lymphoid and non-lymphoid cells. This dual role is reflected in target genes isolated so far, which are implicated both in T cell differentiation and in the control of extracellular matrix degradation (for review, see MacLeod et al., 1992).

In addition, this paper provides the first evidence that p68<sup>c-ets-1</sup>, the cellular progenitor of the v-ets oncogene, is expressed in erythroid cells. By *in situ* hybridization with the 750-bp c-ets-1 probe, a positive signal is observed on the extraembryonic blood islands which will later differentiate into the primitive erythroid lineage and into endothelial cells. p54<sup>c-ets-1</sup> and p68<sup>c-ets-1</sup> transcripts are detected in the whole blastodisc at E1 and in the area opaca at E2, indicating that these transcripts are indeed expressed in progenitors of the primitive erythroid lineage. This lineage is constituted by a unique "cohort" of cells, which are released in a very immature state at E2 and mature synchronously within the blood vessels (for review, Dieterlen-Lièvre, 1988). Since p54<sup>c-ets-1</sup> and p68<sup>c-ets-1</sup> are not expressed in circulating primitive erythrocytes at E3, it is very unlikely that the signals observed in the purified erythroid cells from the yolk sac at E3, are due to cells of the primitive lineage. Rather, p54<sup>c-ets-1</sup> and p68<sup>c-ets-1</sup> transcripts are more probably expressed at this stage in progenitor cells for the definitive erythroid lineage forming secondary blood islands as described by Dardick and Setterfield (1978). These immature blood islands are sequestered within the sinusoids of the yolk sac until they are released in the blood stream at E6. RT-PCR experiments do not allowed us to draw a conclusion on the status of p54<sup>c-ets-1</sup> expression in the definitive erythroid lineage arising from intraembryonic progenitors, since p54<sup>c-ets-1</sup> transcripts are not expressed in erythroid cells of the yolk sac at E10, whereas they are detected in erythroid cells purified from the spleen at E15. Since we can not ascertain that these erythroid population share the same degree of maturation, a precise description of

p54<sup>c-ets-1</sup> expression throughout the process of erythropoiesis would be required to solve this contradiction. Consistent with our previous study (Leprince et al., 1990), p68<sup>c-ets-1</sup> transcripts are not detected in the erythroid cells of the yolk sac at E10 and of the spleen at E15.

The detection of p68<sup>c-ets-1</sup> in the erythroid lineage is very interesting with regard to the transforming properties of the E26 retrovirus. This virus causes predominantly an erythroid leukemia and transforms both erythroid and myeloid cells *in vitro* (Radke et al., 1982, Moscovici et al., 1983). E26 has transduced the v-myb oncogene in addition to the v-ets oncogene, expressed together as a fusion protein P135<sup>δgag-myb-ets</sup> (Leprince et al., 1983, Nunn et al., 1983). The capacity of E26 to transform erythroid cells is mediated by the v-ets portion of the P135<sup>δgag-myb-ets</sup> (Beug et al., 1984, Nunn and Hunter, 1989). However there is evidence that v-Myb and v-Ets cooperate in transformation (Golay et al., 1988, Metz and Graf., 1991a). Moreover the fusion of v-Myb and v-Ets is required for the leukemogenicity of E26 retrovirus (Metz and Graf., 1991b). It is tempting to speculate that the P135<sup>δgag-myb-ets</sup> mimics a transient interaction between p68<sup>c-ets-1</sup> and p75<sup>c-myb</sup> in the early stages of erythroid differentiation. By *in situ* hybridization, we have detected c-myb transcripts in the yolk sac at E3 on scattered cells in the vicinity of blood vessels. This result was confirmed by RT-PCR in erythroid cells purified from the E3 yolk sac (C.Q., unpublished results). In this study, we show that both p54<sup>c-ets-1</sup> and p68<sup>c-ets-1</sup> mRNA can be detected in these cells. Although only double-labeling immunocytochemistry experiments with specific antibodies could firmly establish whether p68<sup>c-ets-1</sup> and p75<sup>c-myb</sup> are coexpressed within a single cell, it is tempting to speculate that a transient interaction between these two proteins takes place in erythroid progenitor cells. This attractive hypothesis would be confirmed by the identification of common target genes implicated in erythroid differentiation and the demonstration that Myb and Ets cooperate in their transactivation. As proposed by Frankel and Kim (1991), such an interaction would be weak, because "it would be difficult to dissociate or regulate the activity of a transcription complex if every component had an exceeding high affinity or specificity for every other component". In this context, one may speculate that the fusion of two transcription factors and the resulting loss of flexibility may disrupt the transcriptional initiation complex and lead to the oncogenic activation.



**ACKNOWLEDGEMENT :**

We would like to thank Drs F. Dieterlen, P. Crépieux, K. MacLeod, V. Laudet for critical reading of the manuscript, J. P. Thiery and L. Pardanaud for their help in analysing our results. We are indebted to C. Abbadie, M.A. Mirabel, N. Turque and X. Desbiens for providing sections for *in situ* hybridization, to J. C. Gesquière for the synthesis of Ct peptide, and to S. Quéva for patient typing. This work was supported by the Institut Pasteur de Lille, Centre National de la Recherche Scientifique, Association pour la Recherche sur le Cancer, and la Ligue Nationale contre le Cancer. C.Q. is a recipient of a fellowship from the Ministère de la Recherche et de l'Espace.

QUEVA et al.

REFERENCES :

Beug,H., Leutz,A., Kahn,P. and Graf,T. (1984). Ts mutants of E26 leukemia virus allow transformed myeloblasts, but not erythroblasts or fibroblasts, to differentiate at the nonpermissive temperature. *Cell* **39**, 579-588.

Bosselut,R., Duvall,J.F., Gégonne,A., Bailly,M., Hémar,A., Brady,J. and Ghysdael,J. (1990). The product of the c-ets-1 proto-oncogene and the related Ets2 protein act as transcriptional activators of the long terminal repeat of human T cell leukemia virus HTLV-1. *EMBO J.* **9**, 3315-3322.

Boulukos,K.E., Pognonec,P., Rabault,B., Bègue,A. and Ghysdael,J. (1989). Definition of an Ets1 protein domain required for nuclear localization in cells and DNA binding activity *in vitro*. *Mol. cell. Biol.* **9**, 5718-5721.

Chen,J.H. (1985). The proto-oncogene c-ets-1 is preferentially expressed in lymphoid cells. *Mol. cell. Biol.* **5**, 2993-3000.

Chirgwin,J.M., Przybyla,A.E., Mac Donald,R.J. and Rutter,W.J. (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* **18**, 5294-5299.

Dalton,S. (1992). Cell cycle regulation of the human cdc2 gene. *EMBO J.* **11**, 1797-1804.

Dardick, I. and Setterfield, G. (1978). Early origins of definitive erythroid cells in the chick embryo. *Tissue and Cell* **10**, 355-364.

Desbiens,X., Quéva,C., Jaffredo,T., Stéhelin,D. and Vandebunder.,B. (1991). The relationship between cell proliferation and the transcription of the nuclear oncogenes c-myc, c-myb and c-ets-1 during feather morphogenesis in the chick embryo. *Development* **111**, 699-713

Dieterlen-Lièvre,F. and Martin.,C. (1981). Diffuse intraembryonic hemopoiesis in normal and chimeric avian development *Dev. Biol.* **88**, 180-191

Dieterlen-Lièvre,F. (1984). Emergence of intraembryonic blood stem cells in avian chimeras by means of monoclonal antibodies. *Dev. Comp. Immunol.Suppl.* **3** : 75-80

Dieterlen-Lièvre, F. (1988). Birds. In "Vertebrate blood cells" Rowley A.F. and N.A. Ratchiffe. eds, Cambridge University Press.

Duterque-Coquillaud, M., Leprince, D., Flourens, A., Henry, C., Ghysdael, J., Debuire, B. and Stéhelin, D. (1988). Cloning and expression of chicken p54<sup>c-ets</sup> cDNAs : the first p54<sup>c-ets</sup> coding exon is located into the 40,0kbp genomic domain unrelated to y-ets. *Oncogene Res.* 2, 335-344.

Foulkes, N.S., Mellström, B., Benusiglio, E. and Sassone-Corsi, P. (1992). Developmental switch of CREM function during spermatogenesis : from antagonist to activator. *Nature* 355, 81-84.

Frankel, A.D. and Kim, P.S. (1991). Modular structure of transcription factors : implications for gene regulation. *Cell* 65, 717-719.

Golay, J., Introna, M. and Graf, T. (1988). A single point mutation in the y-ets oncogene affects both erythroid and myelomonocytic cell differentiation. *Cell* 55, 1147-1158.

Ghysdael, J., Gégonne, A., Pognonec, P., Dernis, D., Leprince, D. and Stéhelin, D. (1986). Identification and preferential expression in thymic and bursal lymphocytes of a c-ets oncogene-encoded Mr54,000 cytoplasmic protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 1714-1718.

Graf, T., McNagny, K., Brady, G. and Frampton, J. (1992). Chicken "erythroid" cells transformed by the Gag-Myb-Ets-encoding E26 leukemia virus are multipotent. *Cell* 70, 201-213.

Gunther, C.V., Nye, J.A., Bryner, R.S. and Graves, B.J. (1990). Sequence-specific DNA binding of the proto-oncoprotein ets-1 defines a transcriptional activator sequence within the long terminal repeat of the Moloney murine sarcoma virus. *Genes Dev.* 4, 667-679.

Hamburger, V., and Hamilton, H.L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* 88, 49-92.

Ho, I.-C., Bhat, N.K., Gottschalk, L.R., Lindsten, T., Thompson, C.B., Papas, T.S. and Leiden, J.M. (1990). Sequence-specific binding of human ets-1 to the T cell receptor  $\alpha$  gene enhancer. *Science* 250, 814-818.

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.

Jorcyk,C.L., Watson,D.K., Mavrothalassitis,G.J. and Papas,T.S. (1991). The human ETS1 gene: genomic structure, promoter characterization and alternative splicing. *Oncogene* **6**, 523-532

Koenig,R.J., Lazar,M.A., Hodin,R.A., Brent,G.A., Larsen,P.R., Chin,W.W. and Moore, D. D. (1989). Inhibition of thyroid hormone action by a non-hormone binding c-erbA protein generated by alternative mRNA splicing. *Nature* **337**, 659-661.

Leprince,D., Duterque-Coquillaud,M., Li,R. P., Henry,C., Flourens,A., Debuire,B. and Stéhelin,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.

Leprince,D., Gégonne, A., Coll,J., de Taisne,C., Schneeberger,A., Lagrou,C. and Stéhelin,D. (1983). A putative second cell-derived oncogene of the avian leukemia virus E26. *Nature* **306**, 395-397.

Leprince,D., Gesquiere,J. C. and Stéhelin,D. (1990). The chicken cellular progenitor of the v-ets oncogene, p68<sup>c-ets-1</sup>, is a nuclear DNA-binding protein not expressed in lymphoid cells of the spleen. *Oncogene Res.* **5**, 255-265.

Macleod,K., Leprince,D. and Stéhelin,D. (1992). The ets gene family. *Trends Bio. Sci.* **17**, 251-256.

Metz,T. and Graf,T. (1991a). v-myb and v-ets transform chicken erythroid cells and cooperate both in *trans* and in *cis* to induce distinct differentiation phenotypes. *Genes Dev.* **5**, 369-380.

Metz,T. and Graf,T. (1991b). Fusion of the nuclear oncoproteins v-Myb and v-Ets is required for the leukemogenicity of E26 virus. *Cell* **66**, 95-105.

Minie,M.E., Kimura,T. and Fesenfeld,G. (1992). The developmental switch in embryonic  $\rho$ -globin expression is correlated with erythroid lineage-specific differences in transcription factor levels. *Development* **115**, 1149-1164.

- Moscovici, M., Jurdic, P., Samarut, J., Gazzolo, L., Mura, C.V. and Moscovici, C. (1983). Characteristics of the hemopoietic target cells for the avian leukemia virus E26. *Virology* **129**, 65-78.
- Mumberg, D., Lucibello, F.C., Schuermann, M. and Muller, R. (1991). Alternative splicing of *fosB* transcripts results in differentially expressed mRNAs encoding functionally antagonistic proteins. *Genes Dev.* **5**, 1212-1223.
- Nakabeppu, Y. and Nathans, D. (1991). A naturally occurring truncated form of FosB that inhibits Fos/Jun transcriptional activity. *Cell* **64**, 751-759.
- 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.
- Nunn, M.F. and Hunter, T. (1989). The *ets* sequence is required for induction of erythroblastosis in chicken by avian retrovirus E26. *J. Virol.* **63** : 398-402.
- Nye, J.A., Petersen, J.M., Gunther, C.V., Jonsen, M.D. and Graves, B.J. (1992). Interaction of murine Ets-1 with GGA-binding sites establishes the ETS domain as a new DNA-binding motif. *Genes and Dev.* **6**, 975-990.
- Oka, T., Rairkar, A. and Chen, J.H. (1991). Structural and functional analysis of the regulatory sequences of the *ets-1* gene. *Oncogene* **6**, 2077-2083.
- Orkin, S.H., Harosi, F.I. and Leder, P. (1975). Differentiation in erythroleukemic cells and their somatic hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **72**, 98-102.
- Pardanaud, L., Yassine, F. and Dieterlen-Lièvre, F. (1989). Relationship between vasculogenesis, angiogenesis and haemopoiesis during avian ontogeny. *Development* **105**, 473-485.
- Quéva, C., Ness, S.A., Grässer, F.A., Graf, T., Vandenbunder, B. and Stéhelin, D. (1992). Expression patterns of *c-myb* and *v-myb* induced myeloid-1 (*mim-1*) gene during the development of the chick embryo. *Development* **114**, 125-133.

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.

Schneikert,J., Lutz,Y. and Wasylyk,B. (1992). Two independent activation domains in c-ets-1 and c-ets-2 located in non-conserved sequences of the ets gene family. *Oncogene* **7**, 249-256.

Thompson,C.B., Wang,C.-Y., Ho,I-C., Bohjanen,P.R., Petryniak,B., June,C.H., Miesfeldt,S., Zhang,L., Nabel,G.J., Karpinski,B. and Leiden,J.M. (1992). *cis*-acting sequences required for inducible interleukin-2 enhancer function bind a novel Ets-related protein, Elf-1. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 1043-1053.

Vandenbunder,B., Pardanaud, L., Jaffredo, T., Mirabel, M.A. and Stéhelin, D.(1989). Complementary patterns of expression of c-ets-1, c-myb and c-myc in the blood forming system of the chick embryo. *Development* **106**, 265-274.

Van de Wetering,M.,Oosterwegel,M., Dooijes,D. and Clevers,H. (1991). Identification of TCF-1, a lymphocyte-specific transcription factor containing a sequence-specific HMG box. *EMBO J.* **10**, 123-132.

Wasylyk,C., Gutman,A., Nicholson,R. and Wasylyk,B. (1991). The c-Ets oncoprotein activates the stromelysin promoter through the same elements as several non-nuclear oncoproteins. *EMBO J.* **10**, 1127-1134.

Wasylyk,C., Kerckaert,J.P. and Wasylyk,B. (1992). A novel modulator domain of Ets transcription factors. *Genes Dev.* **6**, 965-974.

Wasylyk,B., Wasylyk,C., Flores,P., Bègue,A., Leprince,D. and Stéhelin,D. (1990). The c-ets proto-oncogenes encode transcription factors that cooperate with c-Fos and c-Jun for transcriptional activation. *Nature* **346**, 191-193.

Yassine,F., Feddecka-Bruner,B. and Dieterlen-Lièvre,F. (1989). Ontogeny of the chick embryo spleen: a cytological study. *Cell Differ. Dev.* **27**, 29-45

## LEGEND TO FIGURES

Figure 1

Proteins encoded by the chicken c-ets-1 gene and their relationship to the v-ets-encoded domain of the E26 transforming protein p135<sup>gag-myb-ets</sup>.

Two closely related proteins, p54<sup>c-ets-1</sup> and p68<sup>c-ets-1</sup> having distinct amino-terminal parts are generated from the chicken c-ets-1 locus by alternative addition of different 5' exons,  $\alpha$  and  $\beta$  or I<sup>54</sup>, respectively, onto a common set of 3' exons (a to F). p68<sup>c-ets-1</sup> is the cellular counterpart of the v-ets encoded domain of p135<sup>gag-myb-ets</sup> from which it differs mainly by its carboxy-terminal part (black box) (Leprince et al., 1988). The lower part of this diagram indicates the location of peptides used to produce the anti-sera. Anti  $\beta$ , described in Leprince et al. (1990) recognizes p68<sup>c-ets-1</sup>. Anti ets-A protein serum, described in Ghysdael et al. (1986) can recognize Ets-1 and Ets-2 proteins. The peptide CLHAMLVDVKPDADE present in both p54<sup>c-ets-1</sup> and p68<sup>c-ets-1</sup> was chemically synthesized and coupled to KLH for immunization of rabbits (see Materials and Methods). The serum obtained was named anti Ct.

Figure 2

c-ets-1 expression during chick morphogenesis (Bar : 100 $\mu$ m).

2A,B: transverse sections through a chick embryo at head-process stage hybridized with the 750-bp c-ets-1 antisense probe (cm : cordal mesoderm, Hn : Hensen node, ps : primitive streak, sm : somitic mesoderm).

2A : c-ets-1 transcription is induced in mesodermal cells as soon as they start to migrate into the blastocoele.

2B: c-ets-1 transcripts are detected in the lateral and extra embryonic mesoderm. Blood islands (arrows) are more intensively labeled. c-ets-1 expression is not observed in the presumptive cordal and somitic mesoderm.

2C,D : transverse sections through a chick embryo of 26 somites hybridized with 750-bp c-ets-1 antisense probe (dm : dermomyotome, nc : neural crest cells, nt : neural tube, s : sclerotome).

2C : c-ets-1 is expressed in sclerotomal cells before the dissociation of the somite epithelia. c-ets-1 transcripts are detected in migrating neural crest cells, in endothelia and in blood islands in the area opaca (arrows).

2D : Sclerotomal cells are dispersed into a mesenchyme and express c-ets-1. The dermomyotome is not labeled.

### Figure 3

Expression of p54<sup>c-ets-1</sup> and p68<sup>c-ets-1</sup> encoding mRNAs in embryonic tissues.

RNA samples were normalized by ethidium bromide staining of rRNAs separated by agarose gel electrophoresis. Aliquots of erg-1 transcripts prepared *in vitro* (0,5pg for lanes 21, 22, 23, 24 or 5pg for the other lanes) were added to normalized RNAs (1 µg) and reverse transcribed with random priming. Half of the volume of the reverse transcription reaction was subjected to PCR amplification with the 54/3'c primer pair specific for p54<sup>c-ets-1</sup> transcripts (even-numbered lanes). The remaining half was subjected to PCR amplification of a p68<sup>c-ets-1</sup> fragment with the 68/3'c primer pair (uneven-numbered lanes). 0,25µCi of [<sup>32</sup>P]α dCTP were added to PCR reactions and incorporated into PCR products to allow densitometric analysis after polyacrylamide gel electrophoresis and autoradiography. Sizes of PCR products were determined relative to the migration of DNA size markers (lane M: pHA/HinfI). As expected, a 397-bp p68<sup>c-ets-1</sup>, a 246-bp p54<sup>c-ets-1</sup> and a control 188-bp RNA derived fragments were obtained.

Lanes 1 to 8 : early stages of embryogenesis, 1-2 : chick embryo at E1 (E1), 3-4 : area pellucida at E2 (AP2), 5-6 : area opaca at E2 (AO2), 7-8: area pellucida at E3 (AP3). Lanes 9 to 16 : fractionation of erythroid cells, 9-10 : low density fraction prepared from E3 yolk sac (LD3), 11-12 : high density fraction at E3 (HD3), 13-14 : low density fraction prepared from E10 yolk sac (LD10), 15-16: high density fraction at E10 (HD10). Lanes 17-20 : circulating erythroid cells,



17-18 : primitive lineage (CPri.), 19-20 : definitive lineage (CDef.). Lanes 21-22 : E6 brain (Br). Lanes 23-24 : E6 liver (Lv). Lanes 25-34 : hemopoietic organs at E15, 25-26 : E15 thymus (T), 27-28 : purified thymocytes (low density fraction) (LDT), 29-30 : E15 spleen (S), 31-32: high density fraction of the spleen (mainly erythroid cells) (HDS), 33-34 : low density fraction (mixture of hemopoietic cells) (LDS).

#### Figure 4

$p54^{c-ets-1}$  and  $p68^{c-ets-1}$  transcripts in the chick embryo at E3 (Bar : 100 $\mu$ m).

Transverse consecutive sections from E3 embryo at trunk level (a : aorta, nt : neural tube, wb : wing bud).

4A:  $p54^{c-ets-1}$  transcripts are detected in endothelial cells of the aorta and around the neural tube. Mesenchymal cells in the wing buds and in the mesonephretic blastema (arrows) are also intensely labeled. No signal is detected on epithelia.

4B:  $p68^{c-ets-1}$  transcripts are found in the same places, however they are restricted to a subset of the cells expressing  $p54^{c-ets-1}$ . Arrows point mesonephric blastema. Circulating erythrocyte in the aorta display non specific light scattering.

#### Figure 5

$p54^{c-ets-1}$  and  $p68^{c-ets-1}$  during organogenesis at E6.

5A,B Serial sections through the kidney and the spleen at E6. (k : kidney, s : spleen) (Bar : 100 $\mu$ m).  $p54^{c-ets-1}$  (5A) and  $p68^{c-ets-1}$  (5B) are detected in the endothelial cells of the kidney between the tubules and in the glomeruli (arrows), whereas the mesonephric tubules are negative.

5C,D :  $p54^{c-ets-1}$  (5C) and  $p68^{c-ets-1}$  (5D) in the liver at E6. The signal delineates the endothelium of the sinusoids. Mesothelial cells at the periphery of the liver express also  $p54^{c-ets-1}$  and  $p68^{c-ets-1}$ .

**Figure 6**

$p54^{c-ets-1}$  and  $p68^{c-ets-1}$  mRNAs expression during feather morphogenesis

(Bar : 50 $\mu$ m). (e : epidermis, d : dermis, epl: epidermal placode, dp : dermal pulp)

6A,C,E : sections hybridized with the  $p54^{c-ets-1}$  probe.

6G : section hybridized with the 750-bp c-ets-1 probe.

6B,D,F,H : sections hybridized with the  $p68^{c-ets-1}$  probe.

6A,B :  $p54^{c-ets-1}$  (A) and  $p68^{c-ets-1}$  (B) transcripts are strongly expressed in the loose mesenchymal cells beneath the epidermal layer and in the clusters of cells that will form blood vessels (arrows).

6C,D: At the completion of dermal cells accumulation the expression patterns of  $p54^{c-ets-1}$  (C) and  $p68^{c-ets-1}$  (D) remain unchanged.

6E,F: At the onset of the feather bud outgrowth  $p54^{c-ets-1}$  (E) and  $p68^{c-ets-1}$  (F) expression decrease in aggregated dermal cells underneath the epidermal placode.

6G,H: During the feather bud outgrowth c-ets-1 transcripts are restricted to the endothelial cells of the capillaries underlying the dermis and the feather pulp.

**Figure 7**

$p54^{c-ets-1}$  and  $p68^{c-ets-1}$  are immunoprecipitated in the liver (lanes 1 to 5) and in the dermis (lanes 6 to 9) at E6.

After L-[<sup>35</sup>S] methionine labeling, cells from these organs were analyzed by immunoprecipitation with anti ets-A serum (lanes 1 and 6), preimmune serum (lanes 2, 5 and 7), peptide directed antiserum  $\beta$  (lanes 4 and 8) and peptide directed antiserum Ct (lanes 3 and 9). The large arrow indicate  $p54^{c-ets-1}$  corresponding band and the thin arrow  $p68^{c-ets-1}$  corresponding band.

**Figure 8**

Differential expression of  $p54^{c-ets-1}$  and  $p68^{c-ets-1}$  in lymphoid cells.

8A,B,C : serial sections through the thymus at E15. (Bar: 100 $\mu$ m). Hybridization with the  $p54^{c-ets-1}$  probe results in an intense labeling on lymphoid cells (8A). In contrast no signal above background is observed either with the antisense  $p68^{c-ets-1}$  probe (8B) or with the sense probe (8C).

8D,E : serial sections through the bursa of Fabricius at E15 (Bar:50 $\mu$ m).  $p54^{c-ets-1}$  transcripts are detected in B lymphocytes (8B). The arrow points a bursal follicle labeled with  $p54^{c-ets-1}$  specific probe.  $p68^{c-ets-1}$  transcripts are not detected in this bursal follicle (arrow) (8E).

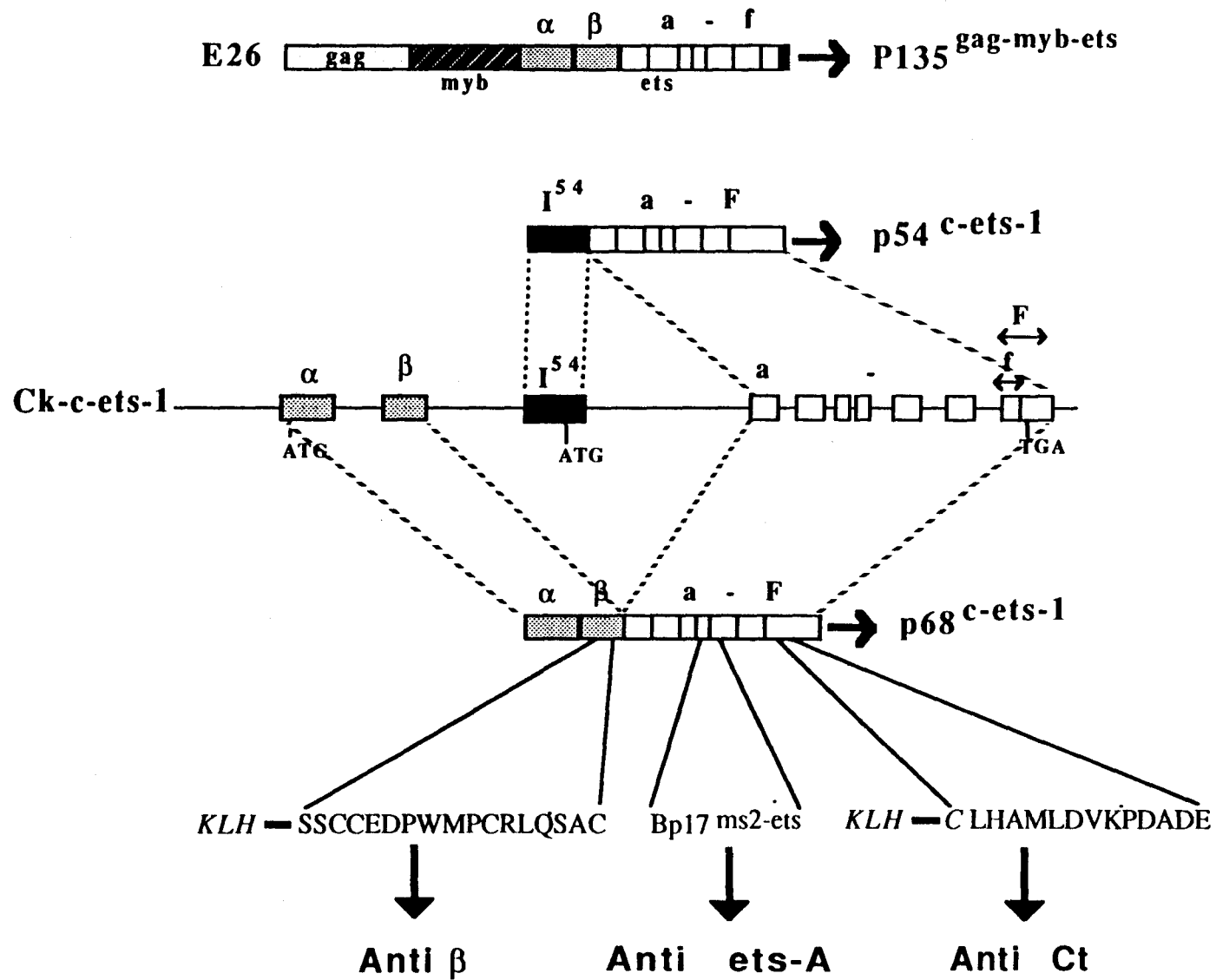
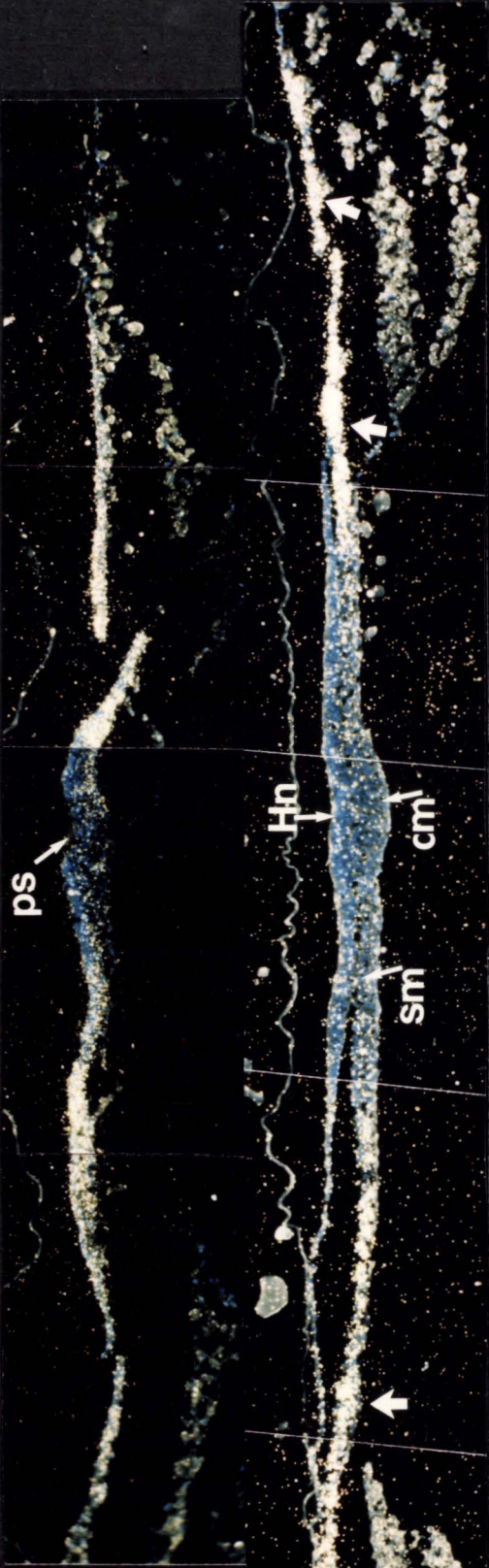
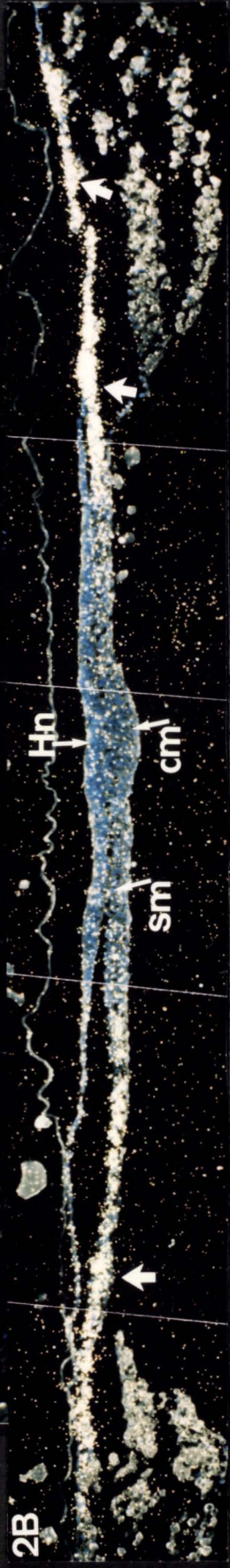


FIGURE 1

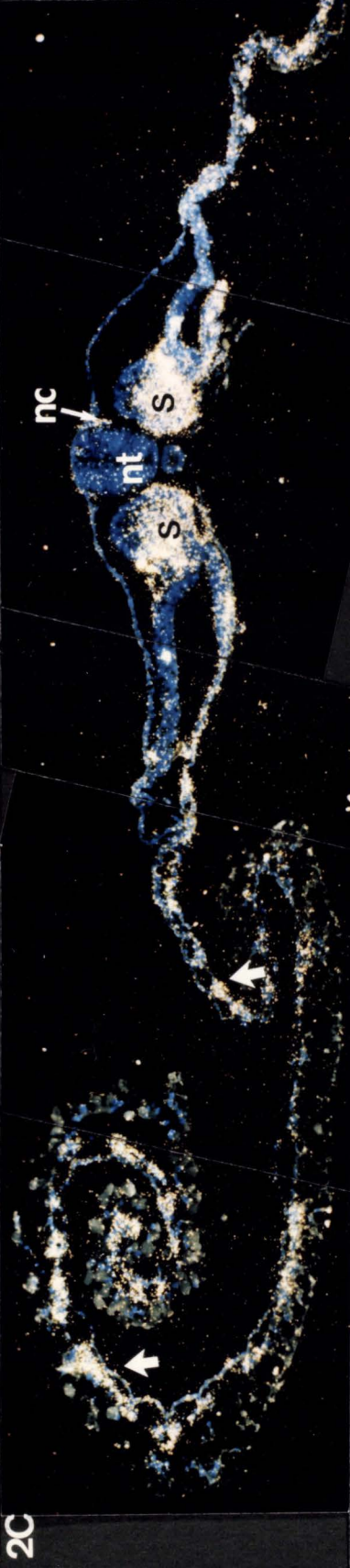
2A



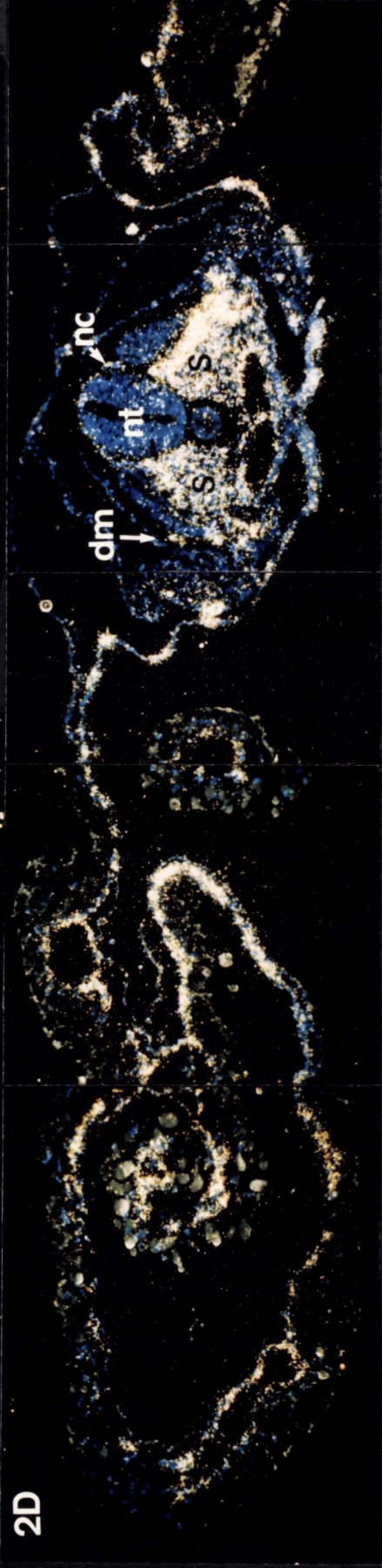
2B



2C



2D



750bp c-ets-1



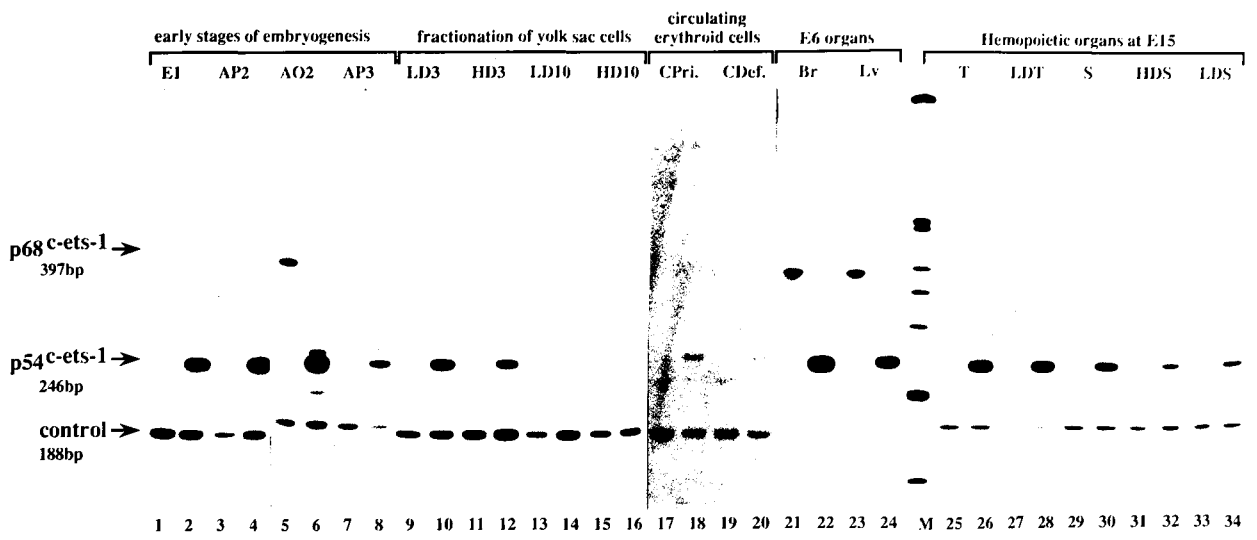


figure 3

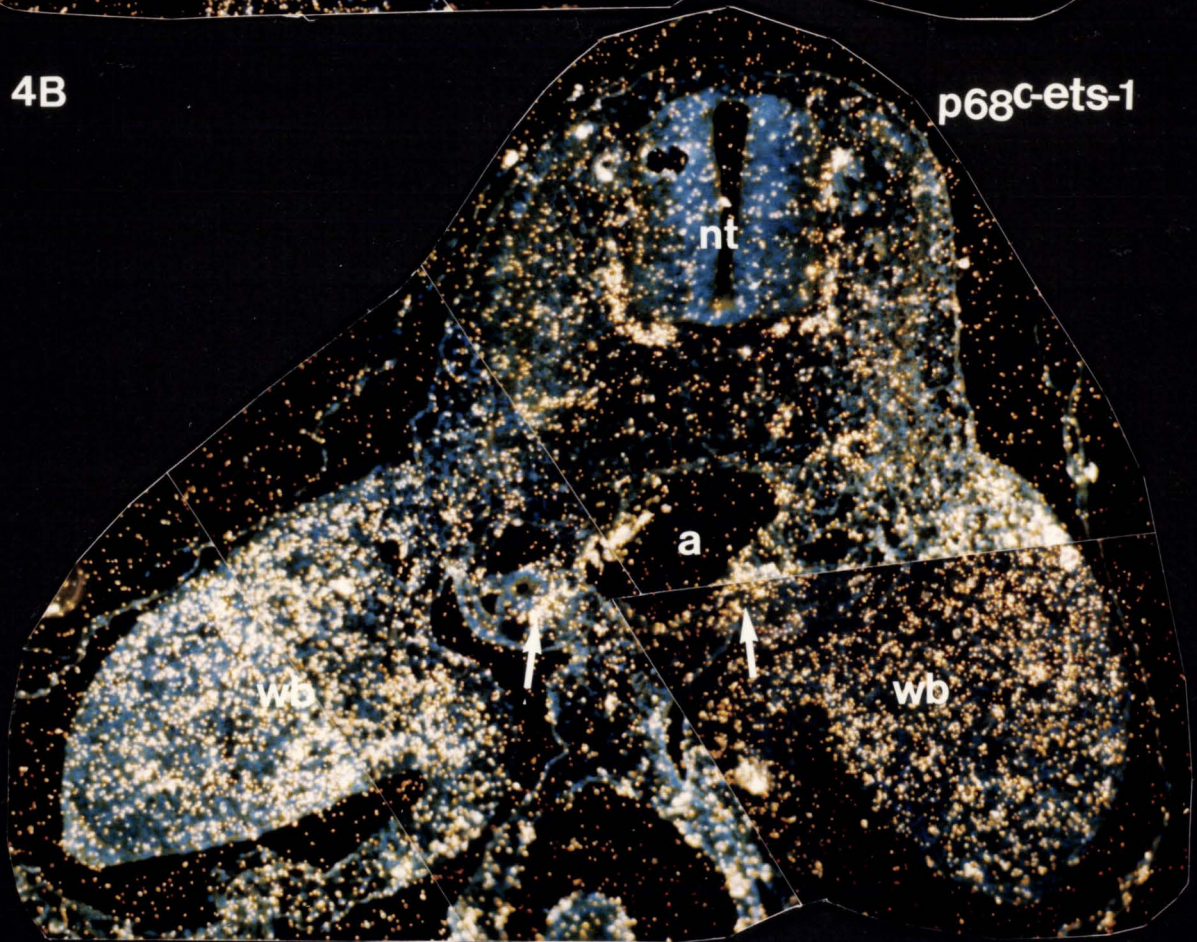
4A

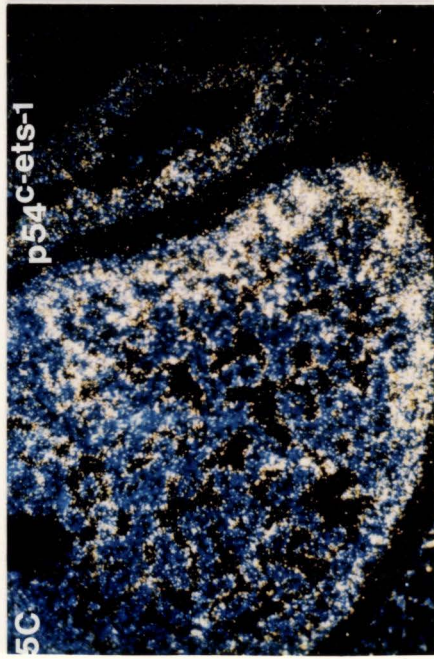
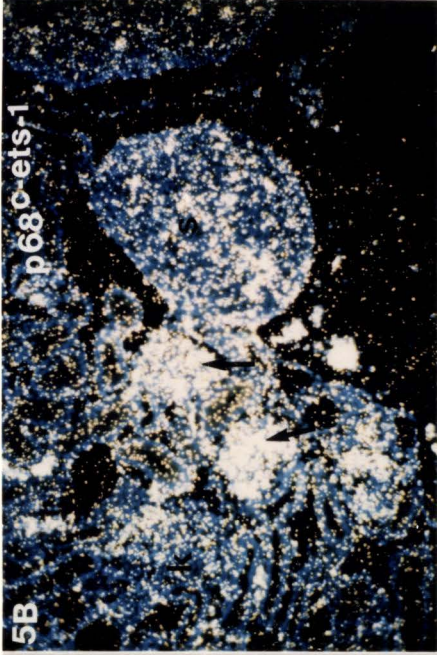
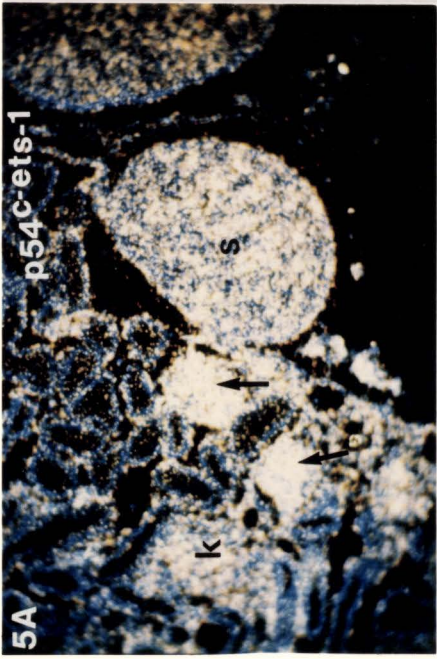
p54<sup>c-ets-1</sup>



4B

p68<sup>c-ets-1</sup>

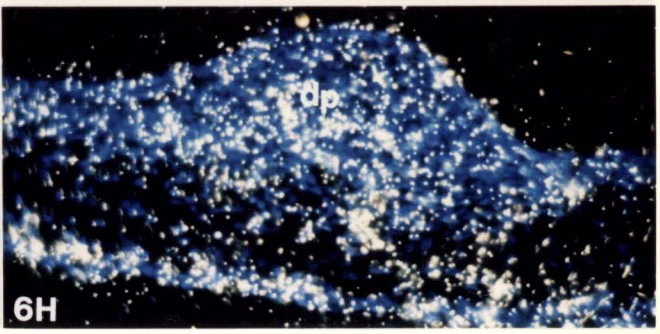
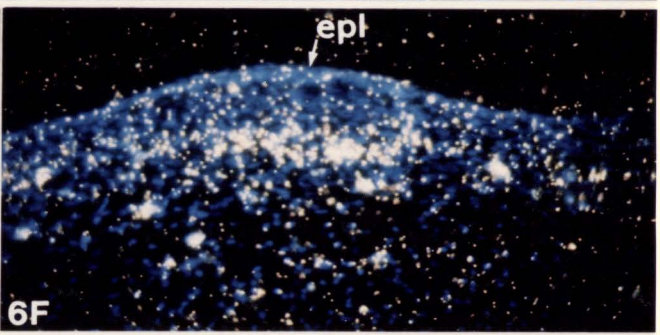
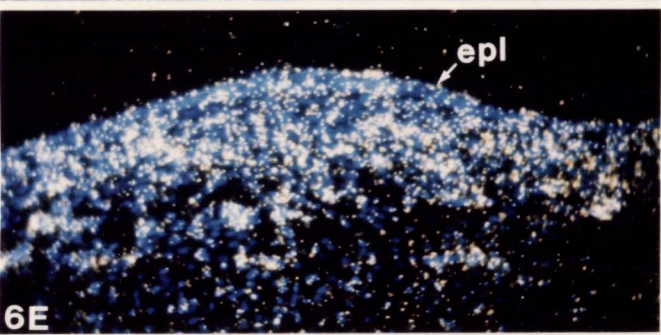
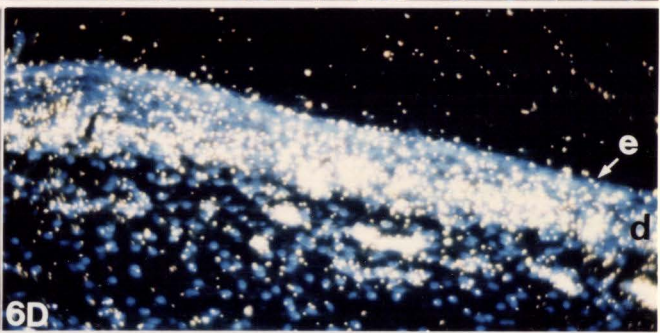
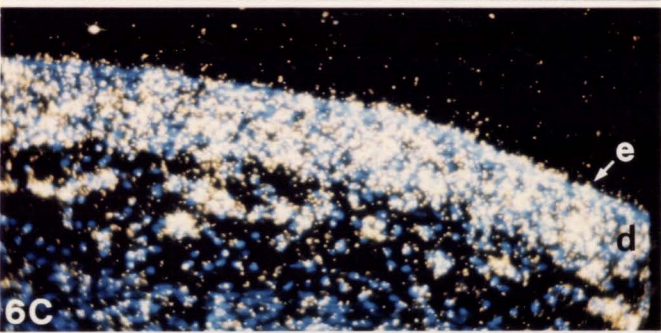
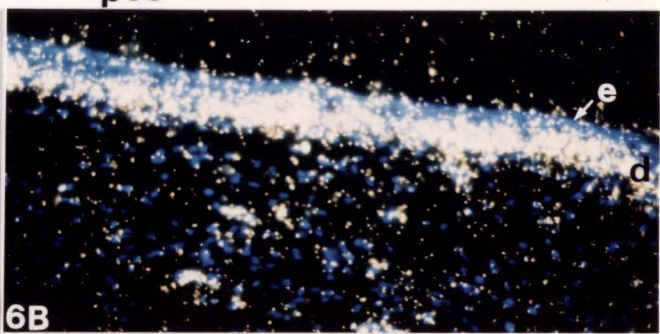






p54<sup>c-ets-1</sup>

p68<sup>c-ets-1</sup>



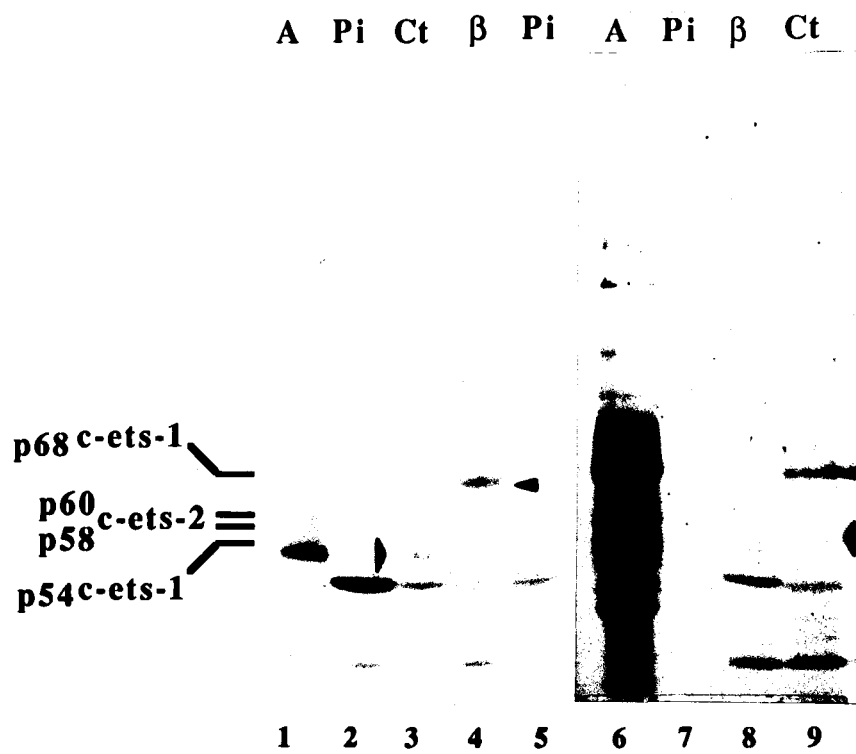
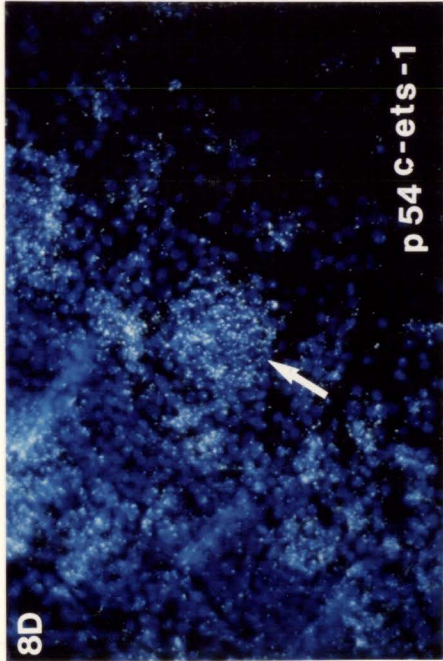
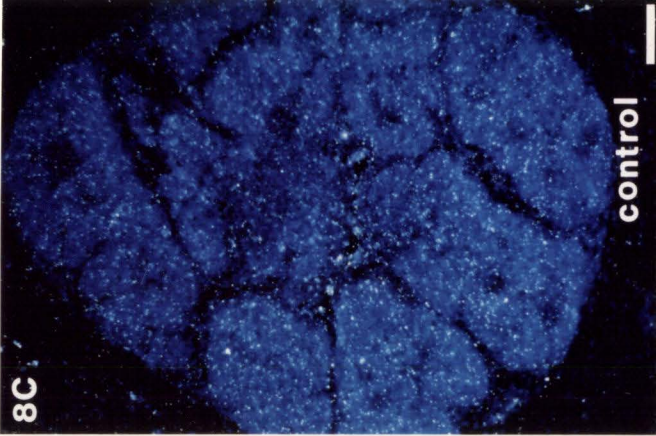
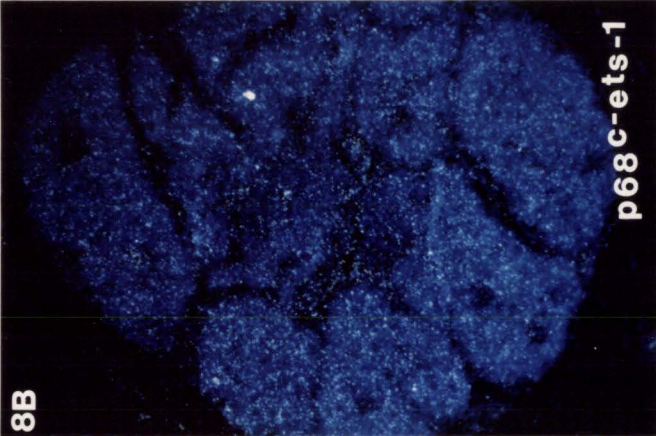
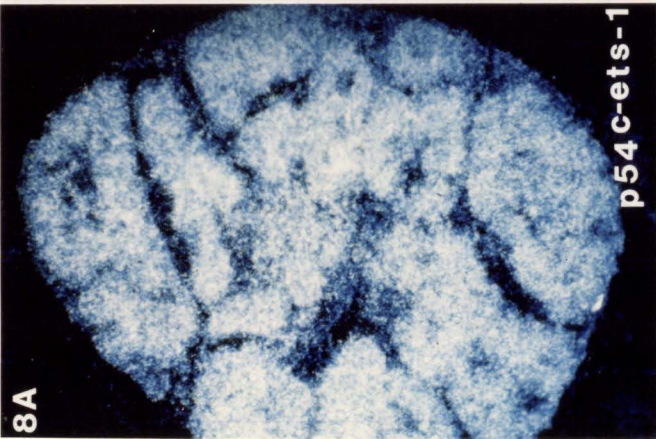


figure 7



## **C- Discussion.**

### **Les cartes d'expression de *c-ets-1* dans l'embryon.**

La description précise de l'expression de la p54<sup>c-ets-1</sup> et de la p68<sup>c-ets-1</sup> lors du développement embryonnaire du poulet a considérablement enrichi l'éventail des situations dans lesquelles ces facteurs de transcription sont susceptibles de jouer un rôle. L'un des points les plus passionnants apporté par cette étude a été l'observation de transcrits *c-ets-1* dans le mésoderme au cours de la gastrulation, c'est à dire au moment où ce feuillet se met à migrer dans la cavité blastocoelienne entre l'ectoderme et l'endoderme. L'expression de *c-ets-1* est restreinte au mésoderme latéral et extraembryonnaire, qui va se différencier en particulier en îlots sanguins (Dieterlen-Lièvre, 1988). Après la gastrulation qui se passe dans la première journée d'incubation après la ponte, les îlots sanguins, où se différencient les premiers érythrocytes et l'endothélium des vaisseaux sanguins, dans l'aire extraembryonnaire sont marqués par la sonde *c-ets-1* de 750pb qui reconnaît les transcrits codant la p54<sup>c-ets-1</sup> et la p68<sup>c-ets-1</sup>. Dans l'aire pellucide, où se forme l'embryon proprement dit, les transcrits *c-ets-1* sont détectés en particulier dans le sclérotome présomptif, la partie ventrale des somites, qui va donner les vertèbres. Il s'agit ici du seul cas où nous ayons pu détecter *c-ets-1* dans un épithélium. L'expression de *c-ets-1* précède de quelques heures la dissociation de l'épithélium somitique et la migration des cellules du sclérotome. Un signal plus faible est également observé sur les cellules de crêtes neurales qui se détachent du tube neural et qui commencent à migrer. Ces cellules sont les seules qui n'appartiennent pas à la lignée mésodermique, où nous ayons détecté *c-ets-1*. La présence des transcrits codant la p54<sup>c-ets-1</sup> et la p68<sup>c-ets-1</sup> a été démontrée à ces stades précoces par la technique de RT-PCR. Leur distribution a été étudiée par hybridation *in situ* lors de la mise en place des organes, de E3 à E6. Nous avons retrouvé les caractéristiques précédemment décrites de l'expression *c-ets-1* (Vandenbunder et al., 1989; Desbiens et al., 1991).

Un signal intense est observé avec les sondes spécifiques des transcrits codant la p54<sup>c-ets-1</sup> et la p68<sup>c-ets-1</sup> dans l'endothélium des vaisseaux sanguins, qu'ils se forment par vasculogénèse (assemblage de cellules endothéliales qui se différencient *in situ*) ou par angiogénèse (bourgeonnement à partir de vaisseaux préexistants) (Pardanaud et al, 1989). La détection des protéines p54<sup>c-ets-1</sup> et p68<sup>c-ets-1</sup> dans le foie à E6, où seules les cellules endothéliales sont positives, indique que les transcrits détectés par hybridation *in situ* sont effectivement traduits. Tout au long de l'étape d'organogénèse, les transcrits p54<sup>c-ets-1</sup> et p68<sup>c-ets-1</sup> sont détectés dans les cellules mésenchymateuses qui interagissent avec un épithélium, qui peut être d'origine endodermique (gésier, intestin), ectodermique (peau, bourgeon de membres) ou mésodermique (rein).

L'expression de *c-ets-1* est transiente et étroitement associée aux tissus d'origine mésodermique qui s'organisent. Trois types de phénomènes peuvent résumer l'expression de *c-ets-1* lors de ces premières étapes du développement. Le premier est la transition épithélium-mésenchyme. Le somite à E2 ou les crêtes neurales en sont de bons exemples. Le second de ces processus est représenté par les interactions épithélium-mésenchyme, qui sont requises pour une morphogenèse correcte de l'épithélium. La troisième situation où nous détectons *c-ets-1*, implique la migration des cellules; elle est en particulier illustrée par les cellules endothéliales.

L'étude de tissus adultes par northern blot et par immunoprécipitation avait essentiellement révélé une expression de *c-ets-1* dans les lignées lymphoïdes B et T (Chen et al., 1985; Ghysdael et al., 1986a; Pognonec, 1988; Bhat et al., 1989). Dans ces cellules, les ARNm codant la *p68<sup>c-ets-1</sup>* n'ont pas été détectés avec les techniques sensibles que nous avons employées, ce qui confirme les travaux précédents (Leprince et al., 1988, 1990). Dans les tissus mésodermiques en réorganisation, le signal obtenu avec la sonde spécifique des transcrits *p68<sup>c-ets-1</sup>* est restreint à une sous-population de cellules, uniformément distribuées parmi les cellules qui expriment la *p54<sup>c-ets-1</sup>*. Alors que la *p68<sup>c-ets-1</sup>* était considérée après sa première description, comme un produit mineur du locus *c-ets-1*, spécifique de la rate (Leprince et al., 1988; 1990), nous avons démontré qu'elle est en fait exprimée dans une grande variété de cellules mésodermiques. La faible représentation de la *p68<sup>c-ets-1</sup>*, estimée par northern blot et par immunoprécipitation est imputable à un faible pourcentage de cellules qui l'exprime. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer cette carte d'expression intéressante. Il est possible par exemple que la transcription à partir du promoteur spécifique de la *p68<sup>c-ets-1</sup>* soit stimulée par de plus fortes concentrations de signaux inducteurs en provenance des épithéliums, ou que ce promoteur et celui qui guide la synthèse de la *p54<sup>c-ets-1</sup>* répondent avec des cinétiques différentes. La synthèse des messagers codant la *p68<sup>c-ets-1</sup>* pourrait être spécifiquement induite au cours de l'une des phases du cycle cellulaire. Pour tester ces hypothèses, il faudra mettre au point des systèmes cellulaires qui reproduisent *in vitro* les observations faites *in vivo*.

Il est important de souligner ici l'apport de la technique d'hybridation *in situ* dans l'étude de l'expression des produits d'épissage alternatif. Dans la plupart des cas, un examen au niveau cellulaire révèle des différences importantes entre les quantités d'ARNm du gène considéré d'une cellule à l'autre. L'interprétation des données obtenues par des méthodes "globalisatrices" comme le northern blot et la RT-PCR doit donc être conduite avec précaution. Ainsi, lorsque Mumberg et coll.(1991) et Nakabeppu et Nathans (1991) décrivent un niveau égal d'expression pour FosB et la protéine antagoniste  $\Delta$ FosB, on ne peut pas prévoir quelle va être la balance de ces deux formes dans chacune des cellules. Nous montrons ici que le faible niveau d'expression de la *p68<sup>c-ets-1</sup>* ne signifie pas que la quantité de *p68<sup>c-ets-1</sup>* dans une cellule soit négligeable. Si leur traduction n'est pas régulée de manière différente, on peut penser que la *p68<sup>c-ets-1</sup>* soit en quantité suffisante pour

entrer en compétition avec la p54<sup>c-ets-1</sup>. La compétition peut jouer pour des gènes cibles, puisque la p54<sup>c-ets-1</sup> et la p68<sup>c-ets-1</sup> fixent des séquences identiques, ou pour d'éventuels cofacteurs puisque ces deux protéines ont des domaines régulateurs de la transcription communs. Cependant, le domaine transactivateur spécifique de la p68<sup>c-ets-1</sup> codé par les exons  $\alpha$  et  $\beta$  pourrait lui permettre d'interagir avec des partenaires spécifiques, ce qui modifierait son activité.

### Les gènes cibles de c-ets-1.

L'expression différentielle des transcrits c-ets-1 pourrait ainsi signifier que les protéines ont des fonctions différentes dans les cellules lymphoïdes et non-lymphoïdes. La dualité de ces rôles est reflétée dans les gènes cibles de c-Ets-1 isolés jusqu'à présent. Des sites de fixation des protéines Ets ont été trouvés dans les éléments régulateurs de nombreux gènes exprimés spécifiquement dans les cellules lymphoïdes (Ho et al., 1990; Grant et al., 1992; Leiden et al., 1992; Prosser et al., 1992). Peu d'entre eux ont été testés en cotransfection avec un vecteur exprimant c-Ets-1. Cependant, les quelques résultats obtenus sont surprenants puisque aucun de ces gènes lymphoïdes n'est transactivé par c-Ets-1 dans les conditions utilisées par les auteurs de ces travaux. c-Ets-1 n'a pas d'effet sur la promoteur du gène *mb-1* (mais ne se fixe que faiblement sur ce site), ou sur l'enhancer du gène CD2 (Hagman et Grosschedl, 1992; Prosser et al., 1992). De plus, la p54<sup>c-ets-1</sup> réprime l'expression du gène de la chaîne  $\beta$  du récepteur des cellules T (Prosser et al., 1992). Le rôle de c-Ets-1 dans les cellules lymphoïdes reste donc obscur. Sa définition sera d'autant plus délicate que de nombreux membres de la famille ETS sont exprimés dans ces lignées (Pognonec, 1988; Bhat et al., 1989; Leiden, 1992; Thompson et al., 1992). La fonction des protéines c-Ets-1 dépend du contexte cellulaire. Dans les cellules Hela, la p54<sup>c-ets-1</sup> et la p68<sup>c-ets-1</sup> ont au contraire un effet stimulateur sur la transcription du gène de la stromélysine de rat (Wasylyk et al., 1991). Des sites EBS sont nécessaires à l'activité des promoteurs de la collagénase 1 et de l'activateur du plasminogène de type urokinase (uPA) (Gutman et Wasylyk, 1990; Rorth et al., 1990; Nerlow et al., 1991; Wasylyk et al., 1992). Le fait que les protéines c-Ets-1 puissent participer à la régulation de l'expression d'enzymes responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire est très intéressant puisque tous les processus où nous avons détecté les transcrits c-ets-1, transition, interaction épithélium-mésenchyme et vascularisation nécessitent un remodelage de la matrice extracellulaire. On peut également établir un parallèle entre l'expression de c-ets-1 dans l'embryon et dans les carcinomes humains (Quéva et al., soumis; Wernert et al., 1992). Dans les deux cas, les cellules épithéliales, normales ou tumorales sont négatives. Les fibroblastes et les cellules endothéliales à proximité des épithéliums expriment par contre c-ets-1. Les fibroblastes, en modulant la concentration des différents composants de la matrice, ou en libérant des facteurs de croissance, vont permettre le développement harmonieux des tissus épithéliaux dans l'embryon (pour revues, Thiery, 1989; Gumbiner et al., 1992) ou créer un

environnement permissif pour la prolifération anarchique des cellules tumorales. Le rôle des capillaires va être dans ces deux situations d'apporter nutriments et oxygène, et aussi parfois de véhiculer les cellules qui vont métastaser.

Ce modèle est encore largement spéculatif. D'abord, il n'existe pas d'évidence que les protéines c-Ets-1 soient effectivement traduites dans ces cellules *in vivo*, encore moins qu'elles soient sous une forme active, par exemple nucléaires et non-phosphorylées. De plus, il est évident que c-Ets-1 ne participe pas seul à la régulation des enzymes qui dégradent la matrice extracellulaire. Des sites pour d'autres facteurs de transcription, comme AP1, ont été décrits dans les séquences régulatrices de ces gènes. *In vivo*, une corrélation entre l'expression de c-ets-1, de la stromélysine ou de la collagénase 1 n'est pas toujours observée, indiquant une régulation multifactorielle de ces enzymes (Desbiens, Raes, et Wernert, communication personnelle). Il faut de plus se méfier des tendances trop simplificatrices et trop restrictives. Les processus menant à l'édification des organes et à leur vascularisation impliquent une profonde réorganisation de la matrice extracellulaire, et donc un subtil équilibre entre dégradation et néo-synthèse. Les cellules fibroblastiques ou endothéliales doivent rompre en quelque sorte les contacts avec leur ancienne matrice, mais aussi en établir de nouveaux avec les nouvelles molécules qui l'entourent. c-ets-1 pourrait donc jouer un rôle plus large que celui proposé initialement, et être un des éléments qui contrôlent l'interaction de la cellule avec son environnement. A cet égard, il est intéressant de noter que les protéines c-Ets-1 transactivent le promoteur de l'intégrine  $\alpha 4$  en tests de cotransfection (K. MacLeod, communication personnelle), ce qui indique que les protéines Ets pourraient réguler l'expression de protéines d'adhésion cellulaire. L'influence exacte de c-ets-1 dans ces processus ne pourra être discutée qu'après avoir réussi à moduler à son expression, positivement ou négativement, *in vitro* et *in vivo*.

#### c-ets-1 et la différenciation érythroïde.

Pour la première fois, nous avons pu détecter des transcrits codants la p68<sup>c-ets-1</sup>, le progéniteur de v-ets, dans des cellules érythroïdes. Par hybridation *in situ* avec la sonde de 750pb qui hybride avec les transcrits codants la p54<sup>c-ets-1</sup> et la p68<sup>c-ets-1</sup>, un signal positif est observé sur les îlots sanguins à E1 et à E2. La présence plus spécifique de chacun de ces transcrits dans le blastodisque à E1 et dans l'aire extraembryonnaire a été établie par la technique de RT-PCR, indiquant que ces transcrits sont exprimés dans les progéniteurs de la lignée érythroïde primitive. Ces cellules sont libérées dans la circulation à un stade très immature et se différencient dans le flot sanguin de manière synchrone. Dans l'embryon à trois jours d'incubation, les transcrits c-ets-1 sont indétectables dans les érythrocytes primitifs circulants. Le signal c-ets-1, observé dans une population de cellules érythroïdes purifiées du sac vitellin à E3, pourrait être imputable à des progéniteurs érythroïdes de la lignée définitive qui forment à ce stade des îlots sanguins secondaires

(Dardick et Setterfield, 1978). Les cellules de ces îlots sont sequestrées jusqu'à E6 dans le sac vitellin, puis sont libérées dans la circulation en même temps que les érythrocytes définitifs d'origine intraembryonnaire. En parallèle à ces premières vagues d'érythropoïèse vitelline qui se développent à partir de progéniteurs intrinsèques, des cellules souches multipotentes hématopoïétiques, vont émerger dans l'embryon, dans la paroi ventrale de l'aorte (Dieterlen-Lièvre et Martin, 1981; Dieterlen-Lièvre, 1984, 1988). Ces cellules, qui bourgeonnent vers la lumière de l'aorte, sont agrégées contre l'endothélium et il est difficile de déterminer si elles expriment la p54<sup>c-ets-1</sup>. Les transcrits p68<sup>c-ets-1</sup> n'ont pas pu être détectés sur ces cellules. Des progéniteurs provenant de ces îlots para-aortiques vont émigrer vers les futurs organes hématopoïétiques de l'embryon. Ainsi la rate et le sac vitellin vont êtreensemés par des cellules progénitrices de la lignée érythroïde définitive. La p68<sup>c-ets-1</sup> n'est pas exprimée dans les cellules érythroïdes purifiées de ces organes (Quéva et al., soumis; Leprince et al., 1990). Les transcrits codant la p54<sup>c-ets-1</sup> n'ont pas été détectés dans la fraction érythroïde du sac vitellin à E10, mais ils sont, par contre, présents dans la même fraction isolée de la rate à E15. Résoudre cette contradiction nécessiterait une description plus précise de l'expression de *c-ets-1* au cours de la différenciation érythroïde dans ces différents organes.

La détection des transcrits codant la p68<sup>c-ets-1</sup> dans des cellules érythroïdes immatures est très intéressante par rapport aux propriétés transformantes du rétrovirus E26. E26 induit une leucémie mixte érythroïde et myéloïde à prédominance érythroïde dans les poulets infectés (Moscovici et al., 1981; 1983; Radke et al., 1982) *In vivo* et *in vitro*, les cellules transformées par E26 sont des progéniteurs hématopoïétiques immatures qui peuvent se différencier vers les lignées érythroïde, myélo-monocytaire, éosinophilique et basophilique (Domenget et al., 1992; Graf et al., 1992). Il apparaît qu'une coopération entre les deux oncogènes, *v-myb* et *v-ets*, transduits par E26 est nécessaire pour que s'exprime pleinement ses capacités transformantes (Metz et Graf, 1991a, b). *v-myb* et *v-ets* codent des facteurs de transcription et transforment faiblement des cellules érythroïdes. Bien que l'on ne sache pas si leur fonction de régulateurs transcriptionnels soit nécessaire à leur capacité transformante, il est tentant de proposer que chacun de ces facteurs contrôle l'expression d'un ensemble de gènes impliqués dans la transformation cellulaire. En réunissant *v-myb* et *v-ets* dans son génome, on pourrait penser que E26 permette d'additionner les effets des deux facteurs de transcription qui s'expriment ensemble dans les cellules infectées. Il est possible aussi que *v-Myb* et *v-Ets* coopèrent positivement pour transactiver comme c'est le cas par exemple entre *v-Ets* et AP1 (Wasylyk et al., 1990, Wasylyk et Wasylyk, 1992). Expliquer le second niveau de coopération, pourquoi *v-Myb* et *v-Ets* doivent être fusionnés pour induire des leucémies et transformer des cellules multipotentes, est plus spéculatif dans l'état actuel de nos connaissances. Les propriétés de fixation à l'ADN et de transactivation de *v-Myb* et de *v-Ets* pourraient être perturbées par leur fusion dans la P135 $\Delta$ *gag-myb-ets*. Une autre hypothèse séduisante est que la P135 $\Delta$ *gag-myb-ets* fige un complexe entre les protéines *c-Myb* et *c-Ets-1* existant *in vivo*



au cours des premiers stades de la différenciation érythroïde. Par hybridation *in situ* nous avons détecté les transcrits *c-myb* dans le sac vitellin à trois jours d'incubation sur des cellules isolées à proximité des vaisseaux sanguins. Ce résultat a été confirmé par RT-PCR sur des cellules érythroïdes purifiées (Quéva, résultats non publiés). Nous montrons ici que les transcrits codant la p54<sup>c-ets-1</sup> et la p68<sup>c-ets-1</sup> sont détectés dans ces mêmes populations cellulaires. Bien que seules des expériences de double marquage immunocytochimique puissent établir que la p68<sup>c-ets-1</sup> et la p75<sup>c-myb</sup> sont coexprimées dans une même cellule, nous montrons que l'hypothèse d'une interaction transiente entre ces deux facteurs dans un progéniteur hématopoïétique n'est pas absurde. Une telle association n'a pas pu être observé *in vitro* (Lim et al., 1992). Cependant, on peut imaginer que la formation d'un complexe entre la p75<sup>c-myb</sup> et la p68<sup>c-ets-1</sup> dépende du contexte particulier d'une cellule ou d'un promoteur. D'autre part, les interactions entre ces facteurs de transcription doivent être faibles car il serait difficile de dissocier ou de réguler un complexe transcriptionnel dont les membres présentent une affinité ou une spécificité excessive entre eux (Frankel et Kim, 1991). La fusion de deux facteurs de transcription et le manque de flexibilité qui en résulte pourraient perturber le contrôle de l'initiation de la transcription et aboutir éventuellement à une activation oncogénique.

**REFERENCES**

- Abate,C. and R.Curran. (1990).  
Encounters with Fos and Jun on the road to AP-1.  
*Cancer Biol.* **1**, 19-26.
- Abate,C., Luk,D. and T.Curran. (1991).  
Transcriptional regulation by *fos* and *jun* *in vitro* : interaction among multiple activator and regulatory domains.  
*Mol. Cell. Biol.* **11**, 3624-3632.
- Adam,S. and L.Gerace. (1991).  
Cytosolic proteins that specifically bind nuclear location signals are receptors for nuclear import.  
*Cell* **66**, 837-847.
- Albagli,O., Flourens,A., Crépieux,P., Bègue,A., Stéhelin,D. and D.Leprince. (1992).  
Phylogeny of the p68<sup>c-ets-1</sup> amino-terminal transactivating domain reveals some highly conserved structural features.  
*Oncogene* **7**, 1435-1439.
- Alitalo,K., Winqvist,R., Lin,C.C., de la Chapelle,A., Schwab,M. and J.M.Bishop. (1984).  
Aberrant expression of an amplified *c-myb* oncogene in two cell lines from a colon carcinoma.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 4534-4538.
- Alvarez,E., Northwood,I.C., Gonzalez,F.A., Latour,D.A., Seth,A., Abate,C., Curran,T. and R.J.Davis. (1991).  
Pro-Leu-Ser/Thr-Pro is a consensus primary sequence for substrate protein phosphorylation.  
*J.Biol.Chem.* **266**, 15277-15285.
- Amouyel,P., Gégonne,A., Delacourte,A., Défossez,A. and D.Stéhelin. (1988).  
Expression of *ets* proto-oncogenes in astrocytes in human cortex.  
*Brain Res.* **447**, 149-153.
- Amouyel,P., Laudet,V., Martin,P., Li,R., Quatannens,B., Stéhelin,D. and S.Saule. (1989).  
Two nuclear oncogenic proteins, P135<sup>gag-myb-ets</sup> and p61/63<sup>myc</sup> cooperate to induce transformation of chicken neuroretina cells.  
*J. Virol.* **63**, 3382-3388.
- Anfossi,G., Gewirtz,A.M. and B.Calabretta. (1989).  
An oligomer complementary to *c-myb*-encoded mRNA inhibits proliferation of human myeloid leukemia cell lines.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 3379-3383.
- Angel,P., Baumann,I., Stein,B., Delius,H., Rahmsdorf,H.J. and P.Herrlich. (1987).  
12-0-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate induction of the human collagenase gene is mediated by an inducible enhancer element located in the 5'-flanking region.  
*Mol. Cell. Biol.* **7**, 2256-2266.
- Angel,P., Imagawa,M., Chiu,R., Stein,B., Imbra,R.J., Rahmsdorf,H.J., Jonat,C., Herrlich,P. and M.Karin. (1987).  
Phorbol ester-inducible genes contain a common cis-element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor.  
*Cell* **49**, 729-739.
- Angel,P. and M.Karin. (1991).

The role of *jun*, *fos* and the AP1 complex in cell-proliferation and transformation.  
*Biochim. Biophys. Acta* **1072**, 129-157.

Anton, I.A. and J. Frampton. (1988).  
Tryptophans in myb proteins.  
*Nature* **336**, 719.

Ascione, R., Thompson, D.M., Thomas, R., Panayiotakis, A., Ramsay, R., Tymms, M., Kola, I. and A. Seth. (1992).  
Influence of nucleotides flanking the -GGAA- core sequence on *ets1* and *ets2* DNA-binding activity and the mechanism of *ets1* autoregulation.  
*Intern. J. of Onc.* **1**, 631-637.

Aurigemma, R.E., Blair, D.G. and S.K. Ruscetti. (1992).  
Transactivation of Erythroid transcription factor GATA-1 by a *myb-ets*-containing retrovirus.  
*J. Virol.* **66**, 3056-3061.

Auwerx, J. and P. Sassone-Corsi. (1991).  
IP-1 : a dominant inhibitor of *fos/jun* whose activity is modulated by phosphorylation.  
*Cell* **64**, 983-993.

Auwerx, J. and P. Sassone-Corsi. (1992).  
AP-1 (*fos-jun*) regulation by IP-1 : effect of signal transduction pathways and cell growth.  
*Oncogene* **7**, 2271-2280.

Bading, H., Hansen, J. and K. Moelling. (1987).  
Selective DNA binding of the human cellular *myb* protein isolated by immuno affinity chromatography using a monoclonal antibody.  
*Oncogene* **1**, 395-401.

Bading, H., Gerdes, J., Schwarting, R., Stein, H. and K. Moelling. (1988).  
Nuclear and cytoplasmic distribution of cellular *myb* protein in human haematopoietic cells evidenced by monoclonal antibody.  
*Oncogene* **3**, 257-265.

Bading, H., Beutler, C. and K. Moelling. (1989).  
Mapping of a small phosphopeptide at the carboxyterminus of the viral *myb* protein by monoclonal antibodies.  
*Oncogene* **4**, 33-38.

Baichwal, V.R. and R. Tjian. (1990).  
Control of *c-jun* activity by interaction of a cell-specific inhibitor with regulatory domain  $\delta$  : differences between v- and *c-jun*.  
*Cell* **63**, 815-825.

Barletta, C., Pelicci, P-G., Kenyon, L.C., Smith, S.D. and R. Dalla-Favera. (1987).  
Relationship between the *c-myb* locus and the 6q<sup>-</sup> chromosomal aberration in leukemias and lymphomas.  
*Science* **235**, 1064-1067.

Basset-Séguin, N., Escot, C., Blanchard, J-M., Kerai, C., Verrier, B., Mion, H. and J-J. Guilhou. (1990).  
High levels of *c-fos* proto-oncogene expression in normal human adult skin.  
*J. Invest. Derm.* **94**, 418-422.

- Beato, M. (1989).  
Gene regulation by steroid hormones.  
*Cell* **56**, 335-344.
- Benbrook, D.M. and N.C. Jones. (1990).  
Heterodimer formation between CREB and *jun* proteins.  
*Oncogene* **5**, 295-302.
- Ben-David, Y. and A. Bernstein. (1991).  
Friend virus-induced erythroleukemia and the multistage nature of cancer.  
*Cell* **66**, 831-834.
- Bender, T.P. and W.M. Kuehl. (1986a).  
Murine *myb* protooncogene mRNA : cDNA sequence and evidence for 5' heterogeneity.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 3204-3208.
- Bender, T.P. and W.M. Kuehl. (1986b).  
Structure and expression of *c-myb* protooncogene mRNA in murine B-cells.  
*Microbiology and Immunology* **132**, 153-158.
- Bender, T.P. and W.M. Kuehl. (1987).  
Differential expression of the *c-myb* proto-oncogene marks the pre-B cells/B cell junction in murine B lymphoid tumors.  
*J. Immunol.* **139**, 3822-3827.
- Bender, T.P., Thompson, C.B. and W.M. Kuehl. (1987).  
Differential expression of *c-myb* mRNA in murine B lymphomas by a block to transcription elongation.  
*Science* **237**, 1473-1476.
- Bentley, D.L. and M. Groudine. (1988).  
Sequence requirements for premature termination of transcription in the human *c-myc* gene.  
*Cell* **53**, 245-256.
- Berberich, S.J. and M.D. Cole. (1992).  
Casein kinase II inhibits the DNA-binding activity of Max homodimers but not *myc/max* heterodimers.  
*Genes and Dev.* **6**, 166-176.
- Beug, H., Hayman, M.J. and T. Graf. (1982).  
Myeloblasts transformed by the avian leukemia virus E26 are hormone-dependent for growth and for the expression of a putative *myb*-containing protein p135 E26.  
*The EMBO J.* **1**, 1069-1073.
- Beug, H., Leutz, A., Kahn, P. and T. Graf. (1984).  
Ts mutants of E26 leukemia virus allow transformed myeloblasts, but not erythroblasts or fibroblasts, to differentiate at the nonpermissive temperature.  
*Cell* **39**, 579-588.
- Beug, H., Blundell, P. and T. Graf. (1987).  
Reversibility of differentiation and proliferative capacity in avian myelomonocytic cells transformed by tsE26 leukemia virus.  
*Genes Dev.* **1**, 277-286.

- Bhat,N.K., Fisher,R.J., Fujiwara,S., Ascione,R. and T.S.Papas. (1987).  
Temporal and tissue-specific expression of mouse *ets* genes.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 3161-3165.
- Bhat,N.K., Komschlies,K.L., Fujiwara,S., Fisher,R.J., Mathieson,B.J., Gegorio,T.A.,  
Yound,H.A., Kasik,J.W., Ozato,K. and T.S.Papas. (1989).  
Expression of *ets* genes in mouse thymocyte subsets and T cells.  
*J. Immun.* **142**, 672-678.
- Bhat,N.K., Thompson,C.B., Lindsten,T., June,C.H., Fujiwara,S., Koizumi,S., Fisher,R.J.  
and T.S.Papas. (1990).  
Reciprocal expression of human *ets1* and *ets2* genes during T-cell activation : Regulatory role for  
the protooncogene *ets1*.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 3723-3727.
- Biedenkapp,H., Borgmeyer,U., Sippel,A.E. and K-H.Klempnauer. (1988).  
Viral *myb* oncogene encodes a sequence specific DNA binding activity.  
*Nature* **335**, 835-837.
- Biesalski,H.K., Doepner,G., Tzimas,G., Gamulin,V., Schröder,H.C., Batel,R., Nau,H. and  
W.E.G.Müller. (1992).  
Modulation of *myb* gene expression in sponges by retinoic acid.  
*Oncogene* **7**, 1765-1774.
- Bird,A. (1992).  
The essentials of DNA methylation.  
*Cell* **70**, 5-8.
- Bister,K., Nunn,M., Moscovici,C., Perbal,B., Baluda,M.A. and P.H.Duesberg. (1982).  
Acute leukemia viruses E26 and avian myeloblastosis virus have related transformation-specific  
RNA sequences, but different genetic structures, gene products and oncogenic properties.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 3677-3681.
- Blanchard,J-M. (1992).  
Le proto-oncogène *c-fos* : un "entremetteur" moléculaire.  
*Médecine et Sciences* **8**, 455-470.
- Blank,V., Kourilsky,P. and A.Israël.  
NF- $\kappa$ B and related proteins : Rel/dorsal homologies meet ankyrin-like repeats.  
*TIBS* **17**, 135-140.
- Boise,L.H., Gorse,K.M. and E.H.Westin. (1992).  
Multiple mechanisms of regulation of the human *c-myb* gene during myelomonocytic  
differentiation.  
*Oncogene* **7**, 1817-1825.
- Bortner,D.M. and M.C.Ostrowski. (1991).  
Analysis of the *v-myb* structural components important for transactivation of gene expression.  
*Nucleic Acids. Res.* **19**, 1533-1539.
- Bosselut,R., Duvall,J.F., Gégonne,A., Bailly,M., Hémar,A., Brady,J. and J.Ghysdael. (1990).  
The product of the *c-ets-1* proto-oncogene and the related *Ets2* protein act as transcriptional  
activators of the long terminal repeat of human T cell leukemia virus HTLV-1.

*EMBO J.* **9**, 3315-3322.

Boulukos, K.E., Pognonec, P., Galibert, F., Gesquière, J.C., Stéhelin, D. and J.Ghysdael. (1988).

Identification in chickens of an evolutionarily conserved cellular *ets-2* gene (*c-ets-2*) encoding nuclear proteins related to the products of the *c-ets* proto-oncogene.  
*The EMBO J.* **7**, 697-705.

Boulukos, K.E., Pognonec, P., Rabault, B., Begue, A. and J.Ghysdael. (1989).

Definition of an *ets1* protein domain required for nuclear localization in cells and DNA-binding activity *in vitro*.  
*Molec. cell. Biol.* **9**, 5718-5721.

Boulukos, K.E., Pognonec, P., Sariban, E., Bailly, M., Christian Lagrou and J.Ghysdael. (1990).  
Rapid and transient expression of *ets2* in mature macrophages following stimulation with cMGF, LPS, and PKC activators.

*Genes and Dev.* **4**, 401-409.

Boyle, W.J., Lampert, M.A., Lipsick, J.S. and M.A.Baluda (1984).

Avian myeloblastosis virus and E26 virus oncogene products are nuclear proteins.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 4265-4269.

Boyle, W.J., Lampert, M.A., Li, A.C. and M.A.Baluda. (1985).

Nuclear compartmentalization of the *v-myb* oncogene product.  
*Mol. Cell. Biol.* **5**, 3017-3023.

Boyle, W.J., Lipsick, J.S. and M.A.Baluda. (1986).

Antibodies to the evolutionarily conserved amino-terminal region of the *v-myb*-encoded protein the *c-myb* protein in widely divergent metazoan species.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 4685-4689.

Boyle, W.J. and M.A.Baluda. (1987).

Subnuclear associations of the *v-myb* oncogene product and actin are dependent on ionic strength during nuclear isolation.

*Mol. Cell. Biol.* **7**, 3345-3348.

Brenner, D.A., O'Hara, M., Angel, P., Chojkier, M. and M.Karin. (1989).

Prolonged activation of *jun* and collagenase genes by tumour necrosis factor- $\alpha$ .  
*Nature* **337**, 661-663.

Brown, K.E., Kindy, M.S. and G.E.Sonenshein. (1992).

Expression of the *c-myb* proto-oncogene in bovine vascular smooth muscle cells.  
*J. Biol. Chem.* **267**, 4625-4630.

Burk, O. and K-H.Klempnauer. (1991).

Estrogen-dependent alterations in differentiation state of myeloid cells caused by a *v-myb*/estrogen receptor.

*The EMBO J.* **10**, 3713-3719.

Caubet, J-F. (1989).

*c-fos* proto-oncogene expression in the nervous system during mouse development.  
*Mol. Cell. Biol.* **9**, 2269-2272.

Chen, J.H. (1985).

The proto-oncogene *c-ets-1* is preferentially expressed in lymphoid cells.  
*Molec. cell. Biol.* **5**, 2993-3000.

Chen,Z-Q., Kan,N.C., Pribyl,L., Lautenberger,J.A., Moudrianakis,E. and T.S.Papas. (1988).  
Molecular cloning of the *ets* proto-oncogene of the sea urchin and analysis of its developmental expression.  
*Dev. Biol.* **125**, 432-440.

Chen,J.H. (1990).  
Cloning, sequencing, and expression of mouse *c-ets-1* cDNA in baculovirus expression system.  
*Onc. Res.* **5**, 277-285.

Chen,J.H.  
Negative regulatory elements in the human ETS1 gene promoter.  
*Oncogene*, sous presse

Chen,Z-Q., Burdett,L.A., Seth,A.K., Lautenberger,J.A. and T.S.Papas. (1990).  
Requirement of *ets-2* expression for xenopus oocyte maturation.  
*Science* **250**, 1416-1418.

Chiu,R., Boyle,W.J., Meek,J., Smeal,T., Hunter,T. and M.Karin. (1988).  
The *c-fos* protein interacts with *c-jun*/Ap-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes.  
*Cell* **54**, 541-552.

Chiu,R., Angel,P. and M.Karin. (1989).  
*Jun-B* differs in its biological properties from, and is a negative regulator of, *c-jun*.  
*Cell* **59**, 979-986.

Citro,G., Perrotti,D., Cucco,C., D'Agnano,I., Sacchi,A., Zupi,G. and B.Calabretta. (1992).  
Inhibition of leukemia cell proliferation by receptor-mediated uptake of *c-myb* antisense oligodeoxynucleotides.  
*Proc. Natl. Acad.Sci. USA* **89**, 7031-7035.

Clarke,M.F., Kukowska-Latallo,J.S., Westin,E., Smith,M. and E.V.Prochownik. (1988).  
Constitutive expression of a *c-myb* cDNA blocks Friend murine erythroleukemia cell differentiation.  
*Mol. Cell. Biol.* **8**, 884-892.

Cleary,M.L. (1991).  
Oncogenic conversion of transcription factors by chromosomal translocations.  
*Cell* **66**, 619-622.

Cocquerelle,C., Daubersies,P., Majérus,M-A., Kerckaert,J-P. and B.Bailleul. (1992).  
Splicing with inverted order of exons occurs proximal to large introns.  
*The EMBO J.* **11**, 1095-1098.

Cohen,D.R. and R.Curran. (1988).  
*fra-1* : a serum-inducible, cellular immediate-early gene that encodes a *fos*-related antigen.  
*Mol. Cell. Biol.* **8**, 2063-2069.

Cohen,D.R., Ferreira,P.C.P., Gentz,R., Franza,B.R.,Jr and T.Curran. (1989).  
The product of a *fos*-related gene, *fra-1*, binds cooperatively to the AP-1 site with *jun* :  
transcription factor AP-1 is comprised of multiple protein complexes.  
*Genes and Dev.* **3**, 173-184.



- Coll,J., Saule,S., Martin,P., Raes,M.B., Lagrou,C., Graf,T., Beug,H., Simon,I.E. and D.Stéhelin (1983).  
The cellular oncogenes *c-myc*, *c-myb* and *c-erb* are transcribed in defined types of avian hematopoietic cells.  
*Exp. Cell. Res.* **149**, 151-162.
- Couture,C. and E.Potworowski. (1992).  
Le thymus : un réseau complexe de signalisation intercellulaire.  
*Médecine/Sciences* **8**, 572-576.
- Crabtree,G.R. (1989).  
Contingent genetic regulatory events in T lymphocyte activation.  
*Science* **243**, 355-361.
- Craig,R.W. and A.Block. (1984).  
Early decline in *c-myb* oncogene expression in the differentiation of human myeloblastic leukemia (ML-1) cells induced with 12-O-tetradécanoylphorbol-13-acetate.  
*Cancer Res.* **44**, 442-446.
- Cress,W.D. and S.J.Triezenberg. (1991).  
Critical structural elements of the VP16 transcriptional activation domain.  
*Science* , 87-90.
- Curran,T. and N.M.Teich (1982).  
Candidate product of the FBJ-murine osteosarcoma virus oncogene : characterization of a 55.000 dalton phosphoprotein.  
*J. Virol.* **42** : 114-122.
- Curran,T., Miller A.D., Zokas,L. and I.M.Verma. (1984).  
Viral and cellular fos proteins : a comparative analysis.  
*Cell* **36**, 259-268.
- Curran,T., van Beveren,C., Ling,N. and M.Verma. (1985).  
Viral and cellular fos proteins are complexed with a 39,000-dalton cellular protein.  
*Mol. Cell. Biol.* **5**, 167-172.
- Dalton,S. and R.Treisman. (1992).  
Characterization of SAP-1, a protein recruited by serum response factor to the *c-fos* serum response element.  
*Cell* **68**, 567-612.
- Danish,R., El-Awar,O., Weber,B.L., Langmore,J., Turka,L.A., Ryan,J.J. and Clarke,M.F. (1992).  
*c-myb* effects on kinetic events during MEL cell differentiation.  
*Oncogene* **7**, 901-907.
- Dardick,I. and G.Setterfield. (1978).  
Early origins of definitive erythroid cells in the chick embryo.  
*Tissue and Cell* **10**, 355-364.
- Dasgupta,P. and E.P.Reddy. (1989).  
Identification of alternatively spliced transcripts for human *c-myb* : molecular cloning and sequence analysis of human *c-myb* exon 9A sequences.

*Oncogene* **4**, 1419-1423.

Dasgupta,P., Saikumar,P., Reddy,C.D. and E.P.Reddy. (1990).

Myb protein binds to human immunodeficiency virus 1 long terminal repeat (LTR) sequences and transactivates LTR-mediated transcription.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 8090-8094.

Delattre,O., Zucman,J., Plougastel,B., Desmaze,C., Melot,T., Peter,M., Kovar,H., Joubert,I., de Jong,P., Rouleau,G. Aurias,A. and G.Thomas. (1992).

Gene fusion with an *ets* DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours.

*Nature* **359**, 162-165.

Desbiens,X., Quéva,C., Jaffredo,T., Stéhelin,D. and B.Vandenbunder. (1991).

The relationship between cell proliferation and the transcription of the nuclear oncogenes *c-myc*, *c-myb* and *c-ets-1* during feather morphogenesis in the chick embryo.

*Development* **111**, 699-713.

Desbois,C., Aubert,D., Legrand,C., Pain,B. and J.Samarut. (1991).

A novel mechanism of action for *v-erbA* : abrogation of the inactivation of transcription factor AP-1 by retinoic acid and thyroid hormone receptors.

*Cell* **67**, 731-740.

De Taisnes,C., Gégonne,A. Stéhelin,D., Bernheim,A. and R.Berger (1984).

Chromosomal localization of the human proto-oncogene *c-ets*.

*Nature* **310**, 581-583.

Dexter,T.M., Spooncer,E., Simmono,P. and T.D.Allen (1984).

Long-term marrow cultures. An overview of techniques and experience.

In "Long-term, Bone Marrow Culture, ed D.G.Wright, J.S.Greenberger, pp 57-96. New York : Liss.

Diamond,M.I., Miner,J.N., Yoshinaga,S.K. and K.R.Yamamoto. (1990).

Transcription factor interactions : selectors of positive or negative regulation from a single DNA element.

*Science* **249**, 1266-1272.

Dieterlen-Lièvre,F. and C.Martin. (1981).

Diffuse intraembryonic hemopoiesis in normal and chimeric avian development.

*Dev. Biol.* **88**, 180-191.

Dieterlen-Lièvre,F. (1984).

Emergence of intraembryonic blood stem cells in avian chimeras by means of monoclonal antibodies.

*Dev. Comp. Immunol.Suppl.* **3**, 75-80.

Dieterlen-Lièvre,F. (1988).

Birds. In "Vertebrate blood cells" Rowley A.F. and N.A.Ratchiffe. eds, Cambridge University Press.

Domenget,C., Leprince,D., Pain,B., Peyrol,S, Li,R.P., Stéhelin,D., Samarut,J. and Jurdic,P. (1992).

The various domains of *v-myb* and *v-ets* oncogenes of E26 retrovirus contribute differently, but cooperatively, in transformation of hematopoietic lineages.

*Oncogene* **7**, 2231-2241.

Dony, C. and P. Gruss. (1987).

Proto-oncogene *c-fos* expression in growth regions of fetal bone and mesodermal web tissue.  
*Nature* **328**, 711-714.

Dudek, H. and E.P. Reddy. (1989).

Identification of two translational products for *c-myb*.  
*Oncogene* **4**, 1061-1066.

Dudek, H., Tantravahi, R.V., Rao, V.N., Reddy, E.S.P. and E.P. Reddy. (1992).

Myb and Ets proteins cooperate in transcriptional activation of the *mim-1* promoter.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 1291-1295.

Duprey, S.P. and D. Boettiger. (1985).

Developmental regulation of *c-myb* in normal myeloid progenitor cells.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 6937-6941.

Durban, E.M. and D. Boettiger. (1981).

Differential effects of transforming avian RNA tumor viruses on avian macrophages.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 3600-3604.

Duterque-Coquillaud, M., Leprince, D., Flourens, A., Henry, C., Ghysdael, J., Debuire, B. and D. Stéhelin. (1988).

Cloning and expression of chicken p54<sup>c-ets</sup> cDNAs : the first p54<sup>c-ets</sup> coding exon is located into the 40,0kbp genomic domain unrelated to *v-ets*.  
*Oncogene Res.* **2**, 335-344.

Dvorak, M., Urbanek, P., Bartunek, P., Paces, V., Vlach, J., Pecenka, V., Arnold, L., Travnicek, M. and J. Riman. (1989).

Transcription of the chicken *myb* proto-oncogene starts within a CpG island.  
*Nucl. Acid. Res.* **17**,

Dyson, P.J., Poirier, F. and R.J. Watson. (1989).

Expression of *c-myb* in embryonal carcinoma cells and embryonal stem cells.  
*Differentiation* **42**, 24-27.

Evans, J.L., Boyle, W.J. and J.P.-Y. Ting. (1987).

Molecular basis of elevated *c-myb* expression in the abnormal L3T4<sup>-</sup>, Lyt-2<sup>-</sup> T lymphocytes of autoimmune mice.  
*J. Immunol.* **139**, 3497-3505.

Evans, J.L., Moore, T.L., Kuehl, W.M., Bender, T. and J.P.-Y. Ting. (1990).

Functional analysis of c-Myb protein in T-lymphocytic cell lines shows that it *trans*-activates the *c-myc* promoter.  
*Mol. Cell. Biol.* **10**, 5747-5752.

Faisst, S. and S. Meyer. (1992).

Compilation of vertebrate-encoded transcription factors.  
*Nuc. Acids. Res.* **20**, 3-26.

Fisher, C., Byers, M.R., Iadarola, M.J. and E.A. Powers. (1991).

Patterns of epithelial expression of fos protein suggest important role in the transition from viable to cornified cell during keratinization.  
*Development* **111**, 253-258.

Fisher,R.J., Mavrothalassitis,G., Kondoh,A. and T.S.Papas. (1991).  
High-affinity DNA-protein interactions of the cellular ETS1 protein : the determination of the ETS binding motif.  
*Oncogene* **6**, 2249-2254.

Fisher,R.J., Koizumi,S., Kondoh,A., Mariano,J.M., Mavrothalassitis,G., Bhat,N.K. and T.S.Papas. (1992).  
Human *ets1* oncoprotein.  
*J. Biol. Chem.* **267**, 17957-17965.

Foos,G., Grimm,S. and K-H.Klempnauer. (1992).  
Functional antagonism between members of the *myb* family : B-myb inhibits v-*myb*-induced gene activation.  
*The EMBO J.* **11**, 4619-4629.

Forman,B.M. and H.H.Samuels.  
Dimerization among nuclear hormone receptors.  
*The New Biol.* **2**, 587-594.

Frampton,J., Leutz,A., Gibson,T.J. and T.Graf. (1989).  
DNA-binding domain ancestry.  
*Nature* **342**, 134.

Frampton,J., Gibson,T.J., Ness,S.A., Döderlein,G. and T.Graf. (1991)  
Proposed structure for the DNA-binding domain of the *Myb* oncoprotein based on model building and mutational analysis.  
*Prot. Eng.* **4**, 891-901.

Frankel,A.D., Bredt,D.S. and C.O.Pabo. (1988).  
*Science* **240**, 70-73.

Frankel,A.D. and P.S.Kim. (1991).  
Modular structure of transcription factors : implications for gene regulation.  
*Cell* **65**, 717-719.

Franza,B.R.Jr, Rauscher III,F.J., Josephs,S.F. and T.Curran. (1988).  
The *fos* complex and *fos*-related antigens recognize sequence elements that contain AP-1 binding sites.  
*Science* **239**, 1150-1153.

Frykberg,L., Metz,T., Brady,G., Introna,M., Beug,H., Vennström,B. and T.Graf (1988).  
A point mutation in the DNA binding domain of the v-*myb* oncogene of E26 virus confers temperature sensitivity for transformation of myelomonocytic cells.  
*Oncogene Res.* **3**, 313-322.

Fujiwara,S., Fisher,R.J., Seth,A., Bhat,N.K., Showalter,S.D., Zweig,M. and T.S.Papas. (1988).  
Characterization and localization of the products of the human homologs of the v-*ets* oncogene.  
*Oncogene* **2**, 99-103.

- Fukuda,M., Ikuma,S., Setoyama,C. and K.Shimada. (1987).  
Decrease in the *c-myb* gene transcript during differentiation of mouse tetatocarcinoma stem cells.  
*Biochem. Int.* **15**, 73-79.
- Furukawa,Y., Piwnica-Worms,H., Ernst,T.J., Kanakura,Y. and J.D.Griffin. (1990).  
*cdc2* gene expression at the G1 to S transition in human T lymphocytes.  
*Science* **250**, 805-808.
- Gabrielsen,O., Sentenac,A. and P.Fromagoet. (1991).  
Specific DNA binding by *c-myb* : evidence for a double Helix-turn-helix-related motif.  
*Science* **253**, 1140-1143.
- Garcia,A., LaMontagne,K., Reavis,D., Stober-Grässer,U. and J.S.Lipsick. (1991).  
Determinants of sequence-specific DNA-binding by p48<sup>v-myb</sup>.  
*Oncogene* **6**, 265-273.
- Garrido,C., Grässer,F., Lipsick,J.S., Stéhelin,D. and S.Saule. (1992a).  
Protein truncation is not required for *c-myb* proto-oncogene activity in neuroretina cells.  
*J. Virol.* **66**, 6773-6776
- Garrido,C., Leprince,D., Lipsick,J.S., Stéhelin,D., Gospodarowicz,D. and S.Saule. (1992b).  
Definition of functional domains in P135<sup>gag-myb-ets</sup> and p48<sup>v-myb</sup> proteins required to maintain the response of neuroretina cells to basic fibroblast growth factor.  
*J. Virol.* **66**, 160-166.
- Gaub,M-P., Bellard,M., Scheuer,I., Chambon,P. and P.Sassone-Corsi. (1990).  
Activation of the ovalbumin gene by the estrogen receptor involves the *fos-jun* complex.  
*Cell* **63**, 1267-1276.
- Gégonne,A., Leprince,D., Duterque-Coquillaud,M., Vandebunder,B., Flourens,A., Ghysdael,J., Debuire,B. and D.Stéhelin. (1987a).  
Multiple domains for the chicken cellular sequences homologous to the *v-ets* oncogene of the E26 retrovirus.  
*Mol. Cell. Biol.* **7**, 806-812.
- Gégonne,A., Leprince,D., Pognonec,P., Dernis,D., Raes,M-B., Stéhelin,D. and J.Ghysdael. (1987b).  
The 5' extremity of the *v-ets* oncogene of avian leukemia virus E26 encodes amino acid sequences not derived from the major *c-ets*-encoded cellular proteins.  
*Virology* **156**, 177-180.
- Gegonne,A., Punyammalee,B., Rabault,B., Bosselut,R., Seneca,S., Crabeel,M. and J.Ghysdael. (1992).  
Analysis of the DNA binding and transcriptional activation properties of the *ets1* oncoprotein.  
*The New Biol.* **4**, 512-519.
- Gentz,R., Rauscher,F.J.,III, Abate,C. and T.Curran. (1989).  
Parallel association of *fos* and *jun* leucine zippers juxtaposes DNA binding domains.  
*Science* **243**,1695-1699
- Gerondakis,S. and J.M.Bishop. (1986).  
Structure of the protein encoded by the chicken proto-oncogene *c-myb*.  
*Mol. Cell. Biol.* **6**, 3677-3684.

- Gewirtz,A.M. and B.Calabretta. (1988).  
A *c-myb* antisense oligodeoxynucleotide inhibits normal human hematopoiesis *in vitro*.  
*Science* **242**, 1303-1306.
- Gewirtz,A.M., Anfossi,G., Venturelli,D., Valpreda,S., Sims,R. and B.Calabretta. (1989).  
G1/S transition in normal human T-lymphocytes requires the nuclear protein encoded by *c-myb*.  
*Science* **245**, 180-183.
- Ghysdael,J., Gégonne,A., Pognonec,P., Dernis,D., Leprince,D. and D.Stéhelin. (1986a).  
Identification and preferential expression in thymic and bursal lymphocytes of a *c-ets* oncogene-  
encoded Mr54,000 cytoplasmic protein.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 1714-1718.
- Ghysdael,J., Gégonne,A., Pognonec,P., Boulukos,K., Leprince,D., Dernis,D., Lagrou,C. and  
D.Stéhelin (1986b).  
Identification in chicken macrophages of a set of proteins related to, but distinct from, the chicken  
cellular *c-ets*-encoded protein p54<sup>c-ets</sup>.  
*The EMBO J.* **5**, 2251-2256.
- Gitlin,S.D., Bosselut,R., Gégonne,A., Ghysdael,J. and J.N.Brady (1991).  
Sequence-specific interaction of the Ets1 protein with the long terminal repeat of the human  
T-lymphotropic virus type I.  
*J. Virol.* **65**, 5513-5523.
- Goff,S.A., Cone,K.C. and M.E.Fromm. (1991).  
Identification of functional domains in the maize transcriptional activator C1 : comparison of wild-  
type and dominant inhibitor proteins.  
*Genes and Dev.* **5**, 298-309.
- Golay,J., Introna,M. and T.Graf. (1988).  
A single point mutation in the *v-ets* oncogene affects both erythroid and myelomonocytic cell  
differentiation.  
*Cell* **55**, 1147-1158.
- Golay,J., Capucci,A., Arsura,M., Castellano,M., Rizzo,V. and M.Introna. (1991).  
Expression of *c-myb* and *B-myb*, but not *A-myb*, correlates with proliferation in human  
hematopoietic cells.  
*Blood* **77**, 149-158.
- Gonda,T.J., Sheiness,D.K. and J.M.Bishop. (1982).  
Transcripts from the cellular homologs of retroviral oncogenes : distribution among chicken  
tissues.  
*Mol. Cell. Biol.* **2**, 617-624.
- Gonda,T.J. and J.M.Bishop. (1983).  
Structure and transcription of the cellular homolog (*c-myb*) of the avian myeloblastosis virus  
transforming gene (*v-myb*).  
*J. Virol.* **46**, 212-220.
- Gonda,T.J. and D.Metcalf. (1984).  
Expression of *myb*, *myc* and *fos* proto-oncogenes during the differentiation of a murine myeloid  
leukaemia.  
*Nature* **310**, 249-251.

- Gonda,T.J., Gough,N.M., Dinn,A.R. and J. de Blaquièrè. (1985).  
Nucleotide sequence of cDNA clones of the murine *myb* proto-oncogene.  
*The EMBO J.* **4**, 2003-2008.
- Gonda,T.J., Cory,S., Sobieszczuk,P., Holtzman,D. and J.M.Adams. (1987).  
Generation of altered transcripts by retroviral insertion within the *c-myb* gene in two murine monocytic leukemias.  
*J. Virol.* **61**, 2754-2763.
- Gonda,T.J., Buckmaster,C. and R.G.Ramsay. (1989a).  
Activation of *c-myb* by carboxy-terminal truncation : relationship to transformation of murine haemopoietic cells *in vitro*.  
*The EMBO J.* **8**, 1777-1783.
- Gonda,T.J., Ramsay,R.G. and G.R.Johnson. (1989b).  
Murine myeloid cell lines derived by *in vitro* infection with recombinant *c-myb* retroviruses express *myb* from rearranged vector proviruses.  
*The EMBO J.* **8**, 1767-1775.
- Graf,T. and H.Beug. (1978).  
Avian leukemia viruses interaction with their target cells *in vivo* and *in vitro*.  
*Biochim. Biophys. Acta.* **516**, 269-299.
- Graf,T., Oker-Blom,N., Todorov,T.G. and H.Beug. (1979).  
Transforming capacities and defectiveness of avian leukemia virus OK10 and E26.  
*Virology* **99**, 431-436.
- Graf,T., Mc Nagny,K., Brady,G. and J.Frampton. (1992).  
Chicken "Erythroid" cells transformed by the gag-Myb-Ets-encoding E26 leukemia virus are multipotent.  
*Cell* **70**, 201-213.
- Grant,P.A., Arulampalam,V., Ährlund-Richter,L. and S.Pettersson. (1992).  
Identificatin of ets-like lymphoid specific elements within the immunoglobulin heavy chain 3' enhancer.  
*Nuc. Acids. Res.* **20**, 4401-4408.
- Grässer,F.A., Graf,T. and J.S.Lipsick. (1991).  
Protein truncation is required for the activation of the *c-myb* proto-oncogene.  
*Mol. Cell. Biol.* **11**, 3987-3996.
- Griffin,C.A. and S.B.Baylin. (1985).  
Expression of the *c-myb* oncogene in human small cell lung carcinoma.  
*Cancer Res.* **45**, 272-275.
- Guérin,M., Sheng,Z-M., Andrieu,N. and Riou,G. (1990).  
Strong association between *c-myb* and oestrogen-receptor expression in human breast cancer.  
*Oncogene* **5**, 131-135.
- Gumbiner,B.M. (1992).  
Epithelial morphogenesis.  
*Cell* **69**, 385-387.

- Gunther,C.V., Nye,J.A., Bryner,R.S. and B.Graves. (1990).  
Sequence-specific DNA binding of the proto-oncoprotein *ets-1* defines a transcriptional activator sequence within the long terminal repeat of the Moloney murine sarcoma virus.  
*Genes Dev.* **4**, 667-679.
- Gutman,A. and B.Wasylyk. (1990).  
The collagenase gene promoter contains a TPA and oncogene-responsive unit encompassing the PEA3 and AP-1 binding sites.  
*The EMBO J.* **9**, 2241-2246.
- Hagman,J. and R.Grosschedl. (1992).  
An inhibitory carboxy-terminal domain in *ets-1* and *ets-2* mediates differential binding of ETS family factors to promoter sequences of the *mb-1* gene.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 8889-8893.
- Hahn,S.L., Hahn,M. and W.S.Hayward. (1989).  
Structural organization of upstream exons and distribution of transcription start sites in the chicken *c-myb* gene.  
*Mol. Cell. Biol.* **9**, 837-843.
- Hai,T. and T.Curran. (1991).  
Cross-family dimerization of transcription factors *fos/jun* and ATF/CREB alters DNA binding specificity.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 3720-3724.
- Halazonetis,T.D., Georgopoulos,K., Greenberg,M.E. and P.Leder. (1988).  
*c-jun* dimerizes with itself and with *c-fos*, forming complexes of different DNA binding affinities.  
*Cell* **55**, 917-924.
- Harper,M.E., Franchini,G., Love,J., Simon,M.I., Gallo,R.C. and F.Wong-Staal. (1983).  
Chromosomal sublocalization of human *c-myb* and *c-fes* cellular onc genes.  
*Nature* **304**, 169-171.
- Hipskind,R.A., Rao,V.N., Mueller,C.G.F., Reddy,E.S.P. and A.Nordheim. (1991).  
Ets-related protein *elk-1* is homologous to the *c-fos* regulatory factor p62<sup>TCF</sup>.  
*Nature* **354**, 531-534.
- Hirai,S-I., Ryseck,R-P., Mechta,F., Bravo,R. and M.Yaniv. (1989).  
Characterization of *junD* : a new member of the *jun* proto-oncogene family.  
*The EMBO J.* **8**, 1433-1439.
- Ho,I.C., Bhat,N.K., Gottschalk,L.R., Lindsten,T., Thompson,C.B., Papas,T.S. and J.M.Leiden. (1990).  
Sequence-specific binding of human *ets-1* to the T cell receptor  $\alpha$  gene enhancer.  
*Science* **250**, 814-818.
- Hoffman-Liebermann,B. and D.A.Liebermann. (1991).  
Suppression of *c-myc* and *c-myb* is tightly linked to terminal differentiation induced by IL6 or LIF and not growth inhibition in myeloid leukemia cells.  
*Oncogene* **6**, 903-909.
- Howe,K.M., Reakes,C.F.L. and R.J.Watson. (1990).  
Characterization of the sequence specific interaction of mouse *c-myb* protein with DNA.  
*The EMBO J.* **9**, 161-169.



- Howe, K.M. and R.J. Watson. (1991).  
Nucleotide preferences in sequence-specific recognition of DNA by *c-myb* protein.  
*Nucl. Acids. Res.* **19**, 3913-3919.
- Hu, Y., Ramsay, R.G., Kanei-Ishii, C., Ishii, S. and T.J. Gonda. (1991).  
Transformation by carboxyl-deleted Myb reflects increased transactivating capacity and disruption of a negative regulatory domain.  
*Oncogene* **6**, 1549-1553.
- Ibanez, C.E., Garcia, A., Stober-Grässer, U. and J.S. Lipsick. (1988).  
DNA-binding activity associated with the *v-myb* oncogene product is not sufficient for transformation.  
*J. Virol.* **62**, 4398-4402.
- Ibanez, C.E. and J. Lipsick. (1988).  
Structural and functional domains of the *myb* oncogene : requirements for nuclear transport, myeloid transformation, and colony formation.  
*J. Virol.* **62**, 1981-1988.
- Ibanez, C.E. and J.S. Lipsick. (1990).  
Transactivation of gene expression by *v-myb*.  
*Mol. Cell. Biol.* **10**, 2285-2293.
- Introna, M., Golay, L., Frampton, J., Nakano, T., Ness, S.A. and T. Graf. (1990).  
Mutations in *v-myb* alter the differentiation of myelomonocytic cells transformed by the oncogene.  
*Cell* **63**, 1287-1297.
- Ivanov, X., Mladenov, Z., Nedyalkov, S. and T.G. Todorov. (1962).  
Experimental investigations into avian leukosis. I. Transmission experiments of certain diseases of the avian leukosis complex, found in Bulgaria.  
*Bull. Inst. Pathol. Comp. Animaux Domestiques* **9**, 5-36.
- Ivashkiv, L.B., Liou, H-C., Kara, C.J., Lamph, W.W., Verma, I.M. and L.H. Glimcher. (1990).  
mXBP/CRE-BP2 and *c-jun* form a complex which binds to the cyclic AMP, but not to the 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, response element.  
*Mol. Cell. Biol.* **10**, 1609-1621.
- Jonat, C., Rahmsdorf, H.J., Park, K-K., Cato, A.C.B., Gebel, S., Ponta, H. and P. Herrlich. (1990).  
Antitumor promotion and antiinflammation : down-modulation of AP-1 (*fos/jun*) activity by glucocorticoid hormone.  
*Cell* **62**, 1189-1204.
- Jones, N. (1990).  
Transcriptional regulation by dimerization : two sides to an incestuous relationship.  
*Cell* **61**, 9-11.
- Jorcyk, C.L., Watson, D.K., Mavrothalassitis, G.J. and T.S. Papas. (1991).  
The human ETS1 gene : genomic structure, promoter characterization and alternative splicing.  
*Oncogene* **6**, 523-532.
- Jurdic, P., Benchaibi, M., Gandrillon, O. and J. Samarut. (1987).

Transforming and mitogenic effects of avian leukemia virus E26 on chicken hematopoietic cells and fibroblasts, respectively, correlate with level of expression of the provirus.  
*J. Virol.* **61**, 3058-3065.

Kalkbrenner,F., Guehmann,S. and K.Moelling. (1990).  
Transcriptional activation by human *c-myb* and *v-myb* genes.  
*Oncogene* **5**, 657-661.

Kanei-Ishii,C., Sarai,A., Sawazaki,T., Nakagoshi,H., He,D., Ogata,K., Nishimura,Y. and S.Ishii. (1990). The tryptophan cluster : a hypothetical structure of the DNA-binding domain of the *myb* protooncogene product.  
*J. Biol. Chem.* **265**, 19990-19995.

Kanei-Ishii,C., MacMillan,E.M., Nomura,T., Sarai,A., Ramsay,R.G., Aimoto,S., Ishii,S. and T.J.Gonda. (1992).  
Transactivation and transformation by Myb are negatively regulated by a leucine-zipper structure.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 3088-3092.

Kanter,M.R., Smith,R.E. and W.S.Hayward. (1988).  
Rapid induction of B-cell lymphomas : insertional activation of *c-myb* by avian leukosis virus.  
*J. Virol.* **62**, 1423-1432.

Karim,F.D., Urness,L.D., Thummel,C.S., Klemsz,M.J., McKercher,S.R., Celada,A., Van Beveren,C., Maki,R.A., Gunther,C.V., Nye,J.A., B.J.Graves. (1990).  
The ETS-domain : a new DNA-binding motif that recognizes a purine-rich core DNA sequence.  
*Genes and Dev.* **4**, 1451-1543.

Kastan,M.B., Slamon,D.J. and C.I.Civin. (1989).  
Expression of protooncogene *c-myb* in normal human hematopoietic cells.  
*Blood* **73**, 1444-1451.

Kastan,M.B., Stone,K.D. and C.I.Civin. (1989).  
Nuclear oncoprotein expression as a function of lineage, differentiation stage, and proliferative status of normal human hematopoietic cells.  
*Blood* **74**, 1517-1524.

Katzen,A.L., Kornberg,T.B. and J.M.Bishop. (1985).  
Isolation of the protooncogene *c-myb* from *D.melanogaster*.  
*Cell* **41**, 449-456.

Kaufmann,Y., Silverman,T., Levi,B-Z. and K.Ozato. (1987).  
Induction of *c-ets* and *c-fos* gene expression upon antigenic stimulation of a T cell hybridoma with inducible cytolytic capacity.  
*J. Exp. Med.* **166**, 810-815.

Kenney,S.C., Holley-Guthrie,E., Quinlivan,E.B., Gutsch,D., Zhang,Q., Bender,T., Giot,J-F. and A.Sergeant. (1992).  
The cellular oncogene *c-myb* can interact synergistically with the Epstein-Barr virus BZLF1 transactivator in lymphoid cells.  
*Mol. Cell. Biol.* **12**, 136-146.

Kerpolla,T.K. and T.Curran. (1991).  
*Fos-jun* heterodimers and *jun* homodimers bend DNA in opposite orientations : implications for transcription factor cooperatively.

*Cell* **66**, 317-326.

Kim,W-K. and M.A.Baluda. (1989).

Hematopoietic lineage-specific heterogeneity in the 5'-terminal region of the chicken proto-*myb* transcript.

*Mol. Cell. Biol.* **9**, 3771-3776.

Kimelman,D. and M.W.Kirschner. (1989).

An antisense mRNA directs the covalent modification of the transcript encoding fibroblast growth factor in xenopus oocytes.

*Cell* **59**, 687-696.

Klempnauer,K-H., Gonda,T.J. and J.M.Bishop. (1982).

Nucleotide sequence of the retroviral leukemia gene *v-myb* and its cellular progenitor *c-myb* : the architecture of a transduced oncogene.

*Cell* **31**, 453-463.

Klempnauer,K-H., Ramsay,G., Bishop,J.M., Moscovici,M.G., Moscovici,C., McGrath,J.P. and A.D.Levinson. (1983).

The product of the retroviral transforming gene *v-myb* is a truncated version of the protein encoded by the cellular oncogene *c-myb*.

*Cell* **33**, 345-355.

Klempnauer,K.-H., Symonds,G., Evan,G.I. and J.M.Bishop. (1984).

Subcellular localization of proteins encoded by oncogenes of avian myeloblastosis virus and avian leukemia virus E26 and by the chicken *c-myb* gene.

*Cell* **37**, 537-547.

Klempnauer,K.-H., Bonifer,C. and A.E.Sippel. (1986).

Identification and characterization of the protein encoded by the human *c-myb* proto-oncogene.

*EMBO J.* **5**, 1903-1911.

Klempnauer,K-H and A.E.Sippel. (1986).

Subnuclear localization of proteins encoded by the oncogene *v-myb* and its cellular homolog *c-myb*.

*Mol. Cell. Biol.* **6**, 62-69.

Klempnauer,K.-H. and A.E.Sippel. (1987).

The highly conserved amino-terminal region of the protein encoded by the *v-myb* oncogene functions as a DNA-binding domain.

*EMBO J.* **6**, 2719-2725.

Klempnauer,K.-H., Arnold,H. and H.Biedenkapp. (1989).

Activation of transcription by *v-myb* : evidence for two different mechanisms.

*Genes Dev.* **3**, 1582-1589.

Klemsz,M.J., Mr Kercher,S.R., Celada,A., Van Beveren,C. and R.A.Maki. (1990).

The macrophage and B cell-specific transcription factor PU.1 is related to the *ets* oncogene.

*Cell* **61**, 113-124.

Koizumi,S., Fisher,R.J., Fujiwara,S., Jorcyk,C., Bhat,N.K., Seth,A. and T.S.Papas. (1990). Isoforms of the human *ets-1* protein : generation by alternative splicing and differential phosphorylation.

*Oncogene* **5**, 675-681.

- König,H., Ponta,H., Rahmsdorf,H.J. and P.Herrlich. (1992).  
Interference between pathway-specific transcription factors : glucocorticoids antagonize phorbol ester-induced AP-1 site occupation *in vivo*.  
*The EMBO J.* **11**, 2241-2246.
- Kouzarides,T. and E.Ziff. (1988).  
The role of the leucine zipper in the *fos-jun* interaction.  
*Nature* **336**, 646-651.
- Kovary,K. and R.Bravo. (1992).  
Existence of different *fos/jun* complexes during the G0-to-G1 transition and during exponential growth in mouse fibroblasts : differential role of fos proteins.  
*Mol. Cell. Biol.* **12**, 5015-5023.
- Kuppuswamy,M., Subramanian,T., Srinivasan,A. and G.Chinnadurai. (1989).  
Multiple functional domains of Tat, the trans-activator of HIV-1, defined by mutational analysis.  
*Nuc. Acids. Res.* **17**, 3551-3555.
- Lafyatis,R., Kim,S-J., Angel,P., Roberts,A.B., Sporn,M.B., Karin,M. and R.L.Wilder. (1990).  
Interleukin-1 stimulates and *all-trans*-retinoic acid inhibits collagenase gene expression through its 5' activator protein-1-binding site.  
*Mol. Endo.* **4**, 973-980.
- Lamb,P. and S.L.McKnight (1991).  
Diversity and specificity in transcriptional regulation : the benefits of heterotypic dimerization.  
*TIBS* **16**, 417-435.
- Landschulz,W.H., Johnson,P.F. and S.L.Mc Knight. (1988).  
The leucine zipper : a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins.  
*Science* **240**,1759-1764.
- Lane,T., Ibanez,C., Garcia,A., Graf,T. and J.Lipsick. (1990).  
Transformation by *v-myb* correlates with *trans*-activation of gene expression.  
*Mol. Cell. Biol.* **10**, 2591-2598.
- Laudet,V. and D.Stéhelin. (1992).  
Nuclear Receptors : flexible friends.  
*Current Biology* **2**, 293-295.
- Laudet,V., Hänni,C., Coll,J., Catzeflis,F. and D.Stéhelin. (1992).  
Evolution of the nuclear receptor gene superfamily.  
*The EMBO J.* **11**, 1003-1013.
- Laudet,V., Niel,C., Duterque-Coquillaud,M., Leprince,D. and D.Stéhelin.  
Evolution of the *ets* gene family.  
soumis à *BBRC*.
- Lautenberger,J.A., Burdett,L.A., Gunnell,M.A., Qi,S., Watson,D.K., O'Brien,S.J. and T.S.Papas. (1992).  
Genomic dispersal of the *ets* gene family during metazoan evolution.  
*Oncogene* **7**, 1713-1719.

- Lavu,S. and E.P.Reddy. (1986).  
Structural organization and nucleotide sequence of mouse *c-myb* oncogene : activation in ABPL tumors is due to viral integration in an intron which results in the deletion of the 5' coding sequences.  
*Nuc. Acids. Res.* **14**, 5309-5320.
- Lazar,M.A., Hodin,R.A., Darling,D.S. and W.W.Chin. (1989).  
A novel member of the thyroid/steroid hormone receptor family is encoded by the opposite strand of the rat *c-erbA $\alpha$*  transcriptional unit.  
*Mol. Cell. Biol.* **9**, 1128-1136.
- Lee,K.A.W. (1991).  
Transcriptional regulation by cAMP.  
*Cur. Opinion in Cell Biol.* **3**, 953-959.
- Lee,W., Haslinger,A., Karin,M. and R.Tjian. (1987a).  
Activation of transcription by two factors that bind promoter and enhancer sequences of the human metallothionein gene and SV40.  
*Nature* **325**, 368-372.
- Lee,W., Mitchell,P. and R.Tjian. (1987b).  
Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements.  
*Cell* **49**, 741-752.
- Lehrer,R.I., Ganz,T. and M.E.Selsted. (1991).  
Defensins : endogenous antibiotic peptides of animal cells.  
*Cell* **64**, 229-230.
- Leiden,J.M. (1992).  
Transcriptional regulation during T-cell development : the a TCR gene as a molecular model.  
*Imm. Today* **13**,
- Leprince,D., Gégonne,A., Coll,J., de Taisne,C., Schneeberger,A., Lagrou,C. and D.Stéhelin. (1983a).  
A putative second cell-derived oncogene of the avian leukemia virus E26.  
*Nature* **306**, 395-397.
- Leprince,D., Saule,S., de Taisne,C., Gégonne,A., Bégue,A., Righi,M. and D.Stéhelin. (1983b).  
The human DNA locus related to the oncogene *myb* of avian myeloblastosis virus (AMV) : molecular cloning and structural characterization.  
*The EMBO J.* **2**, 1073-1078.
- Leprince,D., Duterque-Coquillaud,M., Li,R. P., Henry,C., Flourens,A., Debuire,B. and D.Stéhelin. (1988).  
Alternative splicing within the chicken *c-ets-1* locus : implications for transduction within the E26 retrovirus of the *c-ets* proto-oncogene.  
*J. Virol.* **62**, 3233-3241.
- Leprince,D., Gesquiere,J.C. and D.Stéhelin. (1990).  
The chicken cellular progenitor of the *v-ets* oncogene, p68<sup>c-ets-1</sup>, is a nuclear DNA-binding protein not expressed in lymphoid cells of the spleen.  
*Oncogene Res.* **5**, 255-265.

- Leprince,D., Crépieux,P. and D.Stéhelin. (1992).  
*c-ets-1* DNA binding to the PEA3 motif is differentially inhibited by all the mutations found in *v-ets*.  
*Oncogene* **7**, 9-17.
- Leprince,D., Crépieux,P., Laudet,V., Flourens,A. and D.Stéhelin. (1992).  
 A new mechanism of oncogenic activation : E26 retroviral *v-ets* oncogene has inverted the C-terminal end of the transcription factor *c-ets-1*.  
 soumis à *J.Virol.*
- Leutz,A., Damm,K., Sterneck,E., Kowenz,E., Ness,S., Frank,R. Gausephol,H., Pan,A., Smart,J., Hayman,M.J. and T.Graf. (1989).  
 Molecular cloning of the chicken myelomonocytic growth factor (cMGF) reveals relationships to interleukin 6 and granulocyte colony stimulating factor.  
*The EMBO J.* **8**, 175-181.
- Levine,M. and J.L.Manley. (1989).  
 Transcriptional repression of eukaryotic promoters.  
*Cell* **59**, 405-408.
- Li,R., Duterque-Coquillaud,M., Lagrou,C., Debuire,B., Graf,T., Stéhelin,D. and D.Leprince. (1989).  
 A single amino-acid substitution in the DNA-binding domain of the *myb* oncogene confers a thermolabile phenotype to E26-transformed myeloid cells.  
*Oncogene Res.* **5**, 137-141.
- Liebermann,D.A. and B.Hoffman-Liebermann. (1989).  
 Proto-oncogene expression and dissection of the myeloid growth to differentiation developmental cascade.  
*Oncogene* **4**, 583-592.
- Lim,F., Kraut,N., Frampton,J. and T.Graf. (1992).  
 DNA binding by *c-ets-1*, but not *v-ets*, is repressed by an intramolecular mechanism.  
*The EMBO J.* **11**, 643-652.
- Lipsick,J.S. and C.E.Ibanez. (1987).  
 env-encoded residues are not required for transcription by p48<sup>v-myb</sup>.  
*J. Virol.* **61**, 933-936.
- Lucibello,F.C., Slater,E.P., Jooss,K.U., Beato,M. and R.Müller. (1990).  
 Mutual transrepression of *fos* and the glucocorticoid receptor : involvement of a functional domain in *fos* which is absent in *fosB*.  
*The EMBO J.* **9**, 2827-2834.
- Lüscher,B. and R.N.Eisenman. (1988).  
*c-myc* and *c-myb* protein degradation : effect of metabolic inhibitors and heat shock.  
*Mol. Cell. Biol.* **8**, 2504-2512.
- Lüscher,B., Christenson,E., Litchfield,D.W., Krebs,E.G. and R.N.Eisenman. (1990).  
 Myb DNA binding inhibited by phosphorylation at a site deleted during oncogenic activation.  
*Nature* **344**, 517-522.
- Lüscher,B. and R.N.Eisenman. (1991a).  
 New light on Myc and Myb. Part I. Myc.

*Genes and Dev.* **4**, 2025-2035.

Lüscher, B. and R.N.Eisenman. (1991b).  
New light on Myc and Myb. Part II. Myb.  
*Genes Dev.* **4**, 2235-2241.

Lüscher, B. and R.N.Eisenman. (1992).  
Mitosis-specific phosphorylation of the nuclear oncoproteins *myc* and *myb*.  
*J. Cell. Biol.* **118**, 775-784.

Macgregor, P.F., Abate, C. and T.Curran. (1990).  
Direct cloning of leucine zipper proteins : *jun* binds cooperatively to the CRE with CRE-BP1.  
*Oncogene* **5**, 451-458.

Macleod, K., Leprince, D. and D.Stéhelin. (1992).  
The *ets* gene family.  
*Trends Bio. Sci.* **17**, 251-256.

Majello, B., Kenyon, L.C. and R.Dalla-Favera. (1986).  
Human *c-myb* proto-oncogene : nucleotide sequence of cDNA and organization of the genomic locus.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 9636-9640.

Majérus, M-A., Bibollet-Ruche, F., Telliez, J-B., Wasylyk, B. and B.Bailleul. (1992).  
Serum, AP-1 and Ets-1 stimulate the human *ets-1* promoter.  
*Nuc. Acids. Res.* **20**, 2699-2703.

Maki, Y., Bos, T.J., Davis, C., Starbuck, M. and P.K.Vogt. (1987).  
Avian sarcoma virus 17 carries the *jun* oncogene.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 2848-2852.

Maroco, A., Wissenbach, M., Becker, D., Paz-Ares, J., Saedler, H. and F.Salamini. (1989).  
Multiple genes are transcribed in (*Hordeum vulgare*) and (*Zea mays*) that carry the DNA binding domain of the *myb* oncoproteins.  
*Mol. Gen. Genet.* **210**, 183-187.

Matrisian, L.M. (1990).  
Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling.  
*TIG* **6**, 121-125.

Mavrothalassitis, G.J. and T.S.Papas. (1991).  
Positive and negative factors regulate the transcription of the *ets2* gene via an oncogene-responsive-like unit within the *ets2* promoter region.  
*Cell Growth and Dif.* **2**, 215-224.

McClinton, D., Stafford, J., Brents, L., Benter, T.P. and W.M.Kuehl. (1990).  
Differentiation of mouse erythroleukemia cells is blocked by late up regulation of a *c-myb* transgene.  
*Mol. Cell. Biol.* **10**, 705-710.

Meisner, H. and M.P.Czech.  
Phosphorylation of transcriptional factors and cell-cycle-dependent proteins by casein kinase II.  
*Current Opinion in Cell Biol.* **3**, 474-483.

- Merzak,A., Soret,J., Martinerie,C., Sureau,A., Crocher,J. and B.Perbal. (1992).  
Transforming potential of truncated *v-myb* and stimulation of replication by *gag-myb* fusion products.  
*Oncogene* **7**, 535-542.
- Metz,T. and T.Graf. (1991a).  
*v-myb* and *v-ets* transform chicken erythroid cells and cooperate both in *trans* and in *cis* to induce distinct differentiation phenotypes.  
*Genes & Dev.* **5**, 369-380.
- Metz,T. and T.Graf. (1991b).  
Fusion of the nuclear oncoproteins *v-Myb* and *v-Ets* is required for the leukemogenicity of E26 virus.  
*Cell* **66**, 95-105.
- Mitchell,P.J. and R.Tjian. (1989).  
Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence specific DNA binding proteins.  
*Science* **245**, 371-378.
- Mitchell,P.J., Timmons,P.M., Hébert,J.M., Rigby,P.W.J. and R.Tjian. (1991).  
Transcription factor AP-2 is expressed in neural crest cell lineages during mouse embryogenesis.  
*Genes and Dev.* **5**, 105-119.
- Miyajima,N., Horiuchi,R., Shibuya,Y., Fukushige,S-I., Matsubara,K-I, Toyoshima,K. and T.Yamamoto. (1989).  
Two *erbA* homologs encoding proteins with different T3 binding capacities are transcribed from opposite DNA strands of the same genetic locus.  
*Cell* **57**, 31-39.
- Mizuguchi,G., Nakagoski,H., Nagase,T., Nomura,N., Date,T., Veno,Y. and S.Ishii. (1990).  
DNA binding activity and transcriptional activator function of the human B-*myb* protein compared with c-Myb.  
*J. Biol. Chem.* **265**, 9280-9284.
- Moelling,K., Pfaff,E., Beug,H., Beimling,P., Bunte,T., Schaller,H.E. and T.Graf. (1985).  
DNA binding activity is associated with purified Myb proteins from AMV and E26 viruses and is temperature-sensitive for E26 ts mutants.  
*Cell* **40**, 983-990.
- Mordacq,J.C. and D.I.H.Linzer. (1989).  
Co-localization of elements required for phorbol ester stimulation and glucocorticoid repression of proliferin gene expression.  
*Genes and Dev.* **3**, 760-769.
- Moscovici,C. (1975).  
Leukemic transformation with avian myeloblastosis virus : present status.  
*Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **71**, 79-101.
- Moscovici,C., Samarut,J., Gazzolo,L. and M.G.Moscovici. (1981).  
Myeloid and erythroid neoplastic responses to avian defectie leukemia viruses in chickens and in quail.  
*Virology* **113**, 765-768.



- Moscovici, M., Jurdic, P., Samarut, J., Gazzolo, L., Mura, C.V. and C. Moscovici. (1983). Characteristics of the hemopoietic target cells for the avian leukemia virus E26. *Virology* **129**, 65-78.
- Mountz, J.D., Steinberg, A.D., Klinman, D.M., Smith, H.R. and J.F. Mushinski. (1984). Autoimmunity and increased *c-myb* transcription. *Science* **226**, 1087-1089.
- Mountz, J.D. and A.D. Steinberg. (1989). Studies of *c-myb* gene regulation in MRL-1 pr/lpr mice. *J. Immunol.* **142**, 328-335.
- Mucenski, M.L., McLain, K., Kier, A.B., Swerdlow, S.H., Schreiner, C.M., Miller, T.A., Pietryga, D.W., Scott, W.J. Jr. and S. Potter. (1991). A functional *c-myb* gene is required for normal murine fetal hepatic hematopoiesis. *Cell* **65**, 677-689.
- Mukhopadhyaya, R. and L. Wolff. (1992). New sites of proviral integration associated with murine promonocytic leukemias and evidence for alternate modes of *c-myb* activation. *J. Virol.* **66**, 6035-6044.
- Müller, R., Verma, I.M. and E.D. Adamson. (1983). Expression of *c-onc* genes : *c-fos* transcripts accumulate to high levels during development of mouse placenta, yolk sac and amnion. *EMBO J.* **2**, 679-684.
- Müller, R. (1986). Cellular and viral *fos* genes : structure, regulation of expression and biological properties of their encoded products. *Biochim. Biophys. Acta* **823**, 207-225.
- Mumberg, D., Lucibello, F.C., Schuermann, M. and R. Müller. (1991). Alternative splicing of *fosB* transcripts results in differentially expressed mRNAs encoding functionally antagonistic proteins. *Genes & Dev.* **5**, 1212-1223.
- Nakabeppu, Y., Ryder, K. and D. Nathans. (1988). DNA binding activities of three murine *jun* proteins : stimulation by *fos*. *Cell* **55**, 907-915.
- Nakabeppu, Y. and D. Nathans. (1991). A naturally occurring truncated form of FosB that inhibits Fos/Jun transcriptional activity. *Cell* **64**, 751-759.
- Nakagoshi, H., Nagase, T., Kanei-Ishii, C., Ueno, Y. and S. Ishii. (1990). Binding of the *c-myb* proto-oncogene product to the simian virus 40 enhancer stimulates transcription. *J. Biol. Chem.* **265**, 3479-3483.
- Nakagoshi, H., Kanei-Ishii, C., Sawazaki, T., Mizuguchi, G. and S. Ishii. (1992). Transcriptional activation of the *c-myc* gene by the *c-myb* and *B-myb* gene products. *Oncogene* **7**, 1233-1240.

- Nakano, T. and T. Graf. (1992).  
Identification of genes differentially expressed in two types of *v-myb*-transformed avian myelomonocytic cells.  
*Oncogene* **7**, 517-534.
- Nepveu, A. and K. B. Marcu. (1986).  
Intragenic pausing and anti-sense transcription within the murine *c-myc* locus.  
*The EMBO J.* **5**, 2859-2865.
- Nerlow, C., Rorth, P., Blasi, F. and M. Johnsen. (1991).  
Essential AP-1 and PEA3 binding elements in the human urokinase enhancer display cell type-specific activity.  
*Oncogene* **6**, 1583-1592.
- Nerlow, C., De Cesare, D., Pergola, F., Caracciolo, A., Blasi, F., Johnsen, M. and P. Verde. (1992).  
A regulatory element that mediates co-operation between a PEA3-AP-1 element and an AP-1 site is required for phorbol ester induction of urokinase enhancer activity in HepG2 hepatoma cells.  
*The EMBO J.* **11**, 4573-4582.
- Ness, S. A., Beug, H. and T. Graf. (1987).  
*v-myb* dominance over *c-myc* in doubly transformed chick myelomonocytic cells.  
*Cell* **51**, 41-50.
- Ness, S. A., Marknell, A. and T. Graf. (1989).  
The *v-myb* oncogene product binds to and activates the promyelocyte-specific *mim-1* gene.  
*Cell* **59**, 1115-1125.
- Neuberg, M., Schuermann, M., Hunter, J. B. and R. Müller. (1989).  
Two functionally different regions in *fos* are required for the sequence-specific DNA interaction of the fos/jun protein complex.  
*Nature* **338**, 589-590.
- Nicholson, R. C., Mader, S., Nagpal, S., Leid, M., Rochette-Egly, C. and P. Chambon. (1990).  
Negative regulation of the rat stromelysin gene promoter by retinoic acid is mediated by an AP-1 binding site.  
*The EMBO J.* **9**, 4443-4454.
- Nicolaidis, N. C., Gualdi, R., Casadevall, C., Manzella, L. and B. Calabretta. (1991).  
Positive autoregulation of *c-myb* expression via Myb binding sites in the 5' flanking region of the human *c-myb* gene.  
*Mol. Cell. Biol.* **11**, 6166-6176.
- Nishina, Y., Nakagoshi, H., Imamoto, F., Gonda, T. J. and S. Ishii. (1989).  
Trans-activation by the *c-myb* proto-oncogene.  
*Nucleic Acids Res.* **17**, 107-117.
- Nishina, H., Sato, H., Suzuki, T., Sato, M. and H. Iba. (1990).  
Isolation and characterization of *fra-2*, an additional member of the *fos* gene family.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 3619-3623.
- Nomura, N., Takahashi, M., Matsui, M., Ishu, S., Date, T., Sasamoto, S. and R. Ishizaki. (1988).  
Isolation of human cDNA clones of *myb*-related genes, A-*myb* and B-*myb*.  
*Nucleic Acids Res.* **16**, 11075-11089.

Nunn,M.F., Seeburg,P.H., Moscovici,C. and P.H.Duesberg. (1983).  
Tripartite structure of the avian erythroblastosis virus E26 transforming gene.  
*Nature* **306**, 391-395.

Nunn,M.F. and T.Hunter. (1989).  
The *ets* sequence is required for induction of erythroblastosis in chicken by avian retrovirus E26.  
*J. Virol.* **63**, 398-402.

Nye,J.A., Petersen,J.M., Gunther,C.V., Jonsen,M.D. and B.J.Graves. (1992).  
Interaction of murine Ets-1 with GGA-binding sites establishes the ETS domain as a new DNA-binding motif.  
*Genes and Dev.* **6**, 975-990.

Oehler,T., Arnold,H., Biedenkapp,H. and K-H.Klempnauer. (1990).  
Characterization of the v-*myb* DNA binding domain.  
*Nucleic Acids. Res.* **18**, 1703-1710.

Ogata,K., Hojo,H., Aimoto,S., Nakai,T., Nakamura,K., Sarai,A., Ishii,S. and Y.Nishimura. (1992).  
Solution structure of a DNA-binding unit of Myb : a helix-turn-helix-related motif with conserved tryptophans forming a hydrophobic core.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 6428-6432.

Oka,T., Rairkar,A. and J.H.Chen. (1991).  
Structural and functional analysis of the regulatory sequences of the *ets-1* gene.  
*Oncogene* **6**, 2077-2083.

Oppenheimer,D.G., Herman,P.L., Sivakumaran,S., Esch,J. and M.D.Marks.  
A *myb* gene required for leaf trichome differentiation in Arabidopsis is expressed in stipules.  
*Cell* **67**, 483-493.

O'Shea,E.K., Rutkowski,R. and P.S.Kim. (1989a).  
Evidence that the leucine zipper is a coiled coil.  
*Science* **243**, 538-543.

O'Shea,E.L., Rutkowski,R., Stafford,W.F.,III, and P.S.Kim. (1989b).  
Preferential heterodimer formation by isolated leucine zippers from *fos* and *jun*.  
*Science* **245**, 646-648.

Owen,T.A., Bortell,R., Yocum,S.A., Smock,S.L., Zhang,M., Abate,C., Shalhoub,V., Aronin,N., Wright,K.L., van Wijnen,A.J., Stein,J.L., Curran,T., Lian,J.B. and G.S.Stein. (1990).  
Coordinate occupancy of AP-1 sites in the vitamin D-responsive and CCAAT box elements by *fos-jun* in the osteocalcin gene : model for phenotype suppression of transcription.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 9990-9994.

Pardanaud,L., Yassine,F. and F.Dieterlin-Lièvre. (1989).  
Relationship between vasculogenesis, angiogenesis and haemopoiesis during avian ontogeny.  
*Development* **105**,

Park,J-G and E.P.Reddy. (1992).  
Large-scale molecular mapping of human *c-myb* locus : *c-myb* proto-oncogene is not involved in 6q- abnormalities of lymphoid tumors.

*Oncogene* **7**, 1603-1609.

Pauza, C.D. (1987).

Regulation of human T-lymphocyte gene expression by interleukin 2 : immediate-response genes include the proto-oncogene *c-myb*.  
*Mol. Cell. Biol.* **7**, 342-348.

Paz-Ares, J., Ghosal, D., Wienand, U., Peterson, P.A. and H.Saedler. (1987).

The regulatory C1 locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to *myb* proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators.  
*EMBO J.* **6**, 3553-3558.

Pelicci, P-G., Lanfrancone, L., Brathwaite, M.D., Wolman, S.R. and Dalla-Favera, R. (1984).

Amplification of the *c-myb* oncogene in a case of human acute myelogenous leukemia.  
*Science* **224**, 1117-1121.

Perbal, B. (1992).

Epissage en trans du proto-oncogène *c-myb* et différenciation hématopoïétique.  
*Médecine et Science* **8**, 548-561.

Peters, C.W.B., Sippel, A.E., Vingron, M. and K-H.Klempnauer. (1987).

*Drosophila* and vertebrate *myb* proteins share two conserved regions, one of which functions as a DNA-binding domain.  
*The EMBO J.* **6**, 3085-3090.

Pierce, J.H. (1989).

Oncogenes, growth factors and hematopoietic cell transformation.  
*Biochim. Biophys. Acta.* **989**, 179-208.

Pizer, E.S. and E.H.Humphries. (1989).

RAV-1 insertional mutagenesis : disruption of the *c-myb* locus and development of avian B-cell lymphomas.  
*J. Virol.* **63**, 1630-1640.

Pizer, E.S., Baba, T.W. and E.H.Humphries. (1992).

Activation of the *c-myb* locus is insufficient for the rapid induction of disseminated avian B-cell lymphoma.  
*J. Virol.* **66**, 512-523.

Pognonec, P. (1988).

Thèse de Docteur de l'Université des Sciences et Techniques de Lille N° 295  
Etude de l'expression et des modifications du produit de traduction p54 du proto-oncogène *c-ets-1*.

Pognonec, P., Boulukos, K.E., Gesquière, J.C., Stéhelin, D. and J.Ghysdael. (1988).

Mitogenic stimulation of thymocytes results in the calcium-dependent phosphorylation of *c-ets-1* proteins.  
*The EMBO J.* **7**, 977-983.

Pognonec, P., Boulukos, K.E. and J.Ghysdael. (1989).

The *c-ets-1* protein is chromatin associated and binds to DNA *in vitro*.  
*Oncogene* **4**, 691-697.

- Pognonec,P., Boulukos,K.E., Bosselut,R., Boyer,C., Schmitt-Verhulst,A.M. and J.Ghysdael. (1990).  
Identification of a Ets1 variant protein unaffected in its chromatin and *in vitro* DNA binding capacities by T cell antigen receptor triggering and intracellular calcium rises.  
*Oncogene* **5**, 603-610.
- Pollock,R. and R.Treisman (1990).  
A sensitive method for the determination of protein-DNA binding specificities.  
*Nucleic Acids Res.* **18**, 6197-6204.
- Pongubala,J.M.R., Nagulapalli,S., Klemsz,M.J., Mr Kercher,S.R., Maki,R.A. and M.L.Atchison. (1992).  
PU-1 recruits a second nuclear factor to a site important for immunoglobulin  $\kappa$  3' enhancer activity.  
*Mol. Cell. Biol.* **12**, 368-378.
- Pribyl,L.J., Watson,D.K., McWilliams,M.J., Ascione,R. and T.S.Papas. (1988).  
The drosophila *ets-2* gene : molecular structure, chromosomal localization, and developmental expression.  
*Dev. Biol.* **127**,45-53.
- Prochownik,E. (1989).  
*c-myb* but not *c-myc* suppresses the hemin-induced nonterminal expression of hemoglobin by murine erythroleukemia cells.  
*Blood* **73**, 782-786.
- Prosser,H.M., Wotton,D., Gégonne,A., Ghysdael,J., Wang,S., Speck,N.A. and M.J.Owen. (1992).  
A phorbol ester response element within the human T-cell receptor  $\beta$ -chain enhancer.  
*Proc. Natl. Acad.Sci. USA* **89**, 9934-9938.
- Ptashne,M. (1988).  
How eukaryotic transcriptional activators work.  
*Nature* **335**, 683-689.
- Ptashne,M. and A.A.F.Gann. (1990).  
Activators and targets.  
*Nature* **346**, 329-331.
- Pugh,B.F. and R.Tjian. (1990).  
Mechanism of transcriptional activation by Sp1 : evidence for coactivators.  
*Cell* **61**, 1187-1197.
- Punyammalee,B., Crabeel,M., de Lannoy,C., Perbal,B. and N.Glansdorff. (1991).  
Two *c-myb* proteins differing by their aminotermini exhibit different transcriptional transactivation activities.  
*Oncogene* **6**, 11-19.
- Quéva,C., Ness,S.A., Grasser,F.A., Graf,T., Vandenbunder,B. and D.Stéhelin. (1992).  
Expression patterns of *c-myb* and *v-myb* induced myeloid-1 (*mim-1*) gene during the development of the chick embryo.  
*Development* **114**, 125-133.
- Radke,K., Beug,H., Kornfeld,S. and T.Graf. (1982).

- Transformation of both erythroid and myeloid cells by E26, an avian leukemia virus that contains the *myb* gene.  
*Cell* **31**, 643-653.
- Ramsay, R.G., Ikeda, K., Rifking, R.A. and P.A. Marks. (1986).  
Changes in gene expression associated with induced differentiation of erythroleukemia : protooncogenes, globin genes, and cell division.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 6849-6853.
- Ramsay, R.G., Ishii, S. and T.J. Gonda. (1992).  
Interaction of the Myb protein with specific DNA binding sites.  
*J. Biol. Chem.* **267**, 5656-5662.
- Ransone, L.J., Visvader, J., Sassone-Corsi, P. and I.M. Verma. (1989).  
*Fos-jun* interaction : mutational analysis of the leucine zipper domain of both proteins.  
*Genes and Dev.* **3**, 770-781.
- Ransone, L.J. and I.M. Verma. (1990).  
Nuclear proto-oncogenes *fos* and *jun*.  
*Annu. Rec. Cell. Biol.* **6**, 539- 557.
- Ransone, L.J., Visvader, J., Wamsley, P. and I.M. Verma. (1990).  
Trans-dominant negative mutants of *fos* and *jun*.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 3806-3810.
- Rao, V.N. and C.D. Reddy (1988).  
Structure, expression and alternative splicing of the human *c-ets-1* proto-oncogene.  
*Onc. Res.* **3**, 239-246.
- Rao, V.N. and E.S.P. Reddy. (1992).  
A divergent *ets*-related protein, *elk-1*, recognizes similar *c-ets-1* proto-oncogene target sequences and acts as a transcriptional activator.  
*Oncogene* **7**, 65-70.
- Rauscher III, F.J., Cohen, D.R., Curran, T., Bos, T.J., Vogt, P.K., Bohmann, D., Tjian, R. and B.R. Franza, Jr. (1988a).  
*Fos*-associated protein p39 is the product of the *jun* proto-oncogene.  
*Science* **240**, 1010-1016.
- Rauscher III, F.J., Voulakas, P.J., Franza, B.R. and T. Curran. (1988b).  
*Fos* and *jun* bind cooperatively to the AP-1 site : re-constitution *in vitro*.  
*Genes Dev.* **2** : 1687-1699.
- Ravel-Chapuis, P., Leprince, D., Pain, B., Domenget, C., Stéhelin, D., Samarut, J. and P. Jurdic. (1991).  
*v-myb* and *v-ets* cooperate for the mitogenic stimulation of primary fibroblasts by avian E26 retrovirus.  
*J. Virol.* **65**, 3928-3931.
- Reddy, C.D. and E.P. Reddy. (1989).  
Differential binding of nuclear factors to the intron 1 sequences containing the transcriptional pause site correlates with *c-myb* expression.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 7326-7330.

- Reddy,E.S.P. and V.N.Rao. (1991).  
*erg*, and *ets*-related gene, codes for sequence-specific transcriptional activators.  
*Oncogene* **6**, 2285-2289.
- Reed,J.C., Alpers,J.D., Nowell,P.C. and R.G.Hoover. (1986).  
Sequential expression of protooncogenes during lectin-stimulated mitogenesis of normal human lymphocytes.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 3982-3986.
- Reilly,C.F., Kindy,M.S., Brown,K.E., Rosenberg,R.D. and G.E.Sonenshein. (1989).  
Heparin prevents vascular smooth muscle cell progression through the G1 phase of the cell cycle.  
*J. Biol. Chem.* **264**, 6990-6995.
- RNA Tumour Viruses, Weiss,R., Teich,N., Varmus,M. and J.Coffin. (1982, 1985).  
Eds Cold Spring Harbor Laboratory.
- Rogers,S., Wells,R. and M.Rechsteine. (1986).  
Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins : the PEST hypothesis.  
*Science* **234**, 364-368.
- Rorth,P., Nerlov,C., Blasi,F. and M.Johnsen. (1990).  
Transcription factor PEA3 participates in the induction of urokinase plasminogen activator transcription in murine keartinocytes stimulated with epidermal growth factor or phorbol-ester.  
*Nuc. Acids. Res.* **18**, 5009-5017.
- Rosson,D. and E.P.Reddy. (1986).  
Nucleotide sequence of chicken *c-myb* complementary DNA and implications for *myb* oncogene activation.  
*Nature* **319**, 604-606.
- Rosson,D., Dugan,D. and E.P.Reddy. (1987).  
Aberrant splicing events that are induced by proviral integration : implications for *myb* oncogene activation.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 3171-3175.
- Roussel,M., Saule,S., Lagrou,C., Rommens,C., Beug,H., Graf,T. and D.Stehelin. (1979).  
Three new types of viral oncogene of cellular origin specific for haematopoietic cell transformation.  
*Nature* **281**, 452-455.
- Roux,P., Blanchard,J-M., Fernandez,A., Lamb,N., Jeanteur,P. and M.Piechaczyk. (1990).  
Nuclear localization of c-Fos, but not v-Fos proteins, is controlled by extracellular signals.  
*Cell* **63**, 341-351.
- Rovigatti,U., Watson,D.K. and J.J.Yunis. (1986).  
Amplification and rearrangement of Hu-*ets-1* in leukemia and lymphoma with involvement of 11q23.  
*Science* **232**, 398-400.
- Ruben,S., Perkins,A., Purcell,R., Joung,K., Sia,R., Burghoff,R., Haseltine,W.A. and C.A.Rosen. (1989).  
Structural and functional characterization of human immunodeficiency virus tat protein.  
*J. Virol.* **63**, 1-8.

- Ruscetti,S., Aurigemma,R.E., Yuan,C.C., Sawyer,S. and D.G.Blair. (1992).  
Induction of erythropoietin responsiveness in murine hematopoietic cells by the *gag-myb-ets*-containing ME26 virus.  
*J. Virol.* **66**, 20-26.
- Ryder,K., Lau,L.F. and D.Nathans. (1988).  
A gene activated by growth factors is related to the oncogene *v-jun*.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 1487-1491.
- Sacchi,N., Wendtner,C.M. and C.J.Thiele. (1991).  
Single-cell detection of *ets-1* transcripts in human neuroectodermal cells.  
*Oncogene* **6**, 2149-2154.
- Saikumar,P., Murali,R. and E.P.Reddy. (1990).  
Role of tryptophan repeats and flanking amino acids in Myb-DNA interactions.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 8452-8456.
- Sakura,H., Kanei-Ishii,C., Nagase,T., Nakagoshi,H., Gonda,T.J. and S.Ishii. (1989).  
Delineation of three functional domains of the transcriptional activator encoded by the *c-myb* proto-oncogene.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 5758-5762.
- Sassone-Corsi,P., Lamph,W.W., Kamps,M. and I.M.Verma. (1988a).  
*fos*-associated cellular p39 is related to nuclear transcription factor AP-1.  
*Cell* **54**, 553-560.
- Sassone-Corsi,P., Ransone,L.J., Lamph,W.W. and I.M.Verma. (1988b).  
Direct interaction between *fos* and *jun* nuclear oncoproteins : role of the "leucine zipper" domain.  
*Nature* **336**, 692-695.
- Sassone-Corsi,P., Sisson,J.C. and I.M.Verma. (1988c).  
Transcriptional autoregulation of the proto-oncogene *fos*.  
*Nature* **334**, 314-319.
- Sassone-Corsi,P., Ransone,L.J. and I.M.Verma. (1990).  
Cross-talk in signal transduction : TPA-inducible factor *jun/AP-1* activates cAMP-responsive enhancer elements.  
*Oncogene* **5**, 427-431.
- Schneikert,J., Lutz,Y. and B.Wasylyk. (1992).  
Two independent activation domains in *c-ets-1* and *c-ets-2* located in non-conserved sequences of the *ets* gene family.  
*Oncogene* **7**, 249-256.
- Schuermann,M., Neuberg,M., Hunter,J.B., Jenuwein,T., Ryseck,R-P., Bravo,R. and R.Müller. (1989).  
The leucine repeat motif in *fos* protein mediates complex formation with *jun/AP-1* and is required for transformation.  
*Cell* **56**, 507-516.
- Schüle,R., Rangarajan,P., Kliewer,S., Ransone,L.J., Bolado,J., Yang,N., Verma,I.M. and R.M.Evans. (1990a).  
Functional antagonism between oncoprotein *c-jun* and the glucocorticoid receptor.  
*Cell* **62**, 1217-1226.



- Schüle,R., Umesono,K., Mangelsdorf,D.J., Bolado,J., Pike,J.W. and R.M.Evans. (1990b).  
*Jun-fos* and receptors for vitamins A and D recognize a common response element in the human osteocalcin gene.  
*Cell* **61**, 497-504.
- Schüle,R., Rangarajan,P., Yang,N., Kliewer,S., Ransone,L.J., Bolado,J., Verma,I.M. and R.M.Evans. (1991).  
 Retinoic acid is a negative regulator of AP-1-responsive genes.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 6092-6096.
- Schüle,R. and R.M.Evans. (1991).  
 Cross-coupling of signal transduction pathways : zinc finger meets leucine zipper.  
*TIG* **7**, 377-381.
- Schütte,J., Viallet,J., Nau,M., Segal,S., Fedorko,J. and J.Minna. (1989).  
*jun-B* inhibits and *c-fos* stimulates the transforming and Trans-activating activities of *c-jun*.  
*Cell* **59**, 987-997.
- Selvakumaran,M., Liebermann,D.A. and B.Hoffman-Liebermann. (1992).  
 Deregulated *c-myb* disrupts interleukin-6- or leukemia inhibitory factor-induced myeloid differentiation prior to *c-myc* : role in leukemogenesis.  
*Mol. Cell. Biol.* **12**, 2493-2500.
- Seth,A. and T.S.Papas. (1990).  
 The *c-ets-1* proto-oncogene has oncogenic activity and its positively autoregulated.  
*Oncogene* **5**, 1761-1767.
- Shen-Ong,G.L.C., Potter,M., Mushinski,J.F., Lavu,S. and E.P.Reddy. (1984).  
 Activation of the *c-myb* locus by viral insertional mutagenesis in plasmacytoid lymphosarcomas.  
*Science* **226**, 1077-1080.
- Shen-Ong,G.L.C., MorseIII, H.C., Potter,M. and F.Mushinski. (1986).  
 Two modes of *c-myb* activation in virus-induced mouse myeloid tumors.  
*Mol. Cell. Biol.* **6**, 380-392.
- Shen-Ong,G.L.C. (1987).  
 Alternative internal splicing in *c-myb* RNAs occurs commonly in normal and tumor cells.  
*The EMBO J.* **6**, 4035-4039.
- Shen-Ong,G.L.C., Lüscher,B. and R.N.Eisenman. (1989).  
 A second *c-myb* protein is translated from an alternatively spliced mRNA expressed from normal and 5'-disrupted *myb* loci.  
*Mol. Cell. Biol.* **9**, 5456-5463.
- Shen-Ong,G.L.C. (1990).  
 The *myb* oncogene.  
*Biochim. Biophys. Acta* **1032**, 39-52.
- Shen-Ong,G.L.C., Skurla,R.M.,Jr., Owens,J.D. and J.F.Mushinski. (1990).  
 Alternative splicing of RNAs transcribed from the human *c-myb* gene.  
*Mol. Cell. Biol.* **10**, 2715-2722.
- Sheiness,D. and M.Gardinier. (1984).

Expression of a proto-oncogene (proto-*myb*) in hemopoietic tissues of mice.  
*Mol. Cell. Biol.* **4**, 1206-1212.

Shipp, M.A. and E.L. Reinherz. (1987).  
Differential expression of nuclear proto-oncogenes in T cells triggered with mitogenic and nonmitogenic T3 and T11 activation signals.  
*J. Immunol.* **139**, 2143-2148.

Silver, P.A. (1991).  
How proteins enter the nucleus.  
*Cell* **64**, 489-497.

Simons, M., Edelman, E.R., Dekeyser, J-L., Langer, R. and R.D. Rosenberg. (1992).  
Antisense *c-myb* oligonucleotides inhibit intimal arterial smooth muscle cell accumulation *in vivo*.  
*Nature* **359**, 67-70.

Siu, G., Wurster, A.L., Lipsick, J.S. and Hedrick, S.M. (1992).  
Expression of the CD4 gene requires a Myb transcription factor.  
*Mol. Cell. Biol.* **12**, 1592-1604.

Slamon, D.J., Boone, T.C., Murdock, D.C., Keith, D.E., Press, M.F., Larson, R.A. and L.M. Souza. (1986).  
Studies of the human *c-myb* gene and its product in human acute leukemias.  
*Science* **233**, 347-351.

Smeyne, R.J., Schilling, K., Robertson, L., Luk, D., Oberdick, J., Curran, T. and J.I. Morgan. (1992).  
*Fos-lacZ* transgenic mice : mapping sites of gene induction in the central nervous system.  
*Neuron* **8**, 13-23.

Soret, J., Vellard, M., Martinerie, C. and B. Perbal. (1988).  
Organization of 5'-proximal *c-myb* exons in chicken DNA.  
*Febs Letters* **232**, 227-234.

Sotirov, N. (1981).  
Histone H5 in the immature blood cells of chicken with leukosis induced by avian leukosis strain E26.  
*J. Nat. Cancer Inst.* **66**, 1143-1149.

Stern, J.B. and K.A. Smith. (1986).  
Interleukin-2 induction of T-cell G1 progression and *c-myb* expression.  
*Science* **233**, 203-206.

Stern, S., Tanaka, M. and W. Herr. (1989).  
The Oct-1 homoeodomain directs formation of a multiprotein-DNA complex with the HSV transactivator VP16.  
*Nature* **341**, 624-630.

Sterneck, E., Blattner, C., Graf, T. and A. Leutz. (1992a).  
Structure of the chicken myelomonocytic growth factor gene and specific activation of its promoter in avian myelomonocytic cells by protein kinases.  
*Mol. Cell. Biol.* **12**, 1728-1735.

- Stiegler,P., Wolf,C-M., Baltzinger,M., Hirtzlin,J., Senan,F., Meyer,D., Ghysdael,J., Stéhelin,D., Befort,N. and P.Remy. (1990).  
Characterization of xenopus laevis cDNA clones of the *c-ets-1* proto-oncogene.  
*Nuc. Acids. Res.* **18**, 5298.
- Stober-Grässer,U. and J.S.Lipsick. (1988).  
Specific amino acid substitutions are not required for transformation by *v-myb* of avian myeloblastosis virus.  
*J. Virol.* **62**, 1093-1096.
- Stober-Grässer,U., Brydolf,B., Xu Bin,F., Grässer,R.A., Firtel and J.S.Lipsick. (1992).  
The Myb DNA-binding domain is highly conserved in Dictyostelium discoideum.  
*Oncogene* **7**, 589-596.
- Sudo,T., Miyazama,H., Hanaoka,F. and S.Ishii. (1992).  
The *c-myb* proto-oncogene product binds to but does not activate the promoter of the DNA polymerase  $\alpha$  gene.  
*Oncogene* **7**, 1999-2006.
- Thiele,C.J., Cohen,P.S. and M.A.Israel. (1988).  
Regulation of *c-myb* expression in human neuroblastoma cells during retinoic acid-induced differentiation.  
*Mol. Cell. Biol.* **8**, 1677-1683.
- Thiery,J.P. (1989).  
Cell adhesion in morphogenesis.  
Nato ASI series, Vol H26, Cell to Cell Signals in Mammalian Development. Edited by S.W.de Laat et al., Springer-Verlag Berlin Heidelberg 109-129.
- Thompson,C.B., Challoner,P.B., Neiman,P.E. and M.Groudine. (1986).  
Expression of the *c-myb* proto-oncogene during cellular proliferation.  
*Nature* **319**, 374-380.
- Thompson,C.C., Brown,T.A. and S.L.McKnight. (1991).  
Convergence of *ets*- and notch-related structural motifs in a heteromeric DNA binding complex.  
*Science*, **253**, 762-768.
- Thompson,C.B., Wang,C-Y., Ho,I-C., Bohjanen,P.R., Petryniak,B., June.C.H., Miesfeldt,S., Zhang,L., Nabel,G.J., Karpinski,B. and J.M.Leiden. (1992).  
*cis*-acting sequences required for inducible interleukin-2 enhancer function bind a novel Ets-related protein, Efl-1.  
*Mol. Cell. Biol.* **12**, 1043-1053.
- Tice-Baldwin,K., Fink,G.R. and K.T.Arndt. (1989).  
BAS1 has a *myb* motif and activates HIS4 transcription only in combination with BAS2.  
*Science* **246**, 931-935.
- Todokoro,K., Watson,R.J., Higo,H., Amanuma,H., Kuramochi,S., YanagisawaH. and Y.Ikawa. (1988).  
Down regulation of *c-myb* gene expression is a prerequisite for erythropoietin-induced erythroid differentiation.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 8900-8904.

- Torelli,G., Selleri,L., Donelli,A., Ferrari,S., Emilia,G., Venturelli,D., Moretti,L. and U.Torelli. (1985).  
Activation of *c-myb* expression by phytohemagglutinin stimulation in normal T lymphocytes.  
*Mol. Cell. Biol.* **5**, 2874-2877.
- Torelli,G., Venturelli,D., Colo,A., Zanni.C., Selleri,L., Moretti,L., Calabretta,B. and U.Torelli. (1987).  
Expression of *c-myb* protooncogene and other cell cycle-related genes in normal and neoplastic human colonic mucosa.  
*Cancer Res.* **47**, 5266-5269.
- Touray,M., Ryan,F., Jaggi,R. and F.Martin. (1991).  
Characterization of functional inhibition of the glucocorticoid receptor by *fos/jun*.  
*Oncogene* **6**, 1227-1234.
- Travali,S., Ferber,A., Reiss,K., Sell,C., Koniacki,J., Calabretta,B. and R.Baserga. (1991a).  
Effect of the *myb* gene product on expression of the PCNA gene in fibroblasts.  
*Oncogene* **6**, 887-894.
- Travali,S., Reiss,K., Ferber,A., Petralia,S., Mercer,W.E., Calabretta,B. and R.Baserga. (1991b).  
Constitutively expressed *c-myb* abrogates the requirement for insulin-like growth factor 1 in 3T3 fibroblasts.  
*Mol. Cell. Biol.* **11**, 731-736.
- Turner,R. and R.Tjian. (1989).  
Leucine repeats and an adjacent DNA binding domain mediate the formation of functional *c-fos-c-jun* heterodimers.  
*Science* **243**, 1989-1694
- Valtieri,M., Venturelli,D., Caré,A., Fossati,C., Pelosi,E., Labbaye,C., Mattia,G., Gewirtz,A.M., Calabretta,B. and C.Peschle. (1991).  
Antisense *myb* inhibition of purified erythroid progenitors in development and differentiation is linked to cycling activity and expression of DNA polymerase  $\alpha$ .  
*Blood* **77**, 1181-1190.
- Vandebunder,B., Pardanaud,L., Jaffredo,T., Mirabel,M.A. and D.Stéhelin. (1989).  
Complementary patterns of expression of *c-ets-1*, *c-myb* and *c-myc* in the blood forming system of the chick embryo.  
*Development* **106**, 265-274.
- Vandebunder,B. and D.Stéhelin. (1992).  
Le rétrovirus E26, une pierre de rosette pour l'étude sémantique des facteurs de transcription *c-ets-1* et *c-myb* ?  
*Annales de l'Institut Pasteur* **1**, 62-70.
- Van de Wetering,M., Oosterwegel,M., Dooijes,D. and H.Clevers. (1991).  
Identification and cloning of TCF-1, a lymphocyte-specific transcription factor containing a sequence-specific HMG box.  
*The EMBO J.* **10**, 123-132.
- Veals,S.A., Schindler,C., Leonard,D., Fu,X-Y., Aebersold,R., Darnell,J.E., Jr. and D.E.Levy. (1992).

Subunit of an alpha-interferon-responsive transcription factor is related to interferon regulatory factor and myb families of DNA-binding proteins.  
*Mol. Cell. Biol.* **12**, 3315-3324.

Vellard, M., Soret, J., Viegas-Pequignot, E., Galibert, F., Van Cong, N., Dutrillaux, B. and B. Perbal. (1991a).

*c-myb* proto-oncogene : evidence for intermolecular recombination of coding sequences.  
*Oncogene* **6**, 505-514.

Vellard, M., Soret, J., Sureau, A. and B. Perbal. (1991b).

A novel type of RNA-binding protein is potentially encoded by the opposite strand of the *trans*-spliced *c-myb* coding exon.

*C.R. Acad. Sci. Paris, t 313, Série III*, p 591-597.

Vellard, M., Sureau, A., Soret, J., Martinerie, C. and B. Perbal. (1992).

A potential splicing factor is encoded by the opposite strand of the *trans*-spliced *c-myb* exon.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 2511-1515.

Venturelli, D., Travali, S. and B. Calabretta. (1990).

Inhibition of T-cell proliferation by a MYB antisense oligomer is accompanied by selective down-regulation of DNA polymerase  $\alpha$  expression.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 5963-5967.

Wang V-Y., Petryniak, B., Ho, I-C., Thompson, C.B. and J.M. Leiden. (1992).

Evolutionarily conserved Ets family members display distinct DNA binding specificities.  
*J. Exp. Med.* **175**, 1391-1399.

Wasylyk, C., Flores, P., Gutman, A. and B. Wasylyk. (1989).

PEA3 is a nuclear target for transcription activation by non-nuclear oncogenes.  
*The EMBO J.* **8**, 3371-3378.

Wasylyk, B., Wasylyk, C., Flores, P., Begue, A., Leprince, D. and D. Stéhelin. (1990).

The *c-ets* proto-oncogenes encode transcription factors that cooperate with c-Fos and c-Jun for transcriptional activation.

*Nature* **346**, 191-193.

Wasylyk, C., Gutman, A., Nicholson, R. and B. Wasylyk. (1991).

The c-Ets oncoprotein activates the stromelysin promoter through the same elements as several non-nuclear oncoproteins.

*EMBO J.* **10**, 1127-1134.

Wasylyk, C., Kerckaert, J.P. and B. Wasylyk. (1992a).

A novel modulator domain of Ets transcription factors.  
*Genes Dev.* **6**, 965-974.

Wasylyk, C. and B. Wasylyk. (1992b).

Oncogenic conversion alters the transcriptional properties of *ets*.

*Cell Growth and Dif.* **3**, 617-625.

Waterman, M.L., Fische, W.H. and K.A. Jones. (1991).

A thymus-specific member of the HMG protein family regulates the human T cell receptor  $C\alpha$  enhancer.

*Genes and Dev.* **5**, 656-669.

- Watson,D.K., Mc Williams,M.J., Nunn,M.F., Duesberg,P., S.J.O'Brien. and T.S.Papas. (1985).  
The *ets* sequence from the transforming gene of avian erythroblastosis virus, E26, has unique domains on human chromosomes 11 and 21 : both loci are transcriptionally active.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 7294-7298.
- Watson,D.K., Mc Williams,M.J., Kozak,C., Reeves,R., Gearhart,J., Nunn,M.F., Nash,W., Fowle,III,J.R., Duesberg,P., Papas,T.S. and S.J.O'Brien. (1986).  
Conserved chromosomal positions of dual domains of the *ets* protooncogene in cats, mice, and humans.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 1792-1796.
- Watson,D.K., Mc Williams,M.J. and T.S.Papas. (1988a).  
Molecular organization of the chicken *ets* locus.  
*Virology* **164**, 99-105.
- Watson,D.K., Mc Williams,M.J. and T.S.Papas. (1988b).  
A unique amino-terminal sequence predicted for the chicken proto-*ets* protein.  
*Virology* **167**, 1-7.
- Watson,D.K., Mc Williams,M.J., Lapis,P., Lautenberger,J.A., Schweinfest,C.W. and T.S.Papas. (1988c).  
Mammalian *ets-1* and *ets-2* genes encode highly conserved proteins.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 7862-7866.
- Watson,D.K., Ascione,R. and T.S.Papas. (1990).  
Molecular analysis of the *ets* genes and their products.  
*Oncogenesis* **1**, 409-436.
- Watson,R.J., Dyson,P.J. and J.Mc Mahon. (1987).  
Multiple *c-myb* transcript cap sites are variously utilized in cells of mouse haemopoietic origin.  
*The EMBO J.* **6**, 1643-1651.
- Watson,R.J. (1988a).  
A transcriptional arrest mechanism involved in controlling constitutive levels of mouse *c-myb* mRNA.  
*Oncogene* **2**, 267-272.
- Watson,R.J. (1988b).  
Expression of the *c-myb* and *c-myc* genes is regulated independently in differentiating mouse erythroleukemia cells by common processes of premature transcription arrest and increased mRNA turnover.  
*Mol. Cell. Biol.* **8**, 3938-3942.
- Weber,B.L., E.H.Westin and M.F.Clarke. (1990).  
Differentiation of mouse erythroleukemia cells enhanced by alternatively spliced *c-myb* mRNA.  
*Science* **249**, 1291-1293.
- Weinstein,Y., Ihle,J.N., Lavu,S. and E.P.Reddy. (1986).  
Truncation of the *c-myb* gene by a retroviral integration in an interleukin 3-dependent myeloid leukemia cell line.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 5010-5014.

- Weinstein, Y., Cleveland, J.L., Askew, D.S., Rapp, U.R. and J.N. Ihle. (1987).  
Insertion and truncation of *c-myb* by murine leukemia virus in a myeloid cell line derived from cultures of normal hematopoietic cells.  
*J. Virol.* **61**, 2339-2343.
- Wernert, N., Raes, M.-B., Lassalle, P., Dehouck, M.-P., Gosselin, B., Vandebunder, B. and D. Stéhelin. (1992).  
*Am. J. Pathol.* **140**, 119-127.
- Westin, E.H., Gallo, R.C. Arya, S.K. Eva, A., Souza, L.M., Baluda, M.A., Aaronson, S.A. and F. Wong-Staal. (1982).  
Differential expression of the *amv* gene in human hematopoietic cells.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 2194-2198.
- Westin, E.H., Gorse, K.M. and Clarke, M.F. (1990).  
Alternative splicing of the human *c-myb* gene.  
*Oncogene* **5**, 1117-1124.
- Weston, K. and J.M. Bishop. (1989).  
Transcriptional activation by the *v-myb* oncogene and its cellular progenitor, *c-myb*.  
*Cell* **58**, 85-93.
- Weston, K. (1992).  
Extension of the DNA binding consensus of the chicken *c-myb* and *v-myb* proteins.  
*Nucl Acids. Res.* **20**, 3043-3049.
- Wilkinson, D.G., Bhatt, S., Ryseck, R.-P. and R. Bravo. (1989).  
Tissue-specific expression of *c-jun* and *junB* during organogenesis in the mouse.  
*Development* **106**, 465-471.
- Wilson, D.B., Dorfman, D.M. and S.H. Orkin. (1990).  
A nonerythroid GATA-binding protein is required for function of the human preproendothelin-1 promoter in endothelial cells.  
*Mol. Cell. Biol.* **10**, 4854-4862.
- Winqvist, R., Knuutila, S., Leprince, D., Stéhelin, D. and K. Alitalo. (1984).  
Mapping of amplified *c-myb* oncogene, sister chromatid exchanges, and karyotypic analysis of the COLO 205 colon carcinoma cell line.  
*Cancer Gen. and Cytog.* **18**, 251-264.
- Wolf, C.-M., Stiegler, P., Baltzinger, M., Meyer, D., Ghysdael, J., Stéhelin, D., Belfort, N., and P. Rémy (1991).  
Expression of two *xenopus laevis* *c-ets-2* proto-oncogenes during oogenesis and embryogenesis.  
*Cell Growth Dif.* **2**, 447-456.
- Woods, D.B., Ghysdael, J. and M.J. Owen. (1992).  
Identification of nucleotide preferences in DNA sequences recognised specifically by c-ETS-1 protein.  
*Nuc. Acids Res.* **20**, 699-704.
- Xin, J.-H., Cowie, A., Lachance, P. and J.A. Hassell. (1992).  
Molecular cloning and characterization of PEA3, a new member of the *ets* oncogene family that is differentially expressed in mouse embryonic cells.  
*Genes and Dev.* **6**, 481-496.

Yang-Yen,H-F., Chambard,J-C., Sun,Y-L., Smeal,T., Schmidt,T.J., Drouin,J. and M.Karin. (1990).

Transcriptional interference between *c-jun* and the glucocorticoid receptor : mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction.  
*Cell* **62**, 1205-1215.

Yokota,S., Yuan,D., Katagiri,T., Eisenberg,R.A., Cohen,P.L. and J.P-Y.Ting. (1987).

The expression and regulation of *c-myb* transcription in B6/lpr *lyt-2*<sup>-</sup>, L3T4<sup>-</sup> lymphocytes.  
*J. Immunol.* **139**, 2810-2817.

Yuan,C.C., Kan,N., Dunn,K.J., Papas,T.S. and D.G.Blair. (1989). Properties of a murine retroviral recombinant of avian acute leukemia virus E26 : a murine fibroblast assay for *v-ets* function.

*J. Virol.* **63**, 205-215.

Zhang,X-K., Wills,K.N., Husmann,M., Hermann,T. and M.Pfahl. (1991).

Novel pathway for thyroid hormone receptor action through interaction with *jun* and *fos* oncogene activities.

*Mol. Cell. Biol.* **11**, 6016-6025.

Zerial,M., Toschi,L., Ryseck,R-P., Schuermann,M., Müller,R. and R.Bravo. (1989).

The product of a novel growth factor activated gene, *fosB* interacts with *jun* proteins enhancing their DNA binding activity.

*EMBO J.* **8**, 805-813.

Zobel,A., Kalkbrenner,F., Guehmann,S., Nawrath,M., Vorbrueggen,G. and K.Moelling. (1991).

Interaction of the *v-* and *c-Myb* proteins with regulatory sequences of the human *c-myc* gene.  
*Oncogene* **6**, 1397-1407.





## RESUME

Le rétrovirus leucémogène aviaire E26 induit une leucémie mixte érythroïde et myéloïde et transforme des progéniteurs hématopoïétiques très immatures. Le rétrovirus E26 a transduit deux séquences d'origine cellulaire, les oncogènes *v-myb* et *v-ets*, responsables des propriétés transformantes de E26. *v-myb* et *v-ets* coopèrent dans la transformation des cellules hématopoïétiques *in vitro* et leur expression sous la forme d'une protéine de fusion, la P135 $\Delta$ gag-myb-ets, est nécessaire pour l'activité leucémogène de E26. *v-myb* et *v-ets* dérivent des proto-oncogènes *c-myb* et *c-ets-1* qui codent des facteurs de transcription. Pour évaluer la possibilité de l'existence d'interférences entre les protéines c-Myb et c-Ets-1 et pour appréhender leurs rôles *in vivo*, nous avons entrepris une étude détaillée de l'expression de ces proto-oncogènes au cours du développement embryonnaire du poulet.

Nous avons d'abord décrit l'expression de *c-myb* et en parallèle celle de *mim-1*, un gène cible de la P135 $\Delta$ gag-myb-ets. Nous avons démontré que c-Myb transactive le promoteur de *mim-1* *in vitro*. Cependant, dans l'embryon, les transcrits *c-myb* détectés dans les cellules lymphoïdes, érythroïdes et épithéliales en prolifération ne sont jamais associés avec la transcription de *mim-1*. Nous avons ensuite confirmé l'expression spécifique de *mim-1* lors de la différenciation granulocytaire. Les transcrits *c-myb* et *mim-1* s'accumulent dans la rate et le pancréas, au moment où a lieu la granulopoïèse. Par contre, *mim-1* est transcrit en l'absence de *c-myb* dans les précurseurs granulocytiques du sac vitellin et de la bourse de Fabricius. Ces résultats suggèrent que, selon l'environnement dans lequel s'effectue la différenciation granulocytaire, la transcription de *mim-1* est régulée par différents mécanismes et que *c-myb* participe à l'un de ces mécanismes.

En parallèle, nous avons étudié l'expression des deux facteurs de transcription, la p54<sup>c-ets-1</sup> et la p68<sup>c-ets-1</sup>, codés par le proto-oncogène *c-ets-1* chez le poulet. Dans l'embryon, les transcrits *c-ets-1* sont détectés de manière transitoire dans les cellules d'origine mésodermique et mésothéliale. L'expression de *c-ets-1* est induite lors de la gastrulation dans les cellules du mésoderme qui migrent dans le blastocoele. Plus tard, la p54<sup>c-ets-1</sup> et la p68<sup>c-ets-1</sup> s'accumulent dans les cellules qui subissent une transition épithélium-mésenchyme, dans les cellules du mésenchyme qui interagissent avec un épithélium et dans les cellules endothéliales au cours de la vascularisation des organes. Les transcrits codant la p54<sup>c-ets-1</sup> et la p68<sup>c-ets-1</sup> sont également détectés dans des cellules érythroïdes immatures des îlots sanguins extraembryonnaires. Dans les cellules lymphoïdes, la p54<sup>c-ets-1</sup> est abondante, alors que la p68<sup>c-ets-1</sup> n'est pas détectable. Ces résultats indiquent que la p54<sup>c-ets-1</sup> et la p68<sup>c-ets-1</sup> pourraient avoir des rôles distincts et spécifiques au cours du développement.

En conclusion, nos travaux ont permis de délimiter le champ d'action des protéines c-Myb et c-Ets-1 et d'identifier des cellules dans lesquelles elles seraient susceptibles de former un complexe transitoire qui serait stabilisé dans la P135 $\Delta$ gag-myb-ets, le produit oncogénique du rétrovirus E26.

