UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

THESE

présentée pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

PAR

Nathalie MARTIN-SOUDANT

Activation oncogénique de c-ets-1:

importance de l'isoleucine 445 située dans le domaine de liaison à l'ADN de c-Ets-1, mutée en valine dans sa version oncogénique v-Ets du rétrovirus aviaire E26

Présentée le 13 Juillet 1995 devant la Commission d'examen:

Président:

Pr A. VERBERT

Rapporteurs: Dr B. WASYLYK

Dr P. JURDIC

Examinateurs: Dr D. LEPRINCE

Pr D. STEHELIN

Je remercie A. Verbert, B. Wasylyk et P. Jurdic d'avoir accepté d'être les membres de mon Jury.

Merci à Domique Stehelin qui m'a permis de participer à la vie du laboratoire.

Merci beaucoup à Dominique Leprince qui, de près ou d'un peu plus "loin", a toujours été très présent pour les manips et pour les discussions.

Merci à Anne-Claire Flourens pour les précieux conseils techniques et les bons moments de voisinage que nous avons partagés.

A Olivier Albagli, merci pour les discussions enrichissantes et les manips communes.

Je remercie également Pascale Crépieux qui a guidé la "petite-mais-quandmême-insolente" pour les tous premiers pas dans le monde de la Biologie Moléculaire, un monde qui paraissait bien étrange.

Merci aussi à Christian Lagrou que j'ai souvent interviewé sur les moyens de "choyer" nos petites cellules.

Merci à Agnès Bègue, toujours prête à mettre en route une culture à des heures très matinales.

Merci à Elisabeth Ferreira, pleine de générosité.

Je remercie Nathalie Dutheil pour son aide dans la réalisation des figures.(L'appel de 11h30 restera toujours sacré).

Merci à Sophana pour ses talents d'artiste dessinateur et photographe.

Je remercie Nini et Marie-christine pour leur courage et leur aide si généreusement proposée.

Je remercie aussi Thierry Dupressoir qui a vite compris qu'il vallait mieux me montrer comment utiliser les logiciels plutôt que de l'expliquer simplement par oral.

Merci à Daniel Lazarecki qui m'a étonnée par son efficacité dans la réalisation des travaux photos.

Merci à Corinne et Pascal qui se sont imposés des séances de déchiffrage.

Merci beaucoup à Guillaume qui a toujours eu confiance en moi, m'a aidée dans tous les instants et s'est reconverti en "secrétaire" pour me permettre de rester dans les temps.

Merci à Marie-Claire Langlois, Frédéric Gilles, Anne Beuscart, Anne Chotteau ainsi qu'à tous ceux qui ont permis que le labo soit aussi un lieu où on y rencontre des amis.

C'est en fait à toutes les personnes qui m'ont permis d'en arriver là que j'adresse mes remerciements.

Articles:

1. A residue of the ETS domain mutated in the v-ets oncogene is essential for the DNA-binding and transactivating properties of Ets-1 and Ets-2 proteins.

N.SOUDANT, O. ALBAGLI, P. DHORDAIN, A. FLOURENS. D. STEHELIN and D. LEPRINCE.

Nucleic Acids Research, 1994, Vol. 22, No. 19, 3871-3879

2. A model for gene evolution of the ets-1/ets-2 transcription factors based on structural and functional homologies. O.ALBAGLI, N.SOUDANT, E.FERREIRA, P.DHORDAIN, F.DEWITTE, A.BEGUE, A.FLOURENS, D.STEHELIN and D.LEPRINCE.

Oncogene, 1994, Vol. 9, 3259-3271 (*)

Présentation de "posters" en congrès:

1. Comparative analysis of the binding properties of various c-Ets-1 and v-Ets proteins to the EBS motif.

N. SOUDANT, D. STEHELIN AND D. LEPRINCE.

Cold Spring Harbor Meeting on Cancer Cells: "Mechanisms of eucaryotic transcription."

1-5 Septembre, 1993. (abstract 206).

2.A single point mutation in the ETS domain alters in vitro binding and *in vivo* transactivating properties of Ets-1 and Ets-2 proteins. N. SOUDANT, O. ALBAĞLİ, P. DHORDAIN, A. FLOURENS, D. STEHELIN and D. LEPRINCE. EMBL Conference: "Oncogenes and growth control"

18-21 Avril, 1994. (abstract 224).

3. Structural and functional similarities unravel an ancient and common origin for the N-terminal transactivating domains of p68^c ets-1 and p58c-ets-2: implications for the ets genes evolution. O.ALBAGLI, N.SOUDANT, E.FERREIRA, P.DHORDAIN, F.DEWITTE, A.FLOURENS, D.STEHELIN and D.LEPRINCE. EMBL Conference: "Oncogenes and growth control" 18-21 Avril, 1994. (abstract 136).

(*) Par souci d'homogénéité, les données de cet article n'ont pas été développées dans la partie "résultats" de ce mémoire. Elles ont été énoncées dans la 3ème partie de l'introduction.

SOMMAIRE

ABREVIATIONS
INTRODUCTION 10 1ère partie: le virus E26, les gènes v -ets et c -ets-1 10 1. Le rétrovirus E26 10 1.1 structure du rétrovirus/ découverte de v -ets 10 1.2 Homologies c - myb/v - myb - E 26 10 1.3 fusion gag - myb - ets -1 11 1.4 De v -ets à c -ets-1 11 2. Activités transformantes de E26 14 2.1. Structure de la P135 Δ gag- myb -ets 14
1ère partie: le virus E26, les gènes v -ets et c -ets-1 10 1. Le rétrovirus E26 10 1.1 structure du rétrovirus/ découverte de v -ets 10 1.2 Homologies c - myb/v - myb - E 26 10 1.3 fusion gag - myb -ets-1 11 1.4 De v -ets à c -ets-1 11 2. Activités transformantes de E26 14 2.1. Structure de la P135 Δ gag- myb -ets 14
1. Le rétrovirus E26 10 1.1 structure du rétrovirus/ découverte de v - e ts 10 1.2 Homologies c - myb/v - myb E26 10 1.3 fusion gag - myb - e ts-1 11 1.4 De v - e ts à c - e ts-1 11 2. Activités transformantes de E26 14 2.1. Structure de la P135 Δ gag- m yb-ets 14
1.1 structure du rétrovirus/ découverte de v - ets 10 1.2 Homologies c - myb/v - myb E26 10 1.3 fusion gag - myb - ets -1 11 1.4 De v - ets à c - ets -1 11 2. Activités transformantes de E26 14 2.1. Structure de la P135 Δ gag- myb -ets 14
1.2 Homologies c - myb/v - myb E26 10 1.3 fusion gag - myb - ets -1 11 1.4 De v - ets à c - ets -1 11 2. Activités transformantes de E26 14 2.1. Structure de la P135 Δ gag- myb -ets 14
1.3 fusion gag - myb - ets -1
1.4 De v - ets à c - ets -1
2. Activités transformantes de E26
2.1. Structure de la P135 Δ gag-myb-ets
2.2 (3-11) 1 - 1 - 2 - 3 - 3 - 3 - 3 - 3 - 3 - 3 - 3 - 3
2.2. Cellules hématopoïétiques15
2.2.1. Cellules cibles
2.2.2. Contribution de v - myb au pouvoir transformant
de E2616
2.2.3. Contribution de <i>v-ets</i> au pouvoir transformant
de E26
2.2.4. fusion <i>v-myb - v-ets</i> 20
2.3. Gènes-cibles
2.3.1. <i>mim-1</i>
2.3.2. <i>GATA-1</i> 23
2.3.3. rem23
2.4. Coopération Myb-Ets dans d'autres cellules24
2.4.1. Fibroblastes
2.4.2. Cellules de neurorétine de poulet25
2ème partie: le domaine de liaison à l'ADN (DBD: DNA Binding
Domain)
1. Capacité de liaison à l'ADN
2. Définition du domaine de liaison à l'ADN
3. Domaine ETS et famille Ets
3.1. Homologie
3.2. Histoire évolutive des membres de la famille Ets, selon
le domaine de liaison à l'ADN
4. Fixation spécifique
4.1. Cible nucléotidique 31
4.2. Spécificité de fixation33 5. Modification de la liaison à l'ADN35
5.1. Modification de la fixation par régions régulatrices35

5.1.1. Régions régulatrices dans les protéines Ets-1	et
Ets-2	
5.1.2. Région régulatrice dans la protéine Elk-1	38
5.1.3. Région régulatrice dans la protéine Erp/Net	39
5.2. Modification de la fixation par phosphorylation	et
épissages alternatifs	39
5.3. Modification de la fixation par interaction	on
intermoléculaire	41
5.4. Modification de la fixation par compétition sur la cib	ole
ADN	41
5.4.1. Pax	41
5.4.2. NFAT	42
6. Structure du domaine ETS	42
6.1. Avant les données de structures 2D et 3D	42
6.2. Structures 2D et 3D	43
3ème Partie: la famille Ets: des facteurs de transcription	46
1. La fonction de facteur de transcription	
1.1. Domaines transactivateurs (TA)	
1.2. un modèle d'évolution basé sur la conservation de	la
séquence BEC	47
2. Coopération Ets/ autres facteurs	
2.1. Interaction des protéines de la famille Ets avec leu	ırs
partenaires	49
2.1.1. GABPα/ GABPβ	49
2.1.2. Pu-1/NF-EM5	
2.1.3. Elf-1/Rb	51
2.1.4. TCF: Elk ou Sap/ SRF/ SRE	
2.1.5. Ets-1/ CBF	
2.1.6. Le complexe multi-protéique	
Ets-1/PEBP2 α /ATF/LEF-1	53
2.2. Coopération sans interaction démontrée	
2.2.1. Lyf-1/ Ets-1 ou Fli-1	
2.2.2. E12/ Erg ou Fli-1	54
2.2.3. Ets-1/ autres partenaires	54
2.2.4. Ets-1/ Ap-1	54
2.3. Régulation du même gène par Ets et d'autres facteu	
pour la spécificité d'expression	
3. Autres modes de régulation de l'activité des protéines Ets	56
3.1. Les protéines Ets	
3.2. Phosphorylation et transduction des signa	
extracellulaires	
4ème partie: Rôles physiologiques des protéines Ets	61
1. Gènes ou promoteurs régulés par les membres de la famille Ets	
1.1. Promoteur/"enhancers" cellulaires	
1.1.1. Ontogenèse des cellules du systèr	
immunitaire	
1.1.2. Importance des motifs Ets dans les régio	

régulatrices des gènes spécifiques de la lignée	
myélo-monocytaire	.63
1.1.3. Les protéines Ets dans les mastocytes et	
mégacaryocytes	.64
1.1.4. Régulation de l'expression des métalloprotéases	
par les protéines Ets	.64
1.1.5. Les protéines Ets pour l'initiation de la	
transcription	
1.2. "Enhancers" viraux	.65
2. Les protéines Ets dans le développement embryonnaire	.65
2.1. Développement de la drosophile	.65
2.2. Développement du xénope	.67
2.3. Développement des Vertébrés: poulet et souris	.68
5ème partie: Propiétés oncogéniques	.70
1. Sur-expression.	.70
1.1. Transformation par sur-expression	.70
1.2. Ets-1 "suppresseur de tumeur"	.71
2. Insertion provirale	
2.1. Virus de Friend	.72
2.2. Virus Cas-Br-E: même site d'intégration, mais	
conséquences différentes	
2.3. spi-1/pu-1 et fli-1: sites d'intégration différents et	
conséquences identiques (érythroleucémies de Friend dans	
les deux cas)	
2.4. Autres gènes ets impliqués dans des leucémies murines	
3. Translocation	
3.1. Translocations EWS/Fli-1, EWS/Erg et EWS/Etv-1	.76
3.1.1. Fli	
3.1.2. Erg	
3.1.3. Etv-1	
3.2. Sarcome biphénotypique et EWS-Fli-1	.78
3.3. TLS/FUS-Erg	.79
3.4. Tel	
3.4.1. Tel/PDGFRb	
3.4.2. Tel/Abl	
3.4.3. Tel/MN1	
3.5. Autres translocations	
4. Implications dans d'autres tumeurs	.82
4.1. Irrigation et invasion tumorales	
4.2. Cancers du sein	
4.3. Lignée hématopoïétique	
4.4. "Down Syndrome"	.84
RESULTATS	.86
1. mise au point des conditions expérimentales	
2. Etude de la mutation ponctuelle I445V de l'oncogène <i>v-ets</i> , mutation B.	
2.1. Contraintes structurales	.94

2.2. Le codon ATC de l'isoleucine 445 aurait pu être muté en	105
DISCUSSION ET RESULTATS EN COURS	109
La mutation B dans la protéine v-Ets Propriétés oncogéniques de E26	
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	121

RESUME

La famille Ets regroupe un ensemble de gènes apparentés dont la conservation phylogénique s'étend des Arthropodes aux Vertébrés supérieurs. Ces gènes codent des protéines qui, pour la plupart, ont été démontrées comme étant des facteurs de transcription. Leur appartenance à la grande famille Ets est basée sur la détention d'un domaine de 85 acides aminés, plus ou moins homologue entre les différents membres, qui a été baptisé domaine ETS. Celui-ci a été déterminé comme étant le domaine responsable de la capacité de liaison à l'ADN mise en évidence pour toutes ces protéines. Ainsi, leur activité régulatrice de la transcription passe par la reconnaissance d'une séquence riche en bases puriques GGAA/T, identifiée au sein de nombreuses séquences promotrices ou régulatrices virales et cellulaires.

L'acquisition de propriétés oncogéniques, suite à diverses modifications, a été observée pour plusieurs gènes de la famille, à commencer par le gène *c-ets-1*. Le proto-oncogène *c-ets-1* aviaire a été caractérisé à la suite du clonage de l'oncogène *v-ets*, transduit par le rétrovirus E26. Par épissage alternatif, deux facteurs de transcription sont générés à partir du locus *c-ets-1*. Il s'agit des protéines p54c-ets-1 et p68c-ets-1 qui ne diffèrent que par leur extrémité amino-terminale, codée par l'exon I⁵⁴ pour p54 et les exons α et β pour p68. Ces derniers sont colinéaires à l'extrémité 5' de *v-ets*. Au sein du domaine codé par l'exon β, la séquence BEC a été mise en évidence. Elle est retrouvée dans le domaine transactivateur correspondant de la protéine Ets-2 et a été montrée importante d'un point de vue fonction transcriptionnelle. Un modèle d'évolution des gènes *ets-1* et *ets-2* a été basé sur les homologies structurale et fonctionnelle de cette séquence.

v-Ets diffère de son progéniteur cellulaire p68c-ets-1 (i) par la fusion avec le gène viral gag et la séquence myb^{E26} dans la protéine virale P135Δgag-myb-ets, (ii) par deux mutations ponctuelles qui remplacent d'une part l'alanine, en position 285 dans p68c-ets-1, et d'autre part l'isoleucine 445, située dans le domaine de fixation à l'ADN de la p68c-ets-1, par une valine, et (iii) par le remplacement des 13 derniers acides aminés carboxy-terminaux de la protéine c-Ets-1 par 16 acides aminés différents dans v-Ets. Dans l'optique de comprendre les mécanismes d'activation oncogénique, l'étude du rôle des différences existant entre le gène cellulaire et le gène viral a été abordée. Les résultats présentés ici révélent une notable relation "structure-fonction" dans la protéine c-Ets-1: l'acide aminé 445 est essentiel pour les propriétés de liaison à l'ADN et de transactivation des protéines Ets-1 et Ets-2, probablement par sa localisation entre deux régions impliquées dans l'interaction de la protéine avec l'ADN, régions désignées par de récentes données structurales de RMN concernant le domaine ETS.

ABRÉVIATIONS

ADN: acide désoxy-ribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

AEV : Avian Erythroblastis virus AMV : Avian Myeloblastosis virus

ARN : acide ribonucléique ARNm : ARN messager

BSA : sérum albumine bovine

cMGF : chicken Myelomonocytic Growth Factor

DBD : DNA Binding Domain

DTT : dithiotréitol

EBS : Ets-Binding Site

F-MuLV : Friend Murine Leukemia Virus

HLH : Helix-Loop-Helix

HMG : High Mobility GroupHSV : Herpes Simplex Virus

HTH: Helix-Turn-Helix

HTLV-1 : Human Lymphotropic Virus-type1

IL-2 : interleukine 2

IPTG: isopropyl β D thiogalactopyranoside

kDa : kiloDalton

kpb : kilopaire de bases

LTR : Long Terminal Repeat

MAPkinase: Mitogen Activating Protein kinase

MSV : Moloney Sarcoma Virus

pb : paire de bases

PCR : Polymerase Chain Reaction

PEA3 : polyome enhancer 3
RAV : Rous Associated Virus

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

RSV : Rous Sarcoma Virus

SFFV : Spleen Focus Forming Virus
SRE : Serum Response Element
SRF : Serum Response Factor

structure 2D: structure bidimensionnelle

structure 3D: structure tridimensionnelle

TA : domaine transactivateur

TCF : Ternary Complex Factor

TPA : Tumor Promoting Agent (12-O-tétra-décanoyl-phorbol-13-acétate)

Ck: poulet

D : drosophile

Hu: homme

Mu: souris

Su: oursin

X : xénope

Par convention, les gènes sont écrits en italique et les Protéines commencent par une majuscule.

PRESENTATION DU MEMOIRE

L'apparition de cancers ou autres maladies, les défauts dans le développement chez certains organismes font partie des "anomalies" fonctionnelles ou somatiques dont les causes ont été et sont encore recherchées. Ce sont, pour la plupart, des modifications géniques qui se traduisent par des conséquences qui bouleversent le fonctionnement normal au niveau cellulaire ou même au niveau organique. Les protéines, issues de ces gènes modifiés (aussi appelés proto-oncogènes ou c-onc, pour oncogènes cellulaires) ou dont l'environnement génomique a été changé, sont produites de façon différente du point de vue qualitatif et/ou quantitatif par rapport à ce qui est normalement prévu selon les paramètres "temps et espace". A l'origine ce sont par exemple des mutations, des translocations, délétions ou insertions dans le génome cellulaire ou encore l'insertion rétrovirale, la transduction de certains gènes par des rétrovirus (alors nommés v-onc, pour oncogènes viraux) qui ont permis de mettre en évidence l'influence des gènes et de leur régulation sur la croissance, la prolifération, la différenciation ou la mort cellulaire. La mise en place des organes et le développement embryonnaire font aussi partie de ces phénomènes qui sont régis par les événements qui, dans une cellule déterminée, constituent ce que l'on appelle la "cascade de signaux" partant de la stimulation par des modulateurs externes pour arriver à la régulation de la transcription/traduction. L'"avenir" de chaque cellule ne dépend pas du hasard.

Parmi les facteurs qui induisent des "anomalies", les rétrovirus transformants ont rapidement été repérés en laboratoire. C'est grâce à l'un d'entre eux, le rétrovirus E26 aux propriétés transductrices et transformantes particulières, que l'oncogène *v-ets* (pour <u>E-t</u>wenty-<u>six</u>), puis son homologue cellulaire *c-ets-1*, ont été isolés. Ce gène a été le premier d'une grande famille encore en expansion, la plupart des gènes qui y appartiennent codant des facteurs de transcription. Ceux-ci constituent l'un des maillons les plus importants de la cascade qui aboutit à la régulation de la transcription. Les maillons précédants correspondent d'ailleurs aux régulateurs de l'activité des facteurs de transcription. Dans de nombreux cas, les facteurs de transcription agissent en se fixant sur des régions promotrices ou régulatrices ("enhancer": qui active, ou "silencer": qui réprime) au niveau de l'ADN, quoiqu'ils puissent de temps en temps agir sans liaison à l'ADN comme, par exemple, par coopération protéine-protéine. La liaison à l'ADN, qui peut ellemême être régulée par des modifications au niveau post-traductionnel ou au

niveau de l'environnement cellulaire, est donc l'une des fonctions les plus importantes, avec la transactivation, de ce type de protéines. Il n'est donc pas étonnant que l'étude des propriétés des rétrovirus oncogènes montre, dans de nombreux cas, que c'est par la modification de ces fonctions que passe l'acquisition de leur activité transformante. C'est pourquoi nous nous sommes penchés sur l'étude des effets des mutations présentes dans le gène *v-ets*, certainement occasionnées par les remaniements subis lors de la capture de la séquence cellulaire par le virus, sur les propriétés des protéines ainsi modifiées. La présentation du virus E26 et de la famille de facteurs de transcription Ets précède ici l'exposé et la discussion des résultats obtenus.

INTRODUCTION

<u>1ère partie</u>: le virus E26, les gènes *v-ets* et *c-ets-*1

1. Le rétrovirus E26

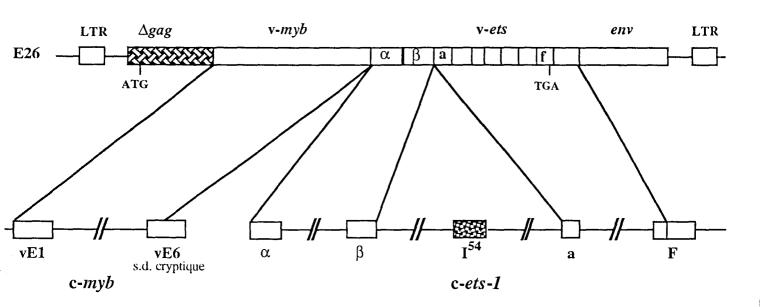
1.1 structure du rétrovirus/ découverte de *v-ets*

Le rétrovirus aviaire E26, isolé lors d'un criblage de virus à haut potentiel oncogénique (Ivanov et al., 1962), appartient au groupe des virus qui ont intégré des proto-oncogènes cellulaires mais sont défectifs pour leur réplication suite à la perte d'une partie de leur propre génome. Pour se propager et se répliquer, ils ont donc besoin d'un virus auxiliaire (dit "helper"), compétent pour la réplication, puisque possédant les gènes gag, pol et env qui vont donner les protéines de structure du virus (capside et enveloppe) et la transcriptase réverse. Le génome de E26 comporte des gènes gag et env tronqués, le gène v-myb, préalablement identifié (à quelques différences près) dans le rétrovirus AMV (Roussel et al., 1979), et le gène initialement appelé X (Roussel et al., 1979), rebaptisé v-ets (pour viral E-twenty-six). Ces séquences sont flanquées des deux LTR ("Long Terminal Repeat") qui sont les séquences promotrices de la transcription virale (Figure 1A). L'oncogène v-ets a été simultanément caractérisé, à partir de E26, par deux laboratoires (Leprince et al., 1983 ; Nunn et al., 1983). E26 se place ainsi parmi les quelques virus, déjà caractérisés, qui ont transduit deux oncogènes, comme les virus AEV (Roussel et al., 1979; Saule et al., 1981) et MH2 (Coll et al., 1983; Jansen et al., 1983; Kahn et al., 1983). Cependant, il possède la particularité d'exprimer les séquences traduites sous la forme d'une seule protéine de fusion : la $P135\Delta gag-myb-ets$ identifiée dans les cellules qu'il transforme, tant in vivo qu'in vitro (Klempnauer et al., 1984). A ce propos, E26 est capable d'induire des leucémies mixtes, myéloïdes et érythroïdes, à prédominance érythroïde chez le poulet et transforme, entre autres, les cellules hématopoïétiques in vitro (Moscovici et al., 1981 ; Radke et al., 1982 ; Graf et al., 1992).

1.2 Homologies c-myb/v-mybE26

L'oncogène v- myb^{AMV} (transduit dans le virus AMV), et son homologue cellulaire c-myb qui code un facteur de transcription, ayant déjà été caractérisés





B

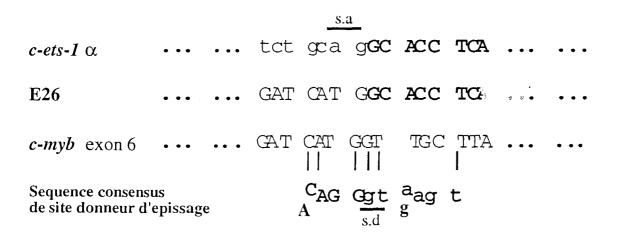


Figure 1 : A Structure et genèse du rétrovirus E26.

B La jonction *myb-ets* résulte d'un épissage aberrant entre un exon de *c-myb* et un exon de *c-ets-1*

s.d: site donneur

s.a: site accepteur

1.3 fusion *gag-myb-ets-1*

Le virus E26 exprime ses séquences LTR- Δgag -myb-cts- Δenv -LTR sous forme d'un ARN génomique de 5,7 kb. La protéine nucléaire P135 Δgag -myb-ets est traduite à partir d'un ATG situé dans le gène gag et se termine au codon stop situé 32 nucléotides en amont de la jonction ets- Δenv (Nunn et al., 1983 ; Boyle et al., 1984). On a vu que la jonction gag- Δmyb était située dans le premier exon de myb. La jonction myb-ets résulte probablement d'un épissage illégitime entre un site cryptique donneur dans l'exon 6 de c-myb et le site accepteur normal de l'exon α de c-ets-1 (Leprince et al., 1988) (Figure 1B).

1.4 De v-ets à c-ets-1

L'homologue cellulaire et progéniteur de *v-ets*, le proto-oncogène *c-ets-1*, a été cloné par criblage d'une banque d'ADN génomique de poulet avec des sondes spécifiques de *v-ets*. Le locus *c-ets-1* aviaire est composé de dix exons codants répartis sur 80 kpb (Gégonne *et al.*, 1987a) (Figure 2). Deux ARNm majoritaires de 7,5 kpb et deux ARNm minoritaires de 2,2 et 1,5 kpb sont issus de ce locus. Les deux ARNm majoritaires sont générés par un épissage alternatif dans la partie 5' du gène et présentent des sites d'initiation de la transcription distincts (Crépieux *et al.*, 1993). Ainsi, les exons 3' communs ,"a à F" (Leprince *et al.*, 1988) (ou III à IX selon Watson *et al.*, 1988), sont précédés soit de l'exon I⁵⁴ (ou A), soit des exons α et β (ou I et II) (Gégonne *et al.*, 1987a ; Duterque-Coquillaud *et al.*, 1988 ; Leprince *et al.*, 1988). Deux protéines distinctes mais apparentées sont alors traduites : la p54ck-c-ets-1 (avec l'exon I⁵⁴) et la p68ck-c-ets-1 (avec les exons α et β), les ARNm de ces protéines

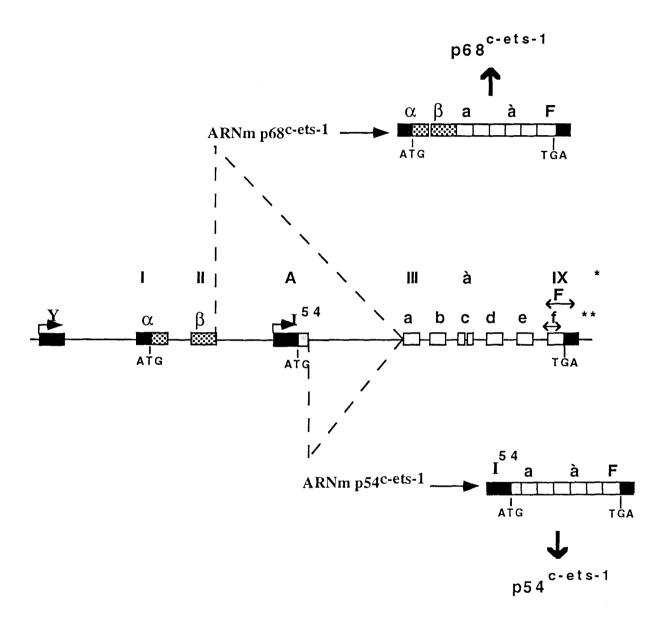


Figure 2 : Organisation génomique et expression du locus *c-ets-1* aviaire. Les séquences non-codantes sont en noir.

- * d'après Watson et al., 1988
- ** d'après Leprince et al., 1988

étant respectivement initiés au niveau des promoteurs situés en amont de l'exon I^{54} et en amont de l'exon Y (Crépieux *et al.*, 1993) (Figure 2). L'étude du génome de E26 et le clonage des ADNc correspondant aux deux protéines, ainsi que des expériences d'immunoprécipitation avec des anticorps spécifiques des régions amino- et carboxy-terminales de *v-ets*, ont déterminé que la partie *v-ets* de la $P^{135\Delta gag-myb-ets}$ était apparentée à la $p^{68c-ets-1}$ en ce qui concerne le domaine amino-terminal (exons α et β dans le génome de E26) (Ghysdael *et al.*, 1986a ; Gégonne *et al.*, 1987a ; 1987b ; Leprince *et al.*, 1988).

Le gène c-ets-1 ayant été retrouvé dans le génome de nombreuses autres espèces que le poulet, allant de la drosophile à l'Homme, les exons α et β n'ont été mis en évidence que chez les oiseaux et les reptiles (Albagli et al., 1992 ; 1994). Cependant chez l'homme et la souris, la p54ck-c-ets-1 (exon I54) trouve son équivalent, auquel s'ajoutent des produits issus d'épissages alternatifs ou ayant subi des événements de phosphorylation ou des modifications de groupement thiol (Hu-ets-1p39-51 : Jorcyk et al., 1991 ; mu-ets-1p63 ou p52 : Pognonec et al., 1990).

La découverte d'un gène très homologue à *ck-c-ets-1*, le gène *ck-c-ets-2* (Boulukos *et al.*, 1988), a introduit l'idée de parler d'une famille de gènes *Ets*. Puis les gènes *c-ets-1* et *c-ets-2* ont été mis en évidence chez des espèces beaucoup plus éloignées telles que le xénope (Stiegler *et al.*, 1990 ; Wolff *et al.*, 1990), la drosophile (Pribyl *et al.*, 1988) et l'oursin (Chen J.H. *et al.*, 1988). Récemment, Klämbt (1993) a identifié chez la drosophile un gène nommé *pointed* qui peut être considéré comme très proche du "gène ancestral" *ets-1/ets-2* non dupliqué. Nous détaillerons par la suite le rôle des protéines codées par les différents gènes de cette famille grandissante. Mais nous pouvons déjà préciser que toutes possèdent le domaine de liaison à l'ADN (ou DBD pour "DNA binding domain") dénommé domaine ETS, et pour la plupart, un ou deux domaines d'activation de la transcription et même, parfois, des domaines régulateurs de l'activité de liaison à l'ADN ou de régulation de la transcription.

Si c-ets-1 a été le progéniteur de la partie v-Ets de la P135 de E26, celle-ci présente néanmoins quelques différences (Figure 3) :

- deux mutations ponctuelles:
- * une alanine, en position 285 de la p68^{c-ets-1} (nomenclature Leprince *et al.*, 1988) est remplacée par une valine dans la P135: **mutation "A"**.
- * une isoleucine, située dans le domaine de liaison à l'ADN, en position 445, est remplacée également par une valine: mutation "B".
- à l'extrémité carboxy-terminale, les 13 derniers acides aminés codés par *c-ets-1* sont remplacés par 16 autres acides aminés complètement différents dont

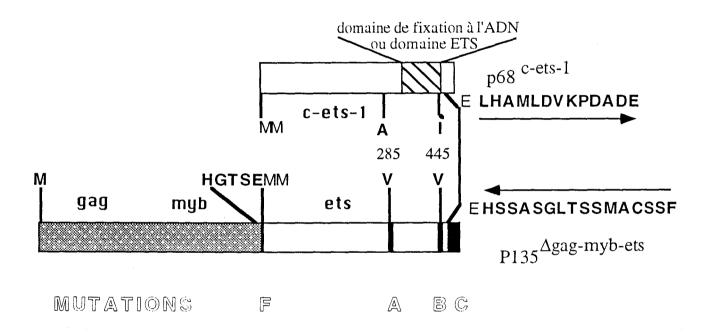


Figure 3 : Comparaison des protéines cellulaire et virale

on connaît l'origine depuis peu de temps (mutation "C"). Ils sont en fait codés par le brin complémentaire de celui codant les acides aminés carboxy-terminaux de *c-ets-1* (Lautenberger et Papas, 1993 ; Leprince *et al.*, 1993). Dans ce cas, le premier codon stop rencontré se situe 16 codons plus loin que la fin de l'homologie entre *c-ets-1* et *v-ets*. On ne sait pas encore comment cette inversion s'est réalisée, ni à quel moment au cours de la transduction mise en route par le virus E26.

- entre v-Myb et v-Ets, le cadre de lecture est gardé ouvert: il y a fusion des protéines, ceci entraînant les onze premiers nucléotides 5' non codants de *c-ets-1* à être codants dans la fusion (mutation "F").

D'autre part, à la suite du codon stop trouvé sur le brin complémentaire au brin codant de *c-cts-1*, on retrouve une séquence nucléotidique présentant une forte homologie avec le gène *env* du rétrovirus RAV-2 (Bova *et al.*, 1988; Lautenberger et Papas, 1993; Leprince *et al.*, 1993). Cette homologie se retrouve également sur la séquence de *v-ets* en amont du point de divergence *c-ets/v-ets* (Figure 4). Ceci suggère qu'un rétrovirus de type RAV-2 est intervenu dans la genèse du rétrovirus E26. A l'origine, lorsque l'homologie de séquence avec RAV-2 n'avait pas été découverte, les auteurs avaient remarqué une homologie avec le gène *env* du virus RSV Prc mais seulement 32 nucléotides après le codon stop (Nunn *et al.*, 1983). Ceux-ci étaient considérés comme une insertion, ce qui avait amené Zhang et Temin (1993b) à dire que E26 faisait partie des virus du groupe 2 dans leur classement : groupe 1, celui des virus aux séquences cellulaires et virales couplées par recombinaison homologue et groupe 2, celui dans lequel les virus subissent une insertion entre les deux séquences. L'appartenance de E26 au groupe 2 n'est donc plus justifiée.

Plusieurs hypothèses ont été formulées sur les mécanismes de transduction des oncogènes. L'une de ces hypothèses propose que, lors de la recombinaison d'un provirus à côté d'un proto-oncogène, sa transcription se poursuit au delà du site de polyadénylation virale. Le proto-oncogène est donc transcrit en même temps, suivi ou non d'un épissage anormal entre gènes viraux et cellulaires. Les ARN ainsi formés sont encapsidés avec des ARN viraux normaux. C'est par des recombinaisons dues à des changements de matrice d'un brin d'ARN sur l'autre que de nouveaux virus "transducteurs" sont alors créés (Swain et Coffin, 1992; Zhang et Temin, 1993a).

On peut supposer que c'est par un mécanisme de ce type qu'est né le rétrovirus E26. En fait, il montre un degré de complexité plus important que dans les rétrovirus qui transduisent une seule séquence cellulaire puisque plusieurs points de recombinaison sont retrouvés : entre Δgag et myb, entre myb et ets, et,

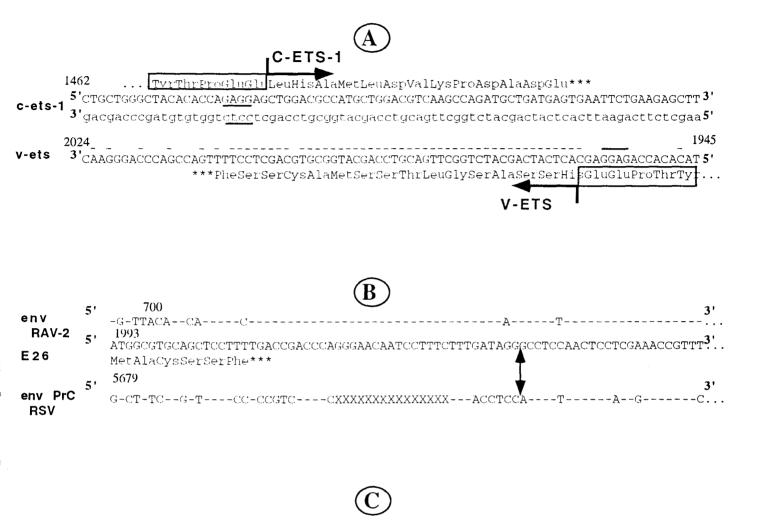


Figure 4 : Comparaison des extrémités carboxy-terminales des protéines c-Ets-1 et $P135^{\triangle}gag$ -myb-ets

c-ets-1

- (A) Origine de l'extrémité carboxy-terminale de v-ets
- B Homologie entre le gène v-ets et le gène env du rétrovirus RAV-2
- (C) Homologie entre c-ets-1 et le gène env de RAV-2

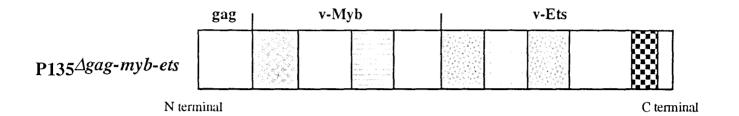
entre ets et Aenv. Ceci nous amène à nous poser de nombreuses questions. L'une d'entre elles consiste à se demander quels ont été les intermédiaires qui ont permis la naissance du virus E26, s'il y en a. En effet, soit on imagine que c-myb et c-ets ont été transduits en même temps par un mécanisme de recombinaison accidentelle illégitime, en une seule étape à partir d'une cellule ayant auparavant subi une translocation qui aurait rapproché les gènes c-myb et c-ets (Wu et Duesberg, 1994). Ou alors, on imagine que l'un des deux gènes a été transduit par un virus intermédiaire qui, lui-même s'est intégré près du second et l'a transduit. Dans ce cas, lequel des deux gènes tient le rôle de premier : myb ou ets? De plus, les différentes mutations observées dans les deux gènes viraux par rapport aux gènes cellulaires, notamment l'inversion des brins codant et complémentaire au niveau carboxy-terminal de v-ets, se sont-elles créées lors des remaniements par le virus ou y a-t-il eu plusieurs étapes qui ont permis d'obtenir des virus aux propriétés transformantes différentes ? Il sera impossible de répondre à toutes ces questions en toute certitude étant donné que les premiers isolats réalisés en Bulgarie en 1962 ont été perdus. Cependant, l'hypothèse des différentes étapes de transduction et de mutation est probable si on considère, comme certaines des études décrites par la suite le montrent, que les formes intermédiaires deviennent de plus en plus transformantes.

2. Activités transformantes de E26

2.1. Structure de la P135∆gag-myb-ets

Les portions de protéines correspondant aux domaines fonctionnels dans les protéines c-Myb et c-Ets sont présentes dans la protéine virale P135 Δ gag-myb-ets. On retrouve en effet les domaines de liaison à l'ADN de Myb et de Ets respectivement aux extrémités amino- et carboxy-terminales. De même, on retrouve les domaines qui ont été décrits comme responsables de la transactivation des protéines cellulaires: un pour c-Myb et deux pour la p68c-ets-1. Les deux domaines transactivateurs de la p68c-ets-1 sont codés par les exons [α/β] et [V/VI/5' de VII]. Ils encadrent un domaine régulateur (Myb : Klempnauer et Sippel, 1987 ; Weston et Bishop, 1989 ; Ets : Gégonne *et al.*, 1992 ; Schneikert *et al.*, 1992) (Figure 5).

Les propriétés de ces différents domaines modifiés soit directement dans leur séquence (DBD de Ets), soit indirectement par le contexte et donc, pourquoi pas, par la structure de la protéine, sont-elles identiques dans la P135 Δ gag-myb-ets ? Les réponses seront sûrement d'une grande utilité pour expliquer l'acquisition du



domaine de liaison à l'ADN de v-Myb

domaine transactivateur de v-Myb

domaines transactivateurs de v-Ets

domaine de régulation de v-Ets

domaine de liaison à l'ADN de v-Ets

Figure 5: Domaines fonctionnels présumés de la P135\(\Delta gag-myb-ets\) définis par analogie avec les domaines fonctionnels des protéines c-Myb et c-Ets-1.

pouvoir transformant du rétrovirus E26 et ses effets sur les cellules cibles décrites ci-dessous.

2.2. Cellules hématopoïétiques

2.2.1. Cellules cibles

C'est à cause de son haut potentiel oncogénique que le virus E26 a été isolé dans un poulet de basse-cour (Ivanov et al., 1962). En effet, très rapidement après infection par le virus E26, les poulets développent une leucémie impliquant le compartiment érythroïde ainsi que le compartiment myéloïde, avec une prédominance pour la transformation érythroïde. De même, E26 cause une réponse leucémique similaire chez la caille (Moscovici et al., 1981). Chez le poulet infecté, il semble que la différenciation des cellules qui devraient donner, en temps normal, des érythrocytes soit bloquée. Ce sont donc des précurseurs de cette lignée qui s'accumulent dans le système sanguin de l'animal infecté. De même, mais de façon beaucoup moins remarquable, il y a accumulation de précurseurs communs aux macrophages et granulocytes hétérophiles (neutrophiles chez l'homme) (Figure 6).

C'est dans un système de cellules de moelle ou dérivées de blastoderme infectées in vitro qu'il a été montré que le virus E26, en plus des effets observés sur les cellules in vivo (Radke et al., 1982), est capable de transformer des cellules souches multipotentes MEPs ("Multipotent hematopoïétic progenitors") qui ne sont encore engagées dans aucune des voies de différenciation hématopoïétique (Moscovici et al., 1983; Graf et al., 1992). Ainsi, par des critères morphologiques et immunocytochimiques, sont identifiés trois types de clones après culture de blastodermes infectés par E26 : des cellules de type érythroïde, des cellules myéloïdes et des clones issus de MEPs. Ces progéniteurs expriment des marqueurs érythroïdes/thrombocytiques tels que l'histone H5, le facteur de transcription GATA-1 ou l'antigène Ebl (erythroblast antigen) (McNagny et al., 1992), et ont la capacité de se différencier spontanément, mais faiblement, en cellules de type érythrocytes. Ils peuvent aussi être induits à se différencier en cellules de la lignée myéloïde et en granulocytes éosinophiles. Cette différenciation peut être initiée par surinfection par des oncogènes de type tyrosine kinase, sérine kinase ou ras, ou encore par traitement au TPA (phorbol ester).

En plus des lignées érythrocytes et monocytes touchées lorsque la $P135^{\Delta}g^{a}g^{-myb-ets}$ est exprimée, des granulocytes paraissent transformés après infection de cellules de moelle osseuse de poulet par une construction dans laquelle les séquences de E26 sont sous le contrôle du LTR du virus AEV (XJE26). Deux types de

colonies de cellules sont alors distinguées: celles dont le cytoplasme cellulaire contient beaucoup de granules ("dark") et les autres qui présentent peu de granules ("light") (Domenget et al., 1992). Dans les deux cas, il semble que ce soient des cellules de la lignée basophile dans un état de différenciation plus ("dark") ou moins ("light") avancé, ou encore, des cellules au phénotype aberrant, exprimant des marqueurs de plusieurs lignées (absence d'histamine). Ceci pourrait être expliqué par le fait que E26 touche des cellules qui se situent au tout début de la différenciation hématopoïétique. Les granulocytes basophiles représentent donc une nouvelle cellule cible du virus E26, dans les conditions utilisées par les auteurs: présence de cMGF qui pourrait éventuellement stimuler la croissance de ces cellules ou aider le virus en "dévoilant" ces cellules comme cibles. Il faut également savoir que, lorsque le virus sauvage E26 est utilisé à la place de la construction XJE26, la quantité de granulocytes basophiles est beaucoup moins importante par rapport aux autres cellules cibles. Il se peut que ce soit la présence des LTRs de AEV dans XJE26 qui favorise la transformation de ces cellules (Domenget et al., 1992). Nous pouvons néanmoins dire que toutes les voies de la différenciation hématopoïétique, à l'exception des voies lymphoïdes, sont affectées par la transformation par le virus E26 in vitro, même si, in vivo, seules les lignées erythrocytaires et myélomonocytaires semblent touchées. Dans les deux cas, ce sont des progéniteurs "précoces" qui sont bloqués dans leur différenciation.

La première caractéristique qui a été remarquée chez le virus E26 repose sur sa capacité à induire une leucémie mixte et à transformer plusieurs types de cellules. Le virus AMV, qui ne transduit que le gène v- myb^AMV , bloque uniquement la différenciation hématopoïétique à un stade intermédiaire entre monoblastes et macrophages (Moscovici $et\ al.$, 1975) (Figure 6). Il était évident d'émettre l'hypothèse que chacun des deux oncogènes transduits par E26 est responsable de la transformation d'une des deux lignées touchées $in\ vivo$. On pouvait supposer que v-ets intervenait pour la différenciation érythrocytaire tandis que v-myb contribuait à la différenciation myélomonocytaire.

2.2.2. Contribution de v-myb au pouvoir transformant de E26

Il ne faut cependant pas oublier que, dans AMV, v- myb^AMV est différent de v- myb^E26 par sa séquence (mutations, délétions) et par son contexte (LTRs différents, absence de protéine de fusion), bien qu'il ait été démontré que c'est l'oncogène par lui-même, et pas uniquement les LTRs, qui détermine la spécificité cellulaire du virus (Engelke ct al., 1994). D'autre part, un virus délété de la majeure partie des séquences v-cts et qui ne transduit plus donc que le gène v-mybE26,

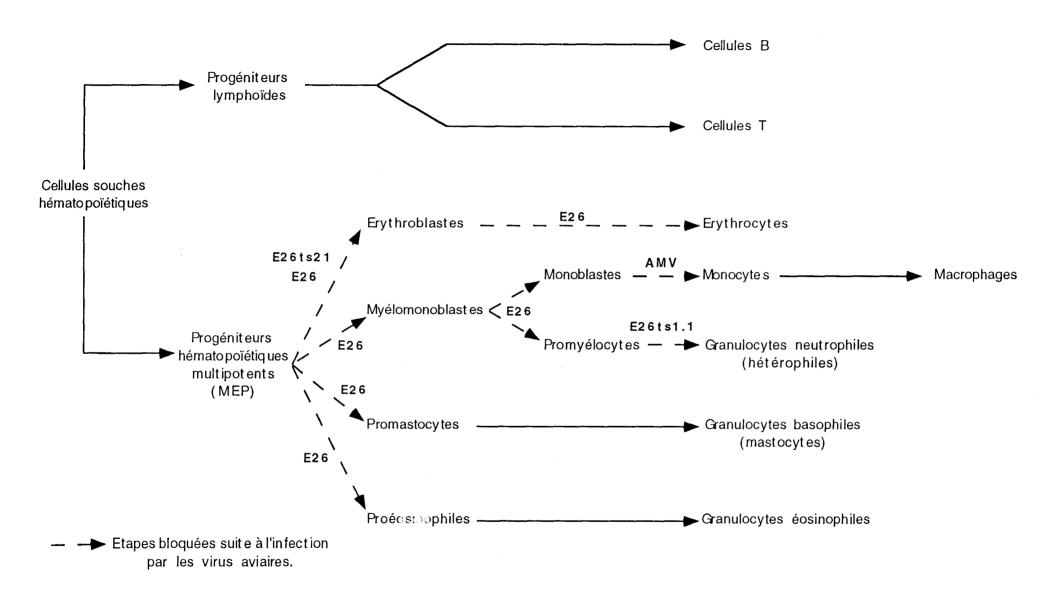


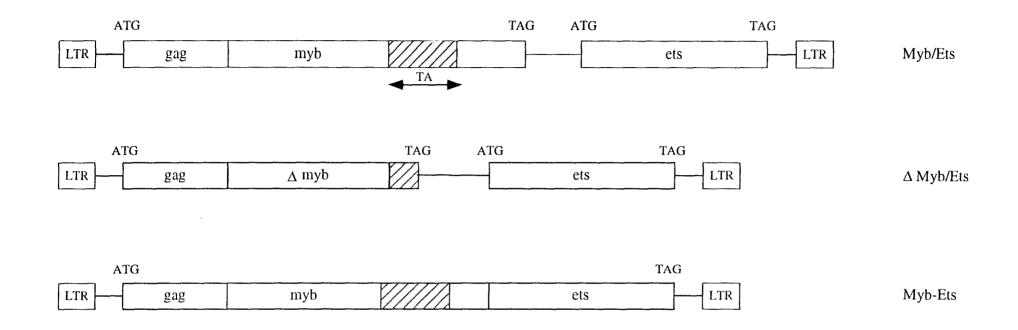
Figure 6 : Les étapes de la différenciation hématopoïétique du poulet.

demeure capable de transformer des myéloblastes *in vitro* mais n'induit pas de leucémies érythroïdes *in vivo*. Alors qu'un virus délété dans *v-myb*, mais qui retient la séquence *v-ets*, est incapable de transformer des cellules myéloïdes (Nunn et Hunter, 1989). De même, comme avec le virus AMV, un virus qui transduit uniquement les séquences *c-myb* est capable de transformer des cellules myéloïdes (Metz et Graf, 1991a) ou d'induire des anémies trois semaines après injection chez le poulet, contrairement à un virus délété des séquences *v-myb* (Wu et Duesberg, 1994).

Afin de déterminer si les domaines fonctionnels, identifiés dans les protéines cellulaires c-Myb et c-Ets, sont également nécessaires à l'activité transformante du virus E26, plusieurs groupes ont analysé les capacités transformantes de virus dans lesquels ces domaines sont délétés. Ainsi, un virus délété du DBD de Myb transforme toujours les cellules érythrocytaires mais montre une faible activité transformante sur les cellules monocytaires et granulocytaires in vitro. Par contre, un virus délété du domaine transactivateur de Myb, malgré une activité transformante réduite vis-à-vis des granulocytes, est toujours capable de transformer efficacement la lignée monocytaire (Domenget et al., 1992). A ce sujet, Frampton et al. (1993) montrent que dans leur système, la délétion du domaine transactivateur de Myb (Myb \Delta-ets) n'empêche pas la transformation myéloïde mais augmente le temps de latence avant transformation, et les cellules myéloïdes transformées présentent un phénotype distinct de celles obtenues avec le virus sauvage. Par contre, un tel virus délété n'est plus capable de transformer les MEPs. Les propriétés transformantes du virus sont retrouvées si le domaine de Myb est remplacé par le domaine transactivateur de la protéine VP16, mis à part un phénotype différent pour les MEPs. Par ailleurs, si la partie 3' des séquences v-myb est supprimée, alors le virus obtenu est incapable de transformer des cellules myéloïdes in vitro ou d'induire des leucémies in vivo (Metz et Graf, 1991b).

Cependant, dans ce cas, la délétion englobe 50% du domaine transactivateur plus les séquences situées en 3' (jusqu'à la fin de v-Myb). Un autre biais de la technique est le système utilisé par les auteurs qui consiste en un criblage de virus capable d'induire des leucémies suite à un événement de recombinaison qui aurait fusionné les protéines ΔMyb et Ets (comme ils ont pu l'obtenir avec les protéines entières) (Figure 7) (voir dans le paragraphe "fusion *v-myb-v-ets*"). On peut imaginer que ceci est impossible avec les séquences restantes en amont de la délétion.

Dans le type de virus délétés "artificiels" décrit par Domenget et al.(1992), on peut imaginer un effet de compensation, par les domaines de Ets, de la contribution



TA: domaine transactivateur de Myb

Figure 7 : Constructions virales et leurs protéines (Metz et Graf, 1991b)

à la transformation monocytaire du virus médiée par le domaine transactivateur de Myb.

Quoiqu'il en soit, il semble que la partie Myb intervienne, dans le contexte de la P135∆gag-myb-ets, sur la transformation des cellules myéloïdes.

La recherche de virus mutants thermosensibles pour la transformation des myéloblastes a été un autre moyen pour mettre en évidence l'importance du gène v-myb à ce propos, et notamment la séquence codant le DBD de v-Myb. A la température non permissive de 42°C, et pas à la température permissive de 37°C, des myéloblastes infectés par les virus ts21 et ts143 se différencient in vitro en cellules de type macrophage, résistantes au cMGF mais capables de le sécréter. La transformation des érythroblastes n'est pas affectée. Les séquences de ces mutants dévoilent une mutation commune localisée dans le DBD de Myb (Beug et al., 1984; Frykberg et al., 1988; Li et al., 1989). Les poulets, ayant une température de 41,5°C, peuvent être utilisés pour tester la perte d'oncogénicité des virus thermosensibles à la température non permissive. Le virus ts21 est parfaitement leucémogène, mais l'érythroblastose se déclenche avec un temps de latence légèrement plus important qu'avec le virus sauvage, ce qui suggère l'influence de la partie v-myb sur la transformation érythropoïétique. Les poulets infectés développent également une leucémie myéloïde parce que dans certaines zones, leur température corporelle n'excède pas 37°C, mais une fois replacées in vitro, les cellules transformées reprennent le phénotype thermosensible (Beug et al., 1984).

2.2.3. Contribution de *v-ets* au pouvoir transformant de E26

Si le rôle du gène v-myb dans E26 est démontré principalement vis-à-vis de la transformation myéloïde, on peut imaginer que le gène v-ets confère à E26 la propriété de transformation de la lignée des cellules érythroïdes.

Déjà cité à propos de la contribution de *v-myb*, le virus délété de la majeure partie des séquences *v-cts* n'induit plus de leucémies érythroïdes *in vivo* (Nunn et Hunter, 1989), et ne transforme plus les cellules érythrocytaires *in vitro* (Domenget *et al.*, 1992), alors que Wu et Duesberg (1994) affirment que les séquences *v-ets* ne jouent aucun rôle ou seulement un rôle indirect dans la carcinogenèse. Par contre, un virus ne contenant que l'oncogène *v-ets* est capable de transformer des cellules de la lignée érythroïde à un stade déjà assez mature par rapport à celles qui sont transformées par E26 (Metz et Graf, 1991a).

Comme pour Myb, on peut s'interroger sur la nécessité des domaines fonctionnels présents dans c-Ets. A propos des domaines transactivateurs de v-Ets, certains disent que leur délétion n'abolit en rien la leucémogénicité (Metz et Graf,

1991b) alors que d'autres montrent qu'un tel virus n'est plus capable de transformer des cellules monocytaires (Domenget et~al., 1992). Cependant, dans ces deux cas, les systèmes utilisés sont différents et ne contiennent donc pas les mêmes cellules avant infection, ce qui expliquerait que les cellules ciblées puissent varier. Quant au DBD, la délétion de la partie 3' de v-ets empêche le virus de transformer des cellules érythroïdes (Domenget et~al., 1992). Nunn et Hunter (1989) précisent même que ceci est vrai lorsque seuls les 26 derniers acides aminés qui suivent le DBD de Ets sont délétés (mutation $\Delta 18$).

A l'aide d'un mutant thermosensible (ts 1.1), la démonstration a été faite que le domaine DBD de v-Ets dans E26 doit être fonctionnel pour maintenir les capacités de transformation du virus. Ce mutant a été isolé suite à l'obtention de colonies érythroïdes transformées pouvant être induites à maturer en cellules ressemblant à des érythrocytes en 4 jours après passage à 42°C. L'analyse de sa séquence nucléotidique révèle qu'une seule mutation ponctuelle, dans le domaine de liaison à l'ADN de v-Ets, est responsable du phénotype thermosensible des cellules transformées. Il s'agit du remplacement d'une histidine (en position 443 dans la nomenclature p68c-ets-1) en un résidu aspartique (Golay et al., 1988). Cette mutation est située juste deux acides aminés en aval de la mutation B décrite dans le virus E26 duquel a été isolé le gène v-ets. Chez le poulet (température corporelle de 41,5°C), le phénotype des cellules transformées reflète les résultats obtenus in vitro. L'érythroblastose apparaît deux fois moins rapidement que chez les animaux infectés par le virus E26 sauvage et les érythroblastes récoltés du sang des animaux leucémiques semblent beaucoup plus avancés dans leur différenciation. L'effet du virus ts 1.1 est beaucoup moins foudroyant que celui de E26 (Golay et al., 1988). De plus, les cellules myéloïdes transformées par le virus ts 1.1 ressemblent à des promyélocytes (précurseurs de granulocytes hétérophiles) plutôt qu'à des myéloblastes habituellement obtenus avec le virus E26, et ne peuvent pas être induits à se différencier après passage à 42°C.

Ce changement de spécificité de transformation dans la lignée myélomonocytaire a été attribué à un effet indirect de Ets sur Myb (Golay et al., 1988; Introna et al., 1990). En réalité, après avoir montré que la mutation ts 1.1 rendait le domaine ETS sensible à la température vis-à-vis de sa capacité de fixation à l'ADN, Kraut et al. (1994) ont mis en évidence une corrélation entre cette nouvelle propriété et la capacité de différenciation des cellules cibles à la température non permissive. En effet, ils montrent que les soi-disant "cellules érythroïdes" transformées sont en réalité des cellules multipotentes (MEP) qui peuvent être amenées à se différencier en érythrocytes et promyélocytes et, à moindre taux, en

éosinophiles à 42°C, alors que les MEP infectées par E26 se différencient à faible taux en érythrocytes et à très faible taux en monoblastes et en granulocytes éosinophiles (Figure 8). Ainsi, la fonctionnalité du domaine ETS est requise pour maintenir la propriété multipotente des progéniteurs hématopoïétiques transformés par le virus E26 sauvage (Kraut *et al.*, 1994).

Ces données suggèrent que, si *v-ets* est directement impliqué dans la transformation des cellules érythroïdes, il peut également influencer la transformation myéloïde et réciproquement pour le gène *v-myb*. Par contre, la transformation granulocytaire semble être due à l'oncogène *v-myb* uniquement (Metz et Graf, 1991a ; Domenget *et al.*, 1992).

Mais, quoiqu'il en soit, il est certain que le gène *c-ets* induit des bouleversements dans la différenciation des cellules sanguines lorsqu'il est modifié au cours de divers phénomènes biologiques tels que la transduction, les translocations ou encore les insertions de rétrovirus à proximité du gène, décrits par la suite.

2.2.4. fusion *v-myb - v-ets*

Visiblement, les deux oncogènes transduits, v-myb et v-ets, coopèrent pour augmenter le pouvoir transformant du virus E26 et lui donner un spectre d'action plus large au niveau de la différenciation hématopoïétique. Afin de cerner les mécanismes de coopération impliqués, les pouvoirs transformants de différentes constructions virales codant pour *v-myb* ou *v-ets*, ou v-Myb et v-Ets séparés (Myb/Ets) ou fusionnés (Myb-Ets) ont été analysés (Figure 9). Le virus qui exprime v-Myb est capable de transformer les cellules myéloïdes, mais aussi, dans une moindre mesure, des cellules de type érythroblaste, suite à l'infection de blastodermes. Un virus v-Ets transforme également les cellules de la lignée érythrocytaire. La principale différence entre ces résultats et ceux obtenus avec v-Myb/v-Ets séparés mais co-exprimés repose sur l'augmentation de la capacité des cellules transformées à se "renouveler" (temps et capacité de doublement de population). La protéine de fusion (Myb-Ets), quant à elle, transforme des cellules qui sont beaucoup moins matures (progéniteur non engagé dans une des voies de différenciation) que les précédentes mais qui montrent également une très grande capacité de "renouvellement" alors que leur potentiel de différenciation spontanée est très faible comparé à celui des cellules obtenues avec v-Myb ou v-Ets ou Myb/Ets (Figure 10).

Par conséquent, on peut dire que la coopération oncogénique s'exerce en trans (oncoprotéines séparées par rapport aux effets d'une seule protéine à la fois)

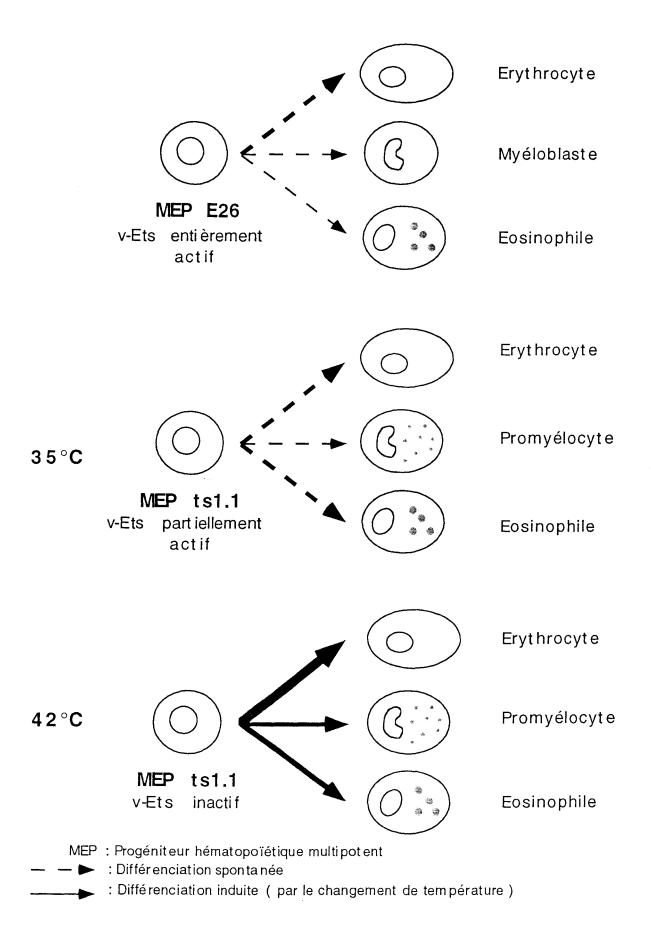


Figure 8 : Capacité de différenciation des MEP transformés par E26 ou E26 ts1.1

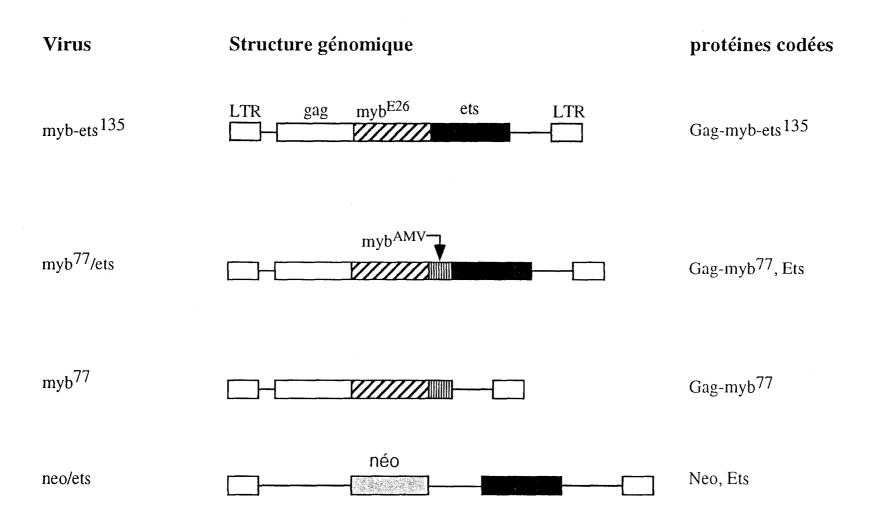


Figure 9 : Constructions virales et leurs protéines (Metz et Graf, 1991a)

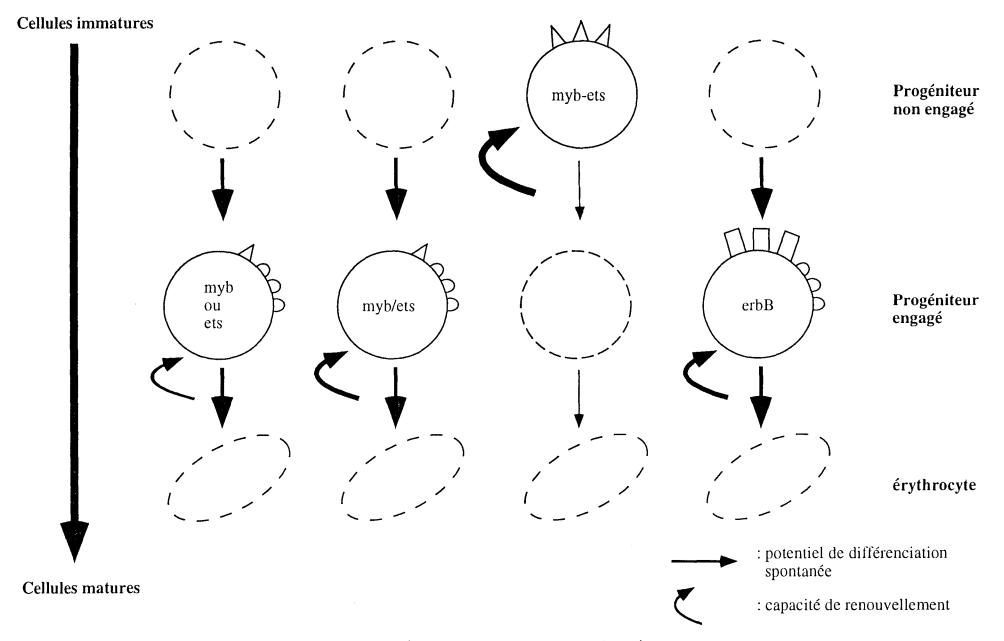


Figure 10 : Représentation schématique des cellules érythroïdes de poulet, transformées par divers oncogènes ou combinaisons d'oncogènes.

aussi bien qu'en *cis* (protéine de fusion par rapport à Myb/Ets séparés) (Metz et Graf, 1991a). Ceci semble confirmé *in vivo* puisque seul le virus E26 sauvage est leucémogène (Metz et Graf, 1991b).

De plus, lorsqu'on cherche à déterminer la capacité à induire des leucémies d'un virus recombinant dont le génome code des protéines v-Myb et v-Ets séparées, seule une faible proportion des animaux développent effectivement des leucémies après un temps de latence assez important. En réalité, les deux gènes v-myb et v-ets se sont refusionnés naturellement par des événements de recombinaison en utilisant de courtes homologies de séquences entre v-myb et v-ets, et donc en délétant la séquence qui séparait les deux gènes ainsi que des portions variables des extrémités carboxy-terminales de v-Myb (sans jamais atteindre le domaine transactivateur de v-Myb) et amino-terminale de v-Ets (en supprimant dans 4 cas sur 6, une partie des domaines transactivateurs de v-Ets). Ceci suggère que la protéine virale fusionnée a un avantage sélectif par rapport aux protéines séparées en ce qui concerne l'oncogénicité (Metz et Graf, 1991b).

Adelmant et al. (1994) ont montré une coopération entre la protéine P135∆gag-myb-ets et la protéine p61/63myc (issue du virus MH2), codées toutes deux par le virus MHE226 (artificiel), sur la transformation et l'immortalisation de précurseurs myélomonoblastiques. Notamment, la portion ets de l'oncogène vmyb-ets est requise pour ses propriétés transformantes puisque lorsqu'elle est en partie délétée, le virus obtenu n'est plus tumorigène. L'oncogène v-ets est également capable de coopérer en trans avec l'oncogène v-erbA dans l'induction d'une érythroleucémie aiguë chez le poulet, lorsque leurs protéines sont coexprimées à partir d'un virus chimérique. v-cts libère les cellules érythroïdes transformées de leur dépendance vis-à-vis des facteurs de croissance. Le même type d'érythroleucémie est induite par le virus AEV qui transduit les oncogènes v-erbA et v-erbB (Metz et Graf, 1992). Diverses observations concernant l'expression des différentes protéines v-Ets, v-Myb et v-ErbA et leurs différentes spécificités de liaison à l'ADN permettent à Metz et Graf (1992) de supposer qu'elles régulent des "assortiments" de gènes différents, intervenant tardivement dans trois chemins de transduction de signaux externes qui régulent la croissance des cellules érythroïdes.

2.3. Gènes-cibles

Les bases moléculaires de la coopération entre v-Myb et v-Ets reposent sûrement sur les capacités transcriptionnelles de ces protéines. La corrélation entre les propriétés de transformation du virus ts 1.1 et la capacité de liaison à l'ADN du domaine ETS indique que celui-ci est impliqué dans la régulation de gènes nécessaires au maintien de la capacité multipotente des MEPs transformées par le virus E26. De plus, la coopération des protéines Myb et Ets dans la régulation de l'expression de certains promoteurs de gènes spécifiques de la lignée hématopoïétique (mim-1 et CD4: Ness et al., 1989 ; Dudek et al., 1992 ; Siu et al., 1992 ; Salmon et al., 1993) ou lymphoïde T (promoteur de type I du gène lck: McCracken et al., 1994) a déjà été prouvée.

Ainsi, l'expression et l'activité normales des protéines c-Myb et/ou c-Ets dans la cellule sont perturbées par l'expression "forcée" de la protéine composée de v-Myb et v-Ets: compétition sur les séquences cibles, coopération "inhabituelle", capacités transactivatrices modifiées par les mutations, sont des hypothèses de perturbations. Sans oublier que, dans la protéine virale, les domaines Myb et Ets sont fusionnés et que ceci peut générer un nouvel activateur transcriptionnel aux affinité et spécificité de liaison à l'ADN distinctes de celles des protéines non fusionnées, ou au potentiel de transactivation augmenté. Afin de comprendre les mécanismes d'acquisition du pouvoir transformant de E26, il serait intéressant de connaître les gènes dont l'expression peut être régulée ou dérégulée par la protéine de fusion, alors qu'elle ne l'est pas par les protéines séparées et co-exprimées ou alors à un moment inhabituel de la différenciation cellulaire. Il s'agit vraisemblablement de gènes importants pour la prolifération et la différenciation hématopoïétiques. C'est ce qu'ont commencé à chercher les différents groupes qui ont mis en évidence les premiers gènes cibles d'une protéine Myb-Ets.

2.3.1. mim-1

Ness et al. (1989) ont profité des propriétés thermosensibles du virus ts21 E26 qui, comme nous l'avons vu précédemment, comporte une mutation ponctuelle dans le DBD de v-myb par rapport au virus E26 (Beug et al., 1984). Par hybridation différentielle de banques d'ADNc obtenues à partir de myéloblastes infectés et cultivés soit à 42°C, soit à 37°C, ils ont isolé le gène mim-1 (pour Myb induced myeloïd protein 1) dont l'expression est réduite après passage à 42°C, c'est à dire lorsque les myéloblastes s'engagent dans la voie monocytaire. Le transcrit mim-1 n'est détecté que dans les promyélocytes et non pas dans les érythroblastes transformés par E26, ni même dans les cellules lymphoïdes et érythroïdes normales. Son expression est spécifique des promyélocytes non encore différenciés en granulocytes (hétérophiles). Les auteurs estimaient avoir isolé un gène dont le promoteur est régulé par la protéine v-Myb puisque, dans des tests de transactivation sur un promoteur mim-1 exogène (expériences de co-transfection

dans des macrophages HD-11), les protéines v-Myb^{E26} et v-Myb^{AMV} sont capables de le transactiver. Cependant, aucun transcrit de *mim-1* n'a pu être détecté dans des cellules myéloïdes transformées par AMV et l'induction de l'expression du gène *mim-1* endogène de macrophages HD-11 n'est obtenue que par expression transitoire d'un plasmide codant v-Myb E26 et pas v-Myb^{AMV}. Connaissant les différences qui existent entre ces deux protéines, on peut plutôt penser que le promoteur *mim-1* est régulé par la protéine P135Δgag-myb-ets ou plus exactement par la partie v-Myb de cette protéine, d'autant plus que, comme nous l'avons dit précédemment, les protéines c-Myb et c-Ets2 (mais pas c-Ets-1) sont capables de coopérer pour réguler l'expression du gène *mim-1* (Dudek *et al.*, 1992).

2.3.2. GATA-1

Le virus ME26 est un rétrovirus murin, équivalent au virus E26 aviaire, construit en insérant les séquences v-myb et v-cts dans un vecteur dérivé du virus leucémogène d'Abelson (Abelson MuLV) (Yuan et al., 1989). ME26 provoque des érythroleucémies chez les souris en 2 à 4 mois. Les cellules transformées prolifèrent et s'établissent en lignée en présence de l'hormone érythroïde nommée érythropoïétine (Epo) grâce au récepteur de l'érythropoïétine (EpoR) qu'elles expriment. Elles paraissent cependant beaucoup moins matures que les cellules érythroïdes qui possèdent normalement ce récepteur et ressemblent plutôt à des précurseurs hématopoïétiques très immatures (Ruscetti et al., 1992). Parallèlement, l'infection par le virus ME26 induit, dans une lignée myéloïde (FDC-P2), l'expression du facteur de transcription érythroïde/mégacaryocyte-spécifique GATA-1 qui est capable de transactiver le promoteur du gène Epo R. Ainsi, la protéine P135 $^{\Delta}$ gag-myb-ets n'augmenterait pas directement l'expression de Epo R mais transactiverait plutôt le promoteur de GATA-1 et coopérerait avec la protéine GATA-1 pour induire l'expression du gène Epo R (Aurigemma et al., 1992). Ceci est vrai dans les cellules immatures transformées par le virus mais on peut imaginer, en temps normal, dans les cellules érythroïdes matures, un mécanisme similaire qui ferait intervenir des protéines des familles Myb et Ets, d'autant que la démonstration a été faite que la protéine Ets-1 est capable de transactiver le promoteur du gène GATA-1 (Seth et al., 1993).

2.3.3. reni

C'est aussi sur le principe de l'hybridation différentielle que repose la découverte récente d'un autre gène régulé par la protéine virale $P135^{\Delta}gag^{-myb-ets}$. Le virus thermosensible utilisé dans ce cas n'est autre que le virus ts1.1 E26 qui

possède une mutation dans le DBD de la partie v-Ets, rendant la protéine Ets thermosensible pour sa liaison à l'ADN (Golay et al., 1988 ; Kraut et al., 1994). Les résultats obtenus précédemment indiquaient que le DBD de Ets, dans la protéine de fusion, est impliqué dans la régulation de gènes nécessaires pour le maintien du blocage de la différenciation des MEPs transformés par E26, vraisemblablement par liaison directe aux séquences régulatrices de ces gènes-cibles spécifiques. Kraut et al. (1995) ont ainsi isolé le gène rem-1 (pour "regulated by Ets in MEPs") dont l'expression est directement liée à la fonctionnalité du domaine ETS de la P135∆gag-myb-ets (diminution après passage de 35°C à 42°C puis ré-augmentation quand retour à 35°C). Il reste tout de même à identifier le ou les sites qui permettent la régulation par la protéine virale. Le gène rem-1 code une protéine qui contient trois motifs "EF-hand" caractéristiques de la famille des protéines fixant le calcium. Il semble être le premier membre de cette famille dont l'expression a pu être démontrée entre autre dans les cellules hématopoïétiques. Même si la fonction de certaines des protéines de la famille est connue, celle des protéines qui présentent la plus grande homologie avec Rem-1 ne l'est pas (de 90 à 98% d'homologie avec l'Hippocalcine, la Neurocalcine et VILIP(NVP)-3 ; Kajimoto et al., 1993). Les auteurs supposent que la protéine Rem-1 est un lien entre Ets et une voie de transduction de signaux extracellulaires, dépendante du calcium. En réalité, la transcription de rem-1 ne suffit pas, à elle seule, à bloquer la différenciation comme le fait la $P135\Delta gag-myb-ets$, ce qui suggère que celle-ci régule également la transcription d'autres gènes afin d'exercer son oncogénicité.

2.4. Coopération Myb-Ets dans d'autres cellules

2.4.1. Fibroblastes

Même si E26 est capable de "transformer" des fibroblastes embryonnaires de caille (Graf et al., 1979), la transformation de fibroblastes embryonnaires de poulet (CEFs) n'avait jamais été mise en évidence (Moscovici et al., 1975; Bister et al., 1982) avant que Jurdic et al. (1987) montrent que les CEFs ne sont en effet pas dans un état de complète transformation mais qu'ils acquièrent un potentiel de croissance in vitro élevé par rapport à des fibroblastes non transformés. Ces CEFs dont la morphologie est quelque peu différente et qui correspondent en fait à un intermédiaire entre des CEFs "normaux" et des CEFs transformés (par exemple par le virus AEV), sont capables de croître en milieu appauvri en sérum ou déplété en facteurs de croissance. Ils forment des petites colonies en milieu semi-solide. Les mêmes observations sont faites sur des cellules NIH3T3 (fibroblastes de souris)

infectées par l'équivalent murin ME26, construit à partir de E26 (Yuan et al., 1989). Cependant, on ne sait pas si E26 induit une altération dans les mécanismes de contrôle de croissance des cellules infectées ou s'il induit une sélection d'une souspopulation de CEFs qui ont naturellement un potentiel de croissance élevé. Cette dernière hypothèse est suggérée par la détection d'une plus faible quantité d'ARNm viral dans les CEFs par rapport aux cellules hématopoïétiques transformées. Il est possible aussi que les LTRs de E26 n'aient pas la même efficacité de transcription dans ces deux types de cellules. Ceci est également observé avec l'oncogène *v-erbA* porté par le virus AEV (Gandrillon *et al.*, 1987). Il n'est pas du tout évident que les cellules seraient transformées complètement si le niveau d'expression était augmenté. D'autre part, la P135∆gag-myb-ets n'est pas détectée par les CEFs infectés. Est-ce parce qu'elle s'y trouve en très faible quantité ou qu'elle n'est pas stable ? Il se peut également que le provirus E26 code une autre protéine virale, jusqu'à présent non identifiée, qui pourrait être issue de transcrits "mineurs". Une autre possibilité consisterait en un effet toxique de la protéine à très forte dose, uniquement dans certaines cellules, comme cela a été montré avec la protéine Pu-1 dans les fibroblastes murins. Aucune réponse n'est à ce jour apportée. Mais les auteurs ont cherché à savoir si ce sont les mêmes séquences de E26 qui sont responsables de la transformation hématopoïétique et de la stimulation de croissance des CEFs. Les expériences réalisées avec des mutants de délétion (Yuan et al., 1989 ; Ravel-Chapuis et al., 1991) semblent montrer que les deux oncogènes coopèrent à l'acquisition des différentes potentialités prolifératives des fibroblastes infectés, contrôlées par différentes voies géniques. Le DBD codé par v-myb intervient dans la croissance en milieu appauvri en sérum, ainsi que le domaine TA de *v-myb*, mais visiblement par une autre voie, qui contribue également à la formation de colonies en milieu semi-solide. Ces deux propriétés reflètent également la responsabilité de plusieurs "portions" de v-ets dans l'augmentation de la répression de l'effet mitogénique. Quant au DBD de v-ets, il serait d'une grande influence sur l'indépendance des cellules infectées vis-à-vis de l'"accrochage" à un substrat.

Une chose est sûre, c'est que la protéine virale n'est pas seulement l'addition de domaines dont les fonctions sont déjà connues dans les protéines d'origine cellulaire mais qu'il y a bel et bien création de fonctions supplémentaires qui interviennent, vraisemblablement par des voies génétiques différentes, dans les cellules hématopoïétiques et non-hématopoïétiques.

2.4.2. Cellules de neurorétine de poulet

A ce propos, le système des cellules neurorétiniennes de poulet (CNRs), déjà utilisé pour l'étude des effets d'autres oncogènes, montre également que E26 est capable d'augmenter le potentiel prolifératif de ces cellules, sans toutefois les transformer. E26 n'utilise probablement pas les mêmes voies génétiques que dans les fibroblastes pour exprimer son oncogénicité puisque, dans ce cas, bien que la transformation soit partielle, le transcrit viral est fortement exprimé. Par contre, les cellules deviennent réellement transformées par coopération entre la P135\Delta gagmyb-ets et la protéine v-Myc codée par une partie du virus MH2. Ceci n'a pas été observé dans le cas du virus MH2 entre la protéine Myc et la protéine P100gag-mil. Le fait qu'une protéine issue d'un virus E26 délété de la majorité des séquences vets ne produise pas le même effet démontre l'importance de ce gène dans la coopération mise en évidence (Amouyel et al., 1989). v-ets est également requis pour l'augmentation de la prolifération des CNRs en milieu minimum mais, c'est v-myb qui est responsable de l'augmentation de la prolifération encore plus importante des cellules infectées induite par le bFGF (basic fibroblast growth factor), notamment sa séquence qui code le domaine TA de v-Myb (Garrido et al., 1992).

2ème partie : le domaine de liaison à l'ADN (DBD : DNA Binding Domain)

1. Capacité de liaison à l'ADN

Après la caractérisation des séquences virales E26, plusieurs gènes cellulaires présentant des similitudes avec l'oncogène *v-ets* ont été décrits, notamment le progéniteur cellulaire*c-ets-1* décrit précédemment, ainsi qu'un autre gène dénommé *c-ets-2* (Watson *et al.*, 1985 ; Boulukos *et al.*, 1988 ; Chen Z.Q. *et al.*, 1990) chez divers organismes tels que l'homme, le poulet ou la souris.

c-ets-1 et c-ets-2 appartiennent à la classe des gènes ("early response genes") pour lesquels des variations d'expression sont induites rapidement après l'activation des systèmes de transduction de signaux (liés aux récepteurs de surface cellules-spécifiques) de différentes cellules hématopoïétiques (Boulukos et al., 1988). En effet, sur ces gènes qui ne ressemblaient à l'époque à aucun autre gène connu, quelques données indiquaient qu'une quantité importante de protéines c-Ets-1 était présente dans les cellules lymphoïdes B et T en prolifération, contrairement à sa faible expression dans des cellules lymphoïdes quiescentes. La stimulation antigénique et mitogénique de ces cellules conduit, en quelques minutes, à la phosphorylation calcium-dépendante des protéines c-Ets-1 (Pognonec et al., 1988 ; 1990) suivie, quelques heures plus tard, de la diminution de la quantité d'ARN cets-1 (Bhat et al., 1989 ; 1990). Ces résultats suggéraient alors un rôle des produits du gène c-ets-1 dans les événements rapides qui sont impliqués dans l'induction de la prolifération et de l'activation fonctionnelle des cellules lymphoïdes et probablement d'autres types cellulaires. Par contre, l'activation de cellules matures de la lignée myélomonocytaire est accompagnée par une expression rapide et transitoire de c-ets-2 alors que c-ets-1 n'est pas affecté. D'autre part, les protéines c-Ets-1 et c-Ets-2 sont des protéines nucléaires (Boulukos et al., 1988 ; Fujiwara et al., 1988a; Pognonec et al., 1989; Bhat et al., 1990).

Ces premières observations ont conduit les auteurs à remarquer l'association de c-Ets-1 avec la chromatine. Ils ont montré que cette interaction est médiée, au moins en partie, par la capacité de liaison à l'ADN de façon aspécifique, et qu'elle peut être abolie par la phosphorylation de la protéine (Boulukos *et al.*, 1989 ; Pognonec *et al.*, 1989 ; Leprince *et al.*, 1990 ; Reddy et Rao, 1990).

2. Définition du domaine de liaison à l'ADN

Les premiers auteurs, qui ont tenté d'identifier le domaine de Ets-1 responsable de la capacité de liaison à l'ADN in vitro, se sont basés sur les comparaisons de

séquences entre c-Ets-1 et c-Ets-2. En effet, des homologies de séquence en acides aminés ont été mises en évidence entre les protéines c-Ets-1 et c-Ets-2 au niveau de deux régions localisées respectivement dans les domaines amino- et carboxy-terminaux des protéines. Ces protéines ont été arbitrairement divisées en trois domaines : le domaine amino-terminal A pour lequel on observe une homologie moyenne, le domaine carboxy-terminal C de 115 acides aminés qui présente une très forte homologie de 90 % et la région intermédiaire B assez divergente (Boulukos *et al.*, 1988 ; Watson *et al.*, 1988b).

L'analyse des propriétés de mutants de délétion a montré que le domaine carboxy-terminal de la protéine Ets-1 aviaire (Boulukos et al., 1989) ou humaine (Reddy et Rao, 1990), conservé dans Ets-2, est essentiel à l'activité de liaison aspécifique à l'ADN, ainsi qu'au transport des protéines vers le noyau. Notamment, pour cette dernière propriété, la séquence GKRKNKPK similaire à celle identifiée dans d'autres protéines nucléaires, fait partie du domaine qui, quand il est délété, rend la protéine cytoplasmique (Boulukos et al., 1989). Reddy et Rao (1990) ont également déterminé que la protéine v-Ets était une protéine capable de se fixer à l'ADN, ceci grâce au même domaine carboxy-terminal.

3. Domaine ETS et famille Ets

3.1. Homologie

Le domaine carboxy-terminal qui a ainsi été mis en évidence dans les protéines c-Ets-1 et c-Ets-2 a ensuite été retrouvé dans toute une série d'autres protéines. La détention d'une séquence plus ou moins homologue à ce domaine, qui a d'ailleurs été baptisé domaine ETS (Karim et al., 1990), leur a valu leur appartenance à une grande famille de protéines : la famille Ets (Macleod et al., 1992) (Tableau 1). L'homologie s'étend, pour la plupart de ces protéines, sur 85 acides aminés et plus particulièrement dans les parties amino- et carboxy-terminales de ce domaine. L'alignement des séquences du domaine ETS des protéines de la famille montre que la plus grande divergence a été observée entre les protéines Ets-1 et Spi/Pu-1 qui ne possèdent que 35 % d'homologie dans cette région.

La classification de ces protéines apparentées trouvées chez divers organismes, allant des Arthropodes aux Vertébrés supérieurs, est avant tout basée sur les homologies de séquence dans le domaine ETS, la position de ce domaine dans la protéine et quelques homologies observées en dehors du domaine ETS, dans les domaines A et B, pour certains membres. Ces dernières séquences sont moins

Espèce	che (lors	quivalent ez l'homme que les noms t différents)	Référence					
Homme	ets-1 ets-2 erg-1 fli-1/erg-B erg-2 PE-1 EF-1A elk-1 SAP-1 SAP-2 elf-1 PEA3 ERM ETV-1		Watson et al. (1988b) Reddy et Rao (1988) Watson et al. (1988b) Reddy et al. (1987) Rao et al. (1987) Watson et al. (1992) Prasad et al. (1992) Murukami et al. (1993) Klemsz et al. (1994) Bolwig et al. (1992) Rao et al. (1989) Dalton et Treisman (1992) Thompson et al. (1992) Higashino et al. (1993) Monté et al. (1994) Jeon et al. (1995)					
Souris	Tel ets-1 ets-2 spi-1/PU.1 fli-1 GABPα Net/Erp	EF-1A SAP-2	Papadopoulos et al. (1995) Chen (1990) Watson et al. (1988b) Moreau-Gachelin et al. (1989) Klemsz et al. (1990) Moreau-Gachelin et al. (1990) Ben-David et al. (1991) La Marco et al. (1994) Lopez et al. (1994)					
Poulet	ER71 ER81 PEA3 ets-1	ETV-1	Brown et McKnight (1992) Brown et McKnight (1992) Xin <i>et al.</i> (1992) Watson <i>et al.</i> (1988a)					
route	ets-2		Duterque-Coquillaud et al. (1988) Leprince et al. (1988) Boulukos et al. (1988)					
Xénope	ets-1a ets-1b ets-2a ets-2b		Stiegler <i>et al.</i> (1990) Stiegler <i>et al.</i> (1990) Wolff <i>et al.</i> (1991) Burdett <i>et al.</i> (1992)					
Oursin	ets erg		Chen <i>et al.</i> (1988) Qi <i>et al.</i> (soumis)					
Drosophile	ets-2: Pointed elg E74	ets-1/ets-2 EF-1A elf-1	Pribyl <i>et al.</i> (1988) Pribyl <i>et al.</i> (1991) Janknecht <i>et al.</i> (1989) Burtis <i>et al.</i> (1990)					
	ets-3 ets-4 ets-6	erg/fli-1	Chen <i>et al</i> (1992)					
	pokkuri/yan		Tei <i>et al.</i> (1992) Lai <i>et al.</i> (1992)					
Nereis	ets erg		Lelièvre-Chotteau et al. (1994)					

Tableau 1 : Les gènes de la famille ETS.

conservées que le domaine ETS, aussi bien entre les membres des sous-familles définies justement selon ces séquences (Ets-1 + Ets-2 + pointed ; Fli1 + Erg + GABP α + Elg + Pok ; Elk1 + Sap1), qu'avec la distance dans l'évolution (Ets-2 humain à drosophile, par exemple). D'autre part, la localisation du domaine ETS a été particulièrement étudiée pour la protéine Ets-1, par des analyses de propriétés de délétants. Il se limite aux 85 acides aminés qui constituent la région conservée entre les membres de la famille.

En se basant sur l'homologie et sur des expériences de délétion, le domaine ETS des autres protéines de la famille a été localisé. Il se situe dans la partie carboxyterminale de la plupart des protéines de la famille : Ets-1 (Boulukos et al., 1990 ; Reddy et Rao, 1990 ; Gégonne et al., 1992 ; Lim et al., 1992 ; Nye et al., 1992 ; Wang et al., 1992 ; Wasylyk et al., 1992) ; Ets-2 (Wasylyk et al., 1992) ; Erg (Rao et al., 1987) ; Fli (Rao et al., 1993 ; Mao et al., 1994) ; GAPBα (Thompson et al., 1991) ; Spi1/Pu1 (Klemsz et al., 1990 ; Wasylyk et al., 1992) ; E74 (Burtis et al., 1990) ; PEA3 (Xin et al., 1992) ; ER71, ER81 (Brown et McKnight., 1992) ; ERM (Monté et al., 1994) ; D-Elg (Pribyl et al., 1991), Pointed (Pribyl et al., 1991 ; Klämbt et al., 1993), tandis qu'il se situe dans la partie amino-terminale des protéines telles que Elk-1 (Janknecht et Nordheim, 1992 ; Rao et Reddy, 1992a ; 1992b), Sap1 (Hipskind et al., 1991 ; Dalton et Treisman, 1992), Sap2 et Erp/Net (Giovane et al., 1994 ; Lopez et al., 1994), ou médiane telles que Elf1 (Dalton et Treisman, 1992 ; Wang et al., 1992), Pok/Yan (Tei et al., 1992 ; Lai et Rubin, 1992) (Figure 11).

3.2. Histoire évolutive des membres de la famille Ets, selon le domaine de liaison à l'ADN

Les homologues cellulaires de divers membres de la famille des gènes *Ets* humains ont donc été détectés chez des Vertébrés et des Invertébrés, dont la souris, le poulet, le xénope, l'oursin et la drosophile. Les gènes *Ets* constituent donc une très ancienne famille (Figure 12).

Une homologie a pu être établie entre des gènes de la famille Ets chez la souris et chez l'Homme. Ceci a été possible en se basant sur le haut degré de similitude dans la séquence codante, et sur leur localisation génique sur des segments de chromosomes qui ont été conservés entre les génomes murin et humain. Ainsi, chez l'homme, les gènes ets-1 et ets-2 sont respectivement situés sur le même chromosome que les gènes fli-1 et erg-1. C'est à dire que ets-1 et fli-1 (ergB) sont disposés en tandem en position 11q23 et, ets-2 et erg-1 en tandem en 21q22. Et, chez la souris, ets-1 et fli-1/sic-1 sont disposés en tandem sur le chromosome 9 (Watson

Hu/Mo/Ck/X Ets-1	80000
Hu/Mo/Ck/X Ets-2	88888
Su Ets	
D Ets/ Pointed	******
Hu Erg	
Hu ErgB/Mo Fli-1	
Su Erg	
Mo GABPα	
D Pok	88888
D Elg	
Hu Elk	00000 <u>1</u>
Mo Spi-1/PU.1	
Mo PEA3	
	38888

Figure 11 : Localisation du domaine ETS dans quelques protéines de la famille Ets

Domaine amino-terminal conservé pour les protéines Ets-1, Ets-2, Erg, Fli, GABPα et Pok Domaine ETS.

Domaine R spécifique des protéines Erg et Fli.

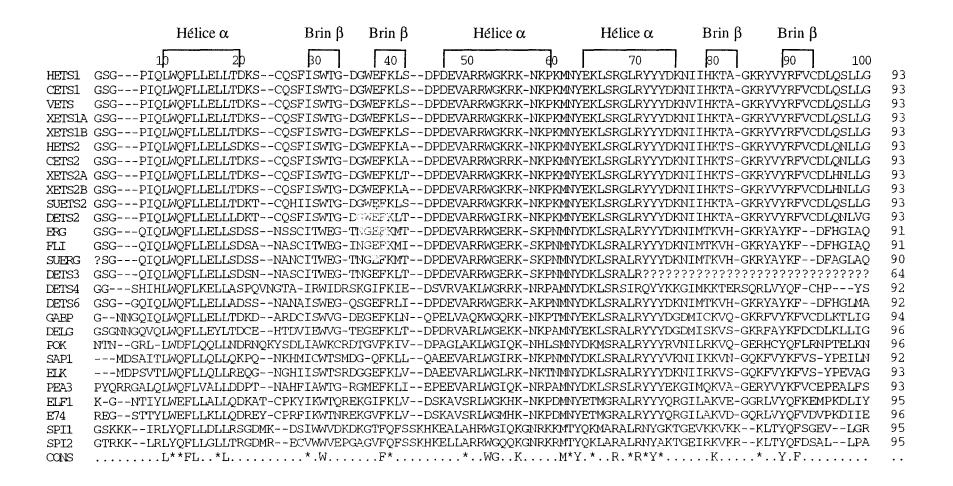


Figure 12 : Alignement des séquences du domaine ETS de la plupart des membres de la famille Ets. Les acides aminés invariants sont indiqués à la ligne CONS. Les * désignent les résidus concervés dans trois protéines sur quatre. Hélices α et brins β d'après Donaldson et al., 1994

et al., 1986). ets-2 se situe sur le chromosome 16 de souris, analogue au chromosome 21 chez l'Homme. La localisation chromosomique de erg-1 n'est pas connue chez la souris. De plus, le gène spi-1/Pu-1 a été également retrouvé chez l'Homme et la souris.

Plus encore, un parallèle s'établit entre des gènes de vertébrés et des gènes de drosophile. Respectivement, les gènes E-74, D-elg, D-ets-2/pointed, et D-ets-3 sont les équivalents chez la drosophile des gènes elf-1, $GABP\alpha$, ets-1 ou ets-2 et erg-1 ou fli-1 de vertébrés.

L'analyse de la divergence de séquences des gènes *ets* homologues dans des espèces variées retrace l'histoire phylogénétique de la famille. Neuf groupes de gènes ont pu être distingués : les groupes *ets*, *erg*, *elg*, *PEA3*, *elk*, *elf*, *D-ets-4*, *pok* et *spi* dont les 8 premiers peuvent être regroupés en une grande sous-famille : la sous-famille Ets, et le groupe *spi* forme à lui-seul la sous-famille Spi (Figure 13).

Plusieurs événements permettent d'expliquer l'extension de la famille Ets. Lautenberger et al. (1992) et Laudet et al. (1993) nous font remarquer que plusieurs duplications donnant lieu aux différents groupes de gènes autre que elg, erg, ets se sont déroulées avant la séparation Arthropodes/Vertébrés qui peut être datée à 570 millions d'années (Figure 14). De même, l'événement qui a permis d'établir, à partir d'un ancêtre ets/erg, les lignées ets et erg d'une part et elg d'autre part se situe avant la divergence Vertébrés/Invertébrés.

Puisque les séquences ets et erg sont distinctes chez l'Homme comme chez l'oursin, un ancêtre ets/erg a pu également subir une duplication pour donner les lignées ets et erg, également avant cette divergence. Chez le xénope, comme chez les autres vertébrés, ont été clonés les gènes c-ets-1 et c-ets-2. Par contre, ils ne sont pas distinguables chez les Invertébrés. Ainsi, on peut émettre l'hypothèse d'une duplication d'un ancêtre ets en gènes ets-1 et ets-2 pendant la période de 100 millions d'années entre la division Arthropodes/Vertébrés et l'apparition des Amphibiens, sur la lignée donnant naissance aux Vertébrés. Le même événement s'est déroulé, pendant la même période, à partir d'un ancêtre erg, situé sur le même chromosome que l'ancêtre ets, pour donner les gènes fli-1 et erg. Il est tentant de dire que ces dernières duplications se situent pendant l'évolution précoce des Vertébrés. On suppose alors qu'il y a eu translocation chromosomique pour obtenir les tandems de gènes ets-1-fli-1 et ets-2-erg sur les chromosomes 11 et 21 (Figure 15).

Puis, d'autres événements mineurs expliquent les autres différences entre les gènes de la famille, tel que l'apparition du génome tétraploïde chez les ancêtres du xénope il y a 300 millions d'années, donnant lieu à l'apparition de 2 gènes *ets-1* et de 2 gènes *ets-2* chez le xénope ou tel que le "mélange" d'exons ou la

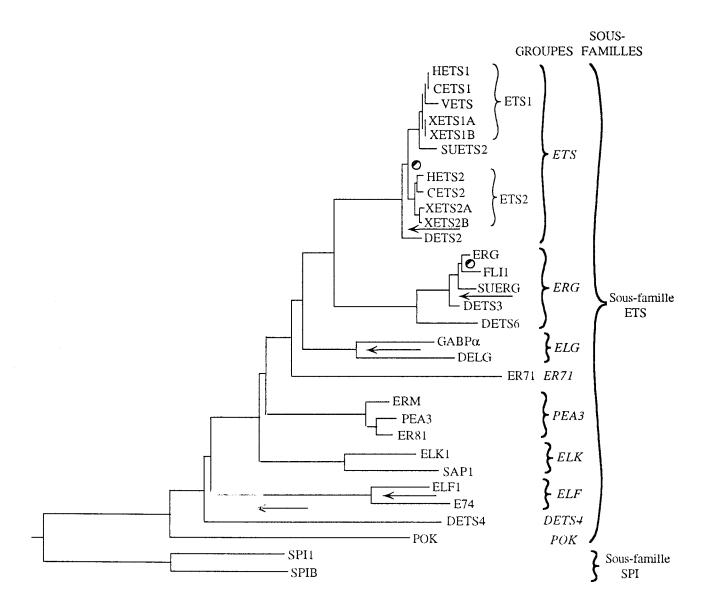
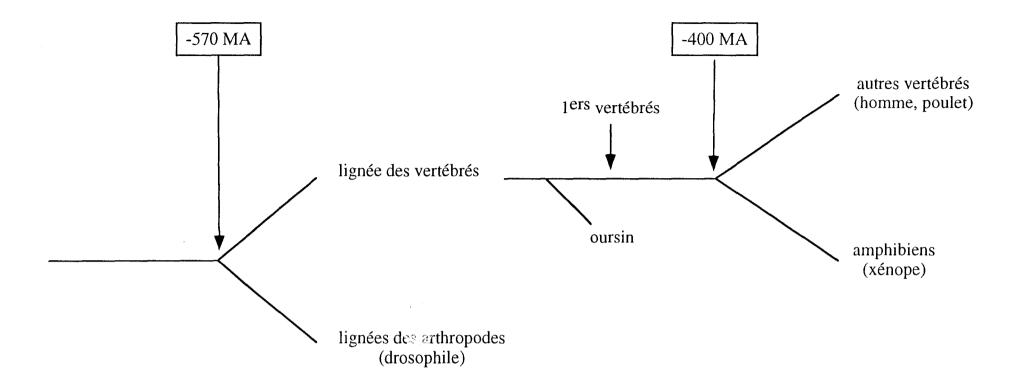


Figure 13 : Arbre phylogénétique de la famille Ets
Les flèches indiquent les équivalences possibles entre gènes
de drosophile et gènes de vertébrés
② : duplication des gènes ancestraux
(Laudet et al., 1993)



MA: millions d'années

Figure 14 : Evolution dans le règne animal

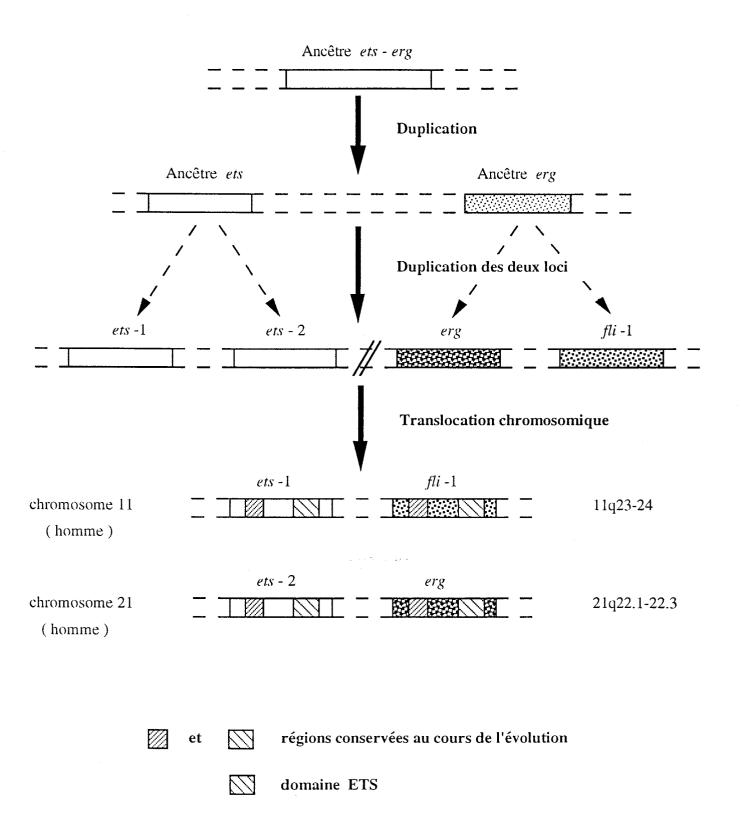


Figure 15 : Représentation schématique de l'évolution des groupes de gènes ets et erg

recombinaison expliquant la localisation, autre que carboxy-terminale, du domaine ETS dans les groupes *pok*, *elf* et *elk* uniquement. Toutes ces hypothèses sont basées sur la liste de gènes qui ont été découverts sachant que cette liste n'est peut-être pas définitive et que l'on peut encore trouver d'autres équivalents chez les divers organismes étudiés.

4. Fixation spécifique

La famille Ets constitue une famille de protéines possédant un domaine de liaison à l'ADN qui lui confère cette propriété de se fixer à l'ADN, propriété couramment retrouvée chez les facteurs de transcription. Les facteurs de transcription regroupent l'ensemble des protéines régulant la transcription des gènes, que ce soit indirectement par interaction avec d'autres protéines ou/et directement en se fixant de façon spécifique à l'ADN, aussi bien au niveau des séquences promotrices qu'au niveau de séquences réparties sur le génome, assez loin du site d'initiation. Cette définition se limitait, il y a peu de temps encore, aux protéines se fixant à l'ADN d'où l'idée que les protéines Ets pouvaient représenter une famille de facteurs de transcription.

Plusieurs approches, décrites à la même époque, ont permis de confirmer cette hypothèse et de définir plus ou moins précisément la cible nucléotidique des protéines de la famille. Par la suite, d'autres études se sont penchées sur le mode et la spécificité de fixation des différentes protéines de la famille.

4.1. Cible nucléotidique

L'une des premières approches s'est appuyée sur le fait que les gènes ets-1 et ets-2 codent des protéines nucléaires associées à la chromatine et qui fixent l'ADN in vitro. Afin de vérifier la possibilité pour Ets-1 et Ets-2 d'être des facteurs de transcription, la capacité de ces protéines à transactiver des séquences promotrices/activatrices a été analysée par des expériences de co-transfection transitoires. Parmi les nombreuses séquences testées, celle du LTR(Long Terminal Repeat) de HTLV1 (Human T cell Leukemia Virus) s'est distinguée par sa capacité à être transactivée par Ets-1 et Ets-2 en cellules NIH3T3 et Hela. La cible nucléotidique n'avait cependant pas été déterminée avec précision puisque la séquence minimale représentait une séquence comprise entre les nucléotides -117 et -160 du LTR (Bosselut et al., 1990).

En se basant sur un autre type d'expérience, la cible des protéines Ets-1 a été

mieux cernée.

D'une part, certains auteurs ont cherché à définir, par criblage d'une banque d'expression d'ADNc de thymus de souris, les protéines cellulaires impliquées dans la régulation transcriptionnelle des rétrovirus murins dans les lymphocytes T. C'est ainsi qu'il a été montré que sur une séquence de 20 pb du LTR du virus MSV (Moloney Murine Sarcoma Virus), se fixe la protéine Ets-1 murine (Gunther et al., 1990).

D'autre part, Ho et al. (1990) ont mis en évidence la fixation de la protéine Ets-1 humaine sur la séquence T α 2 (39 pb), par criblage d'une banque d'expression d'ADNc de lymphocytes T (Jurkat), en étudiant la régulation de l'expression du gène du récepteur α des cellules T humaines (TCR α).

Plus précisément, la séquence de fixation des protéines Ets-1 et Ets-2 a été relatée au site PEA3 (ACTTCCTG <--> CAGGAAGT sur l'autre brin) décrit auparavant, présent dans le domaine α de l'"enhancer" (ou séquence activatrice) de polyome (Wasylyk *et al.*, 1989), et dans le promoteur du gène de la collagénase (Gutman et Wasylyk, 1990). Dans ces deux cas, les facteurs dénommés AP1 et PEA3 agissaient de façon synergique pour activer la transcription de ces gènes par l'unité de réponse aux oncogènes et au TPA (12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acétate) plus communément appelée TORU (TPA- and Oncogene-responsive unit). Le facteur PEA3 ainsi dénommé à cause de la nécessité du site PEA3 pour réaliser sa fonction, participe également à l'induction de la transcription de l'activateur du plasminogène de type urokinase (uPA) (Rorth *et al.*, 1990). C'est le groupe de Wasylyk *et al.* (1990) qui a été le premier à déterminer que les facteurs capables de se fixer à la séquence PEA3 correspondent aux protéines p54C-ets-1, p68C-ets-1 et p58-64C-ets-2

Puisque la famille Ets regroupe d'autres membres que Ets-1 et Ets-2, d'autres études ont montré que la protéine murine Pu-1 (Klemz et al., 1990) et la protéine de drosophile E74 (Urness et Thumel, 1990) se fixent et transactivent via des séquences, appartenant respectivement à l'enhancer de SV40 et au gène E74 luimême, dans lesquels, en les comparant avec les autres séquences de fixation des protéines Ets, "ressort" le noyau riche en purines GGAA (Karim et al., 1990).

Par la suite, d'autres séquences cellulaires ou virales ont été montrées comme étant fixées par différentes protéines de la famille Ets. Le noyau GGAA/T est retrouvé invariablement dans toutes ces séquences, sauf dans deux cas exceptionnels reconnus par la protéine Spi-1/Pu-1. Si ces bases sont mutées, alors la fixation est abolie.

4.2. Spécificité de fixation

Afin de sélectionner la séquence optimale de fixation des protéines Ets, plusieurs expériences de sélection et amplification par PCR de sites de fixation (SAAB: <u>selected and amplified binding sites</u>) ont été réalisées. Les séquences concensus obtenues ainsi sont figurées sur la figure 16.

D'autres auteurs ont comparé les différentes séquences présentes dans les promoteurs ou "enhancers" qui sont fixés par les protéines, afin d'obtenir également un concensus (figure 16).

Si toutes les protéines de la famille Ets se fixent sur une même séquence de type GGAA/T, on voit mal l'utilité de la présence, en même temps dans une même cellule, de plusieurs de ces protéines si on imagine qu'elles vont avoir le même effet de régulation de la transcription sur les mêmes gènes. Mais, en comparant simplement les consensus de fixation des diverses protéines Ets, on peut tout de suite remarquer que les séquences flanquantes au noyau, même si quelques bases sont homologues entre certaines de ces séquences varient, notamment pour les protéines Pu-1 ou encore E74, comparées à Ets-1 ou PEA3 (Karim et al., 1990; Nye et al., 1992). D'ailleurs, si la protéine Pu-1 est capable de fixer les motifs PEA3 et Pu-1, la protéine PEA3, elle, ne fixe que le motif PEA3 et pas le motif Pu-1 (Xin et al., 1992). De même, toutes les séquences contenant le noyau GGAA/T ne sont pas fixées par les protéines Ets-1 et Ets-2 (Ascione et al., 1992). Par exemple, les séquences EBS1 (NFAT1) et EBS2 (NFIL-2B) de l'enhancer de l'IL2 ne fixent ni Ets-1, ni Ets-2 mais, par contre, fixent Elf-1 in vitro. Ce membre de la famille a d'ailleurs été isolé par criblage grâce à ces séquences (Thompson et al., 1992).

Divers motifs Ets (EBS pour "Ets Binding Site") semblent être sélectifs vis-àvis des facteurs, tout comme la plupart des protéines de la famille sélectionnent leur motif de fixation. Par exemple, Elk-1 est moins exigeant que Erg puisque Elk-1 se fixe, entre autres, sur la séquence E74 alors que Erg-1 ne transactive que par cette séquence. C'est du moins ce qui a été montré jusqu'à présent.

Ainsi, ceci suggère que les nucléotides flanquant le noyau influencent la spécificité de l'activité de liaison à l'ADN des protéines Ets. Ceci semble normal puisqu'il a été montré, par exemple, que plus de 18 nucléotides sur le brin d'ADN sont en contact avec la protéine Ets-1 murine (Nye et al., 1992), ceux-ci se répartissant sur le grand sillon pour les nucléotides centraux (CC/aGGA) et sur le sillon mineur pour les nucléotides flanquants. Leur accessibilité dépend donc des séquences environnant le motif central. Ces remarques ont été confirmées par les études structurales réalisées sur le domaine ETS (Donaldson et al., 1994; Liang et al.,

Protéine	Espèce		Consensus de séquence de fixation par la technique SAAB											Références
(homme		Pu	C/G	C/a	G	G	A	A	G	T/c	Ру		Fisher R.J. et al., 1991 (GGAA fixé)
Ets-1	souris		A/g	C	C/a	G	G	Α	A/T	G/a	C/T	N		Nye et al., 1992 Brown et McKnight, 1992
ſ	poulet		Α	C	C/A	G	G	Α	А/Т	G/A	T	T		Woods et al., 1992
Ets-2	poulet		C	C	Α	G	G	A	Α	G	T	G		Woods et al., 1992
Fli-1	homme	∫ G/A	Α	C	С	G	G	A	Α	G/a	T/C	A/G	G/A	Mao et al., 1994
		1		C	C/A	G	G	Α	Α	G	T			Zhang et al., 1993
Erg-2	homme			C/G	C/a	G	G	A	Α	G/a	T			Murakami et al., 1993 (GGAA fixé)
ER71	rat		G/C	C/G	C/a	G	G	A	T/A	G/a	T/c			
ER81	rať		G/a	G/c	C/a	G	G	Α	A/T	G/a	T/c			Brown et McKnight, 1992
GAΒPα	rat		G/A	C/g	C/a	G	G	Α	A/t	G/a	T/C			Brown of Morningth, 1992
E74	drosophile	: {	С/Т	C	C/a	G	G	Α	Α	G/a	T			
		A	C/T	C	C/A	G	G	A	A	G	T	N		Urness et Thummel, 1990
Consensus de séquence de fixation par analyse des promoteurs régulés														
"memb de la famil		A/G	A/G	G/C	A/C		G	A	A/t	A/G	Α/Т	A/G		Wang et al., 1992
"EBS" or	otimal		G	С	C	G	G	A	Α	G	T			Fisher et al., 1994
PEA	.3				A/C	G	\mathbf{G}_{i}	A	Α	G	T			Xin et al., 1992
Spi	i	Α/Γ	A/t	A/t	G/a	G/A	G	A	Α	G/c	T/c	T/G		Kominato et al., 1995
Erp	•	G/A	G/A	C/A	C/A	G	G	A	A/t	G/a	C/T	N		Lopez et al., 1994

Figure 16 : Séquences concensus de fixation des protéines de la famille Ets

1994b). De même, Wasylyk *et al.* (1992) montrent que ce sont les séquences qui se trouvent en dehors d'un motif de 10 nucléotides, comprenant GGAA au centre, qui influencent la fixation des protéines Ets-1 et Pu-1 sur les motifs PEA3 et Pu-1.

La protéine Fli-1 est incapable de fixer les séquences localisées dans les promoteurs ou zones activatrices reconnues par Ets-1 et/ou Elf-1 (il faut ACCGGAA). Les différents mutants de délétion réalisés par Mao *et al.* (1994) montrent que c'est le domaine ETS de Fli-1 et lui seul qui confère cette spécificité.

En général, on peut dire que c'est l'ensemble de la séquence, et non pas une seule base, qui parait critique pour la spécificité de l'un ou l'autre des facteurs mais, la protéine Elf-1 est un cas particulier. Elle est incapable de fixer une séquence comportant le noyau GGAT alors qu'elle fixe très bien certaines séquences au noyau GGAA (Wang et al., 1992; Bosselut et al., 1993). En fait, la responsabilité d'un seul acide aminé de la protéine a été mise en cause pour la reconnaissance GGAA ou GGAT. Il s'agit d'un résidu thréonine (T) en position 54 dans le DBD (numérotation définie dans Bosselut et al., 1993), que l'on retrouve uniquement dans les protéines Elf-1 et E74, alors que dans toutes les autres protéines de la famille, c'est un résidu lysine (K) qui se trouve à cet endroit. Cet acide aminé se situe en fait dans la région CRIII (Bosselut et al., 1993) correspondante à l'hélice α3 de reconnaissance (Donaldson et al., 1994; Liang et al., 1994b). La protéine Ets-1 est capable de reconnaître des motifs GGAA ou GGAT, mais lorsqu'on remplace la lysine par une thréonine comme dans Elf-1, elle devient incapable de reconnaître une séquence GGAT. Parallèlement, la mutation T54K introduite dans Elf-1 supprime sa capacité de discrimination entre les noyaux GGAA et GGAT des séquences EBS (Bosselut et al., 1993).

La protéine Spi-1/Pu-1 constitue une exception puisque, tout comme elle fixe des séquences GGAA, elle est capable de réguler l'expression de la chaîne J d'immunoglobuline par un motif GCAGAA qui n'est pas reconnu par la protéine Ets-1 (Shin et Koshland, 1993). Spi-1/Pu-1 semble être également impliquée dans la régulation de l'expression de l'intégrine CD11b spécifique des cellules myéloïdes, en passant par le motif GGAGAA (Pahl *et al.*, 1993).

Parfois, plusieurs sites Ets sont trouvés côte à côte. Il peut s'agir de séquences palindromiques comme dans le promoteur du gène PGK-1 (phosphoglycérate kinase-1) sur lequel le facteur Tin-1, qui pourrait peut être correspondre à ER71 (Romano-Spica et al., 1994) exerce une régulation négative (Goto et al., 1991). Ou encore, des séquences Ets en répétition directe ont été mises en évidence dans le gène de la sous-unité IV de la cytochrome c oxydase régulée par le facteur NRF2 qui reste à être défini (Virbasius et Scarpulla, 1991). Ceci est aussi le cas pour

l'"enhancer" d'un gène précoce de HSV (<u>H</u>erpes <u>s</u>implex <u>v</u>irus) qui contient deux sites Ets côte à côte fixant chacun une protéine GABPα, sous-unité du complexe GABP (2 GABPα + 2 GABPβ) (Figure 17). Les séquences GGA, dans ce cas, sont séparées par un demi-tour d'hélice d'ADN, plaçant les contacts au grand sillon sur des faces opposées de l'hélice d'ADN (Thompson *et al.*, 1991 ; Thompson et McKnight, 1992).

La protéine GABPα interviendrait peut être également sur la régulation de la transcription du gène CD18 en reconnaissant l'un des deux sites Ets inversés du promoteur, l'autre pouvant être reconnu par Pu-1 (Böttinger *et al.*, 1994).

Dans tous les cas étudiés, le domaine ETS fixe les motifs EBS en monomère (Fisher et al., 1992 ; Nye et al., 1992 ; Wasylyk et al., 1992 ; Liang et al., 1994a) et on ne peut pas dire qu'il y a interaction directe par les protéines de la famille Ets entre elles. Cependant, Galang et al. (1994) ont démontré une flexibilité limitée dans l'espacement et l'orientation des sites Ets, situés dans les éléments ORE (Oncogene response element) de certains promoteurs, pour que l'activation oncogénique de Ras puisse induire efficacement l'activation de la transcription par les facteurs de la famille Ets.

En conclusion, même quand plusieurs protéines Ets peuvent fixer avec une affinité comparable les mêmes séquences cibles *in vitro*, cela ne veut pas dire pour autant que la régulation transcriptionnelle *in vivo* se fera également par ces différentes protéines. En effet, dans la cellule, la protéine n'est pas seule avec l'ADN et, ainsi, d'autres critères interviennent, que ce soit au niveau de la fixation par elle-même comme nous le développons dans le paragraphe suivant "modification de la liaison à l'ADN" ou, comme nous le traitons dans le chapitre "facteurs de transcription", par des régulations de l'activité transcriptionnelle.

5. Modification de la liaison à l'ADN

5.1. Modification de la fixation par régions régulatrices

Bien que le domaine ETS soit suffisant pour la liaison directe à l'ADN, des régions en dehors de ce domaine peuvent moduler cette activité puisque certaines protéines Ets délétées ne montrent pas la même capacité de fixation que les protéines entières.

5.1.1. Régions régulatrices dans les protéines Ets-1 et Ets-2

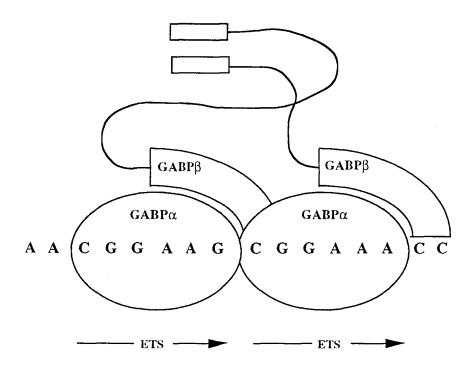
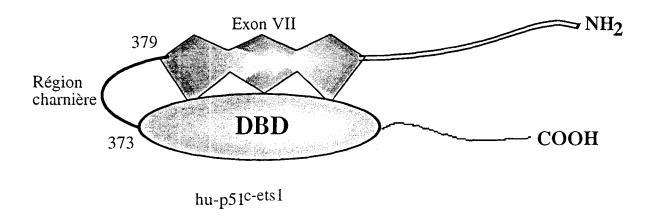


Figure 17 : Représentation schématique du complexe entre le tétramère GABP α 2 β 2 et l'''enhancer'' d'un gène IE du virus HSV-1

Dans Ets-1 et Ets-2, trois régions semblent influencer négativement la liaison à l'ADN : une région centrale de 70 acides aminés environ, une région de 90 acides aminés s'étendant en amont du domaine ETS et la région carboxy-terminale.

Les protéines Ets-1 et Ets-2 ont une région de 90 acides aminés adjacente au domaine de liaison à l'ADN, correspondante à l'exon VII de Ets-1, et qu'on ne retrouve pas chez les autres membres de la famille Ets. Cette région supporte deux fonctions biologiques: l'inhibition de la liaison à l'ADN et l'activation de la transcription (Wasylyk et al., 1992). L'inhibition de la liaison à l'ADN apparaît être une propriété due à la région entière puisque plusieurs sous-régions de ce domaine peuvent être mutées sans affecter de façon significatrice l'impact inhibiteur. Les auteurs pensent que, puisque le domaine inhibiteur réduit aussi les interactions entre protéines et anticorps reconnaissant le domaine ETS, l'effet de ce domaine sur la protéine s'exerce avant l'interaction avec l'ADN. L'hypothèse émise propose la formation d'un complexe intramoléculaire entre l'inhibiteur et le domaine ETS, bloquant ainsi son accès à l'ADN, par de multiples interactions entre les acides aminés répartis tout au long de la région. Ceci semble d'autant plus plausible que la région entre l'inhibiteur et le domaine ETS (p68c-ets-1 : 373-379/c-Ets-2 : 367-373) semble être particulièrement flexible, selon des prédictions informatiques, ce qui lui donnerait un rôle de charnière permettant le repliement de la protéine et l'interaction entre les deux domaines (Wasylyk et al., 1992) (Figure 18). Ainsi, si l'exon VII est délété, soit par mutation, soit naturellement par épissage alternatif (Reddy et Rao, 1988; Koizumi et al., 1990; Pognonec et al., 1990; Jorcyk et al., 1991; Fisher et al., 1992), la protéine générée (p42c-ets-1 chez l'homme, p52c-ets-1 chez la souris) fixe l'ADN spécifiquement avec plus d'efficacité que le produit non épissé (Wasylyk et al., 1992). Ou, plus exactement, sur un site optimum de fixation EBS (GCCGGAAGT), les cinétiques de liaison à l'ADN diffèrent entre la p51 (hu Ets-1) et la p42 (ΔVII). La fixation de la p51 à EBS n'est que de courte durée alors que la fixation de la p42 est plus lente mais aussi plus stable (Fisher et al., 1994).

D'autre part, l'effet de la région carboxy-terminale sur la liaison à l'ADN est incontestable. Il est par contre moins évident de préciser son rôle exact lorsqu'on se penche sur les résultats divergents obtenus en ce qui concerne la capacité de liaison à l'ADN des protéines c-Ets-1 et v-Ets. En effet, certains auteurs ont mis en évidence la répression de la liaison à l'ADN au sein de la protéine c-Ets-1, par son extrémité carboxy-terminale, soit par l'augmentation de la liaison à l'ADN lors de la délétion de 18 acides aminés carboxy-terminaux (Hagman et Grosscheld, 1992), soit en montrant que cette répression est perdue dans la protéine v-Ets qui diffère de c-Ets-1



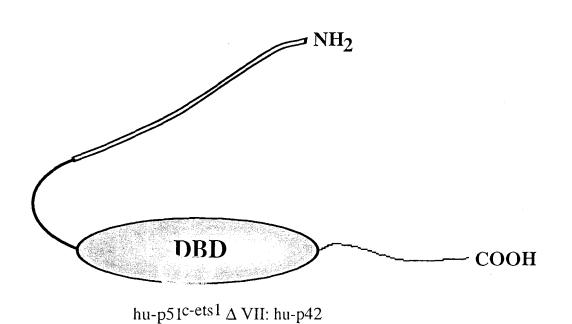


Figure 18:

Interaction intramoléculaire entre le domaine codé par l'exon VII et le DBD (domaine ETS) (d'après les données de Wasylyk et al., 1992). D'où les cinétiques de liaison différentes de la p51 et p42 sur un site EBS.

notamment par son extrémité carboxy-terminale (Lim et al., 1992). Leur modèle repose sur l'interaction intramoléculaire entre le domaine carboxy-terminal et une autre région inhibitrice de 70 acides aminés environ (p68c-ets-1 : 207-280) correspondant à l'exon VI de Ets-1. Le domaine de liaison à l'ADN de c-Ets-1 est alors "masqué" dans la protéine c-Ets-1, qui devient incapable de fixer une sonde oligonucléotidique "PEA3". Il faudrait alors qu'un mécanisme intracellulaire encore inconnu intervienne pour lever la répression de fixation à l'ADN et permettre à c-Ets de se trouver dans une conformation "ouverte" et de jouer son rôle de transactivateur par fixation sur une séquence cible. Ce mécanisme intracellulaire ne correspond ni à la phosphorylation, ni à la perturbation d'interactions moléculaires, hypothèses qui ont été testées et se sont révélées inefficaces dans ce modèle. Par contre, lorsque le domaine carboxy-terminal inhibiteur est délété artificiellement ou modifié, comme c'est le cas dans v-Ets, la répression est perdue et la protéine est capable de fixer l'ADN (Lim et al., 1992) (Figure 19).

D'autres groupes, apparemment en contradiction avec ces résultats, ont montré que le remplacement de la partie carboxy-terminale de c-Ets-1 par celle de v-Ets a pour conséquence de diminuer la capacité de fixation à l'ADN que possède la protéine c-Ets-1 (sur DNA cellulose : Reddy et Rao, 1990 ; sur sonde PEA3 un peu différente de celle de Lim *et al.*, 1992 : Wasylyk et Wasylyk, 1992 ; Leprince *et al.*, 1992).

De plus, le domaine ETS serait plus sensible dans v-Ets que dans c-Ets-1 et c-Ets-2 puisqu'il montre une plus grande susceptibilité aux traitements par des agents réducteur/oxydant, à la phosphorylation et même aux concentrations des composants présents dans le tampon de réaction lors des expériences de "retard sur gel". Par contre, la queue carboxy-terminale de c-Ets-1 et de c-Ets-2 apporterait une protection au domaine ETS, puisqu'elle confère une résistance à tout cet ensemble d'"agents inactivants". L'hypothèse repose sur le fait que la région carboxy-terminale, et aussi la région codée par l'exon VII dont on a parlé précédemment, sont chargées négativement et peuvent interagir avec le domaine ETS chargé positivement (Figure 20). Dans v-Ets, la séquence carboxy-terminale de la protéine est neutre, ce qui casse l'interaction et provoque une perte de la protection : la protéine se trouve dans une conformation "ouverte" (Wasylyk et Wasylyk, 1993).

Ainsi, les résultats divergents concernant la capacité de liaison à l'ADN des protéines c-Ets-1 et v-Ets ne sont pas forcément contradictoires puisqu'ils peuvent en partie être dus aux différences de conditions expérimentales. Ces variations pourraient d'ailleurs refléter des modulations similaires *in vivo*.

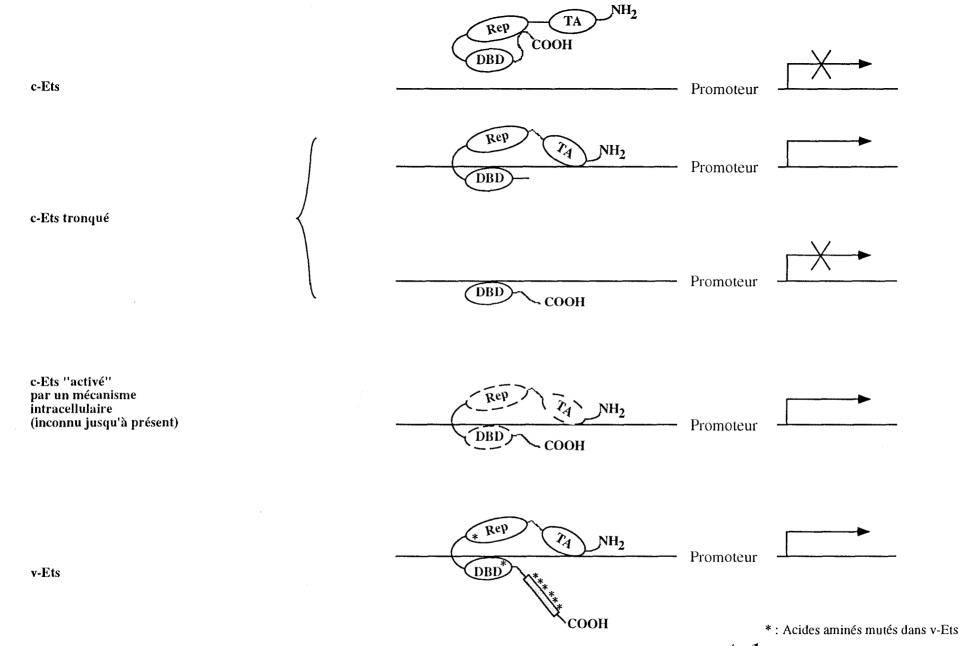
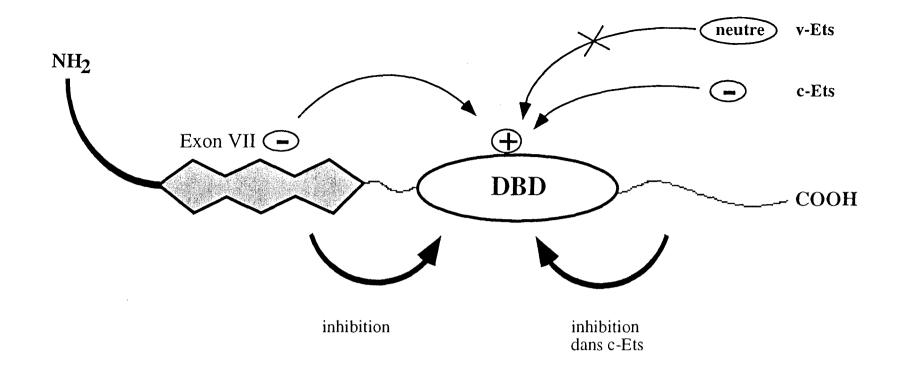


Figure 19 : Modèle d'inhibition intramoléculaire de la fixation à l'ADN de la p68^{c-ets-1} (d'après Lim *et al.*, 92) DBD: domaine de liaison à l'ADN; TA: domaine transactivateur; Rep: domaine répresseur

F19



: interaction intramoléculair : effet inhibiteur sur la liaison à l'ADN

: charges portées par les différents domaines

Figure 20 : Interactions intramoléculaires et inhibition de la liaison à l'ADN.

Différence entre c-Ets et v-Ets (d'après Wasylyk et Wasylyk, 1993)

DBD: domaine de liaison à l'ADN

Que ce soit par la formation d'un complexe entre les domaines VII et ETS, ou l'existence de conformations ouverte et fermée par l'extrémité carboxy-terminale et la région centrale, les modèles proposés font intervenir des interactions intramoléculaires.

Il faut aussi se souvenir que la structure d'une protéine n'est pas figée. L'ADN semble affecter la conformation de certains facteurs de transcription. Ainsi, Hahn et Wasylyk (1994) émettent l'hypothèse d'une transition de la forme "fermée" à la conformation "ouverte" selon l'ADN. Seuls les sites de forte affinité induiraient efficacement le changement de conformation de la protéine c-Ets-1, tandis qu'il ne serait pas nécessaire ou plus facile pour v-Ets, devenu moins sélectif par la mutation de sa partie carboxy-terminale. En effet, une autre donnée, différente de la notion de spécificité décrite auparavant, doit être prise en compte : c'est la sélectivité. La protéine v-Ets est moins exigeante que c-Ets-1 dans la sélection du site de fixation. C'est à dire que, pour un même noyau GGAA, v-Ets, contrairement à c-Ets-1, se fixera sur une cible dont les séquences flanquantes s'éloignent du consensus. On parle ainsi de site à forte ou à faible affinité (Hahn et Wasylyk, 1994). Ce type de différence d'affinité par des protéines mutantes et sauvage a déjà été décrit pour la p53 par exemple : lorsque la p53 sauvage "rencontre" un "bon" site, sa conformation devient "ouverte" (Niewolik et al., 1995).

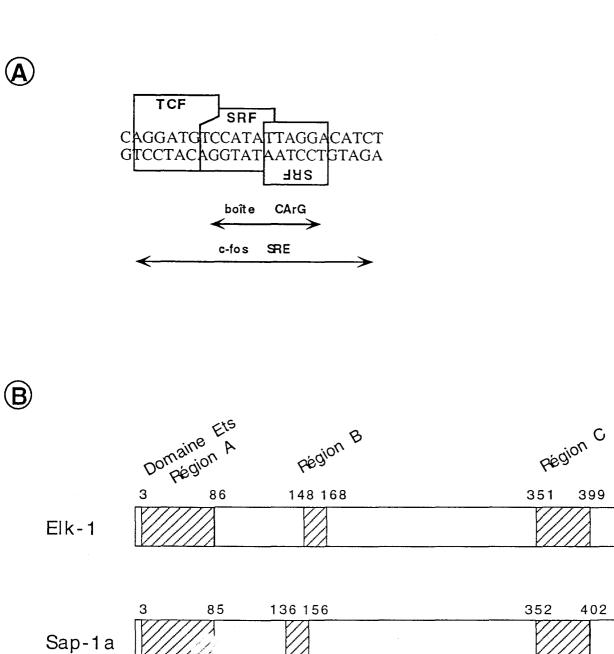
5.1.2. Région régulatrice dans la protéine Elk-1

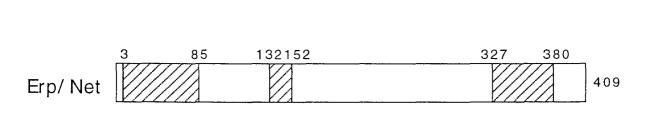
La présence d'un domaine de régulation négative de la fixation à l'ADN (NRD : "Negative Regulatory DNA binding domain") a également été mise en évidence dans une autre protéine de la famille Ets: la protéine Elk-1 (Rao et al., 1989). Elk-1 est capable de se fixer sur des séquences EBS telles que E74, PEA3 ou encore la séquence MSV LTR mais aussi, sous la forme d'un complexe ternaire, au niveau du SRE (Sérum Responsive Element) du promoteur c-fos, en présence du SRF (Sérum Responsive Factor) (Figure 21).

Un peptide correspondant uniquement au domaine de liaison à l'ADN de Elk-1 fixe le SRE de façon autonome, contrairement à la protéine entière, suggérant la présence d'un potentiel NRD (acides aminés 89-205, Rao et Reddy, 1992b; ou plus précisément: région "B", acides aminés 148-168, Janknecht *et al.*, 1994), en 3' du DBD (Figure 22). Ce NRD empêcherait la fixation autonome de la protéine Elk-1 au SRE ou sur les autres séquences cibles, sûrement en masquant le DBD. Cette région est également responsable, avec le domaine ETS, de la formation du complexe ternaire

428

431

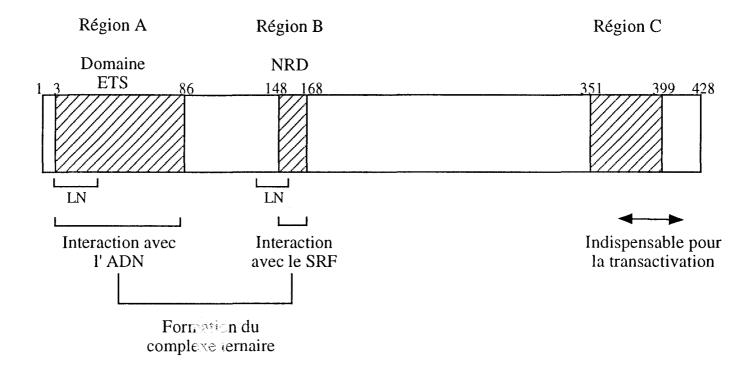




Régions concervées

Figure 21 : A Complexe ternaire Elk-1/SRF/SRE

B La sous-famille Elk-1/ Sap-1/ Net



<u>Légendes</u>

LN Domaines responsables de la localisation nucléaire

Régions conservées dans les membres de la sous-famille Elk-1/ Sap-1/ Net

Les chiffres indiquent les acides aminés de la protéine Elk-1

Figure 22 : Domaines fonctionnels de Elk-1

avec le SRF, sur le SRE. Donc, une fois encore, on peut parler de conformation ouverte ou fermée de la protéine. Dans ce cas, on sait que c'est une interaction protéine-protéine qui permet la transition vers la forme ouverte.

De même que pour la région de l'exon VII de Ets-1, un variant Δ Elk-1 issu d'un épissage alternatif a été décrit, ayant perdu le NRD et les 11 derniers acides aminés du DBD (Rao et Reddy, 1993). Cette protéine a perdu la capacité de former un complexe ternaire et d'activer la transcription de c-fos. Elle montre une spécificité de fixation à l'ADN différente de la protéine entière et peut fixer le SRE de façon autonome. Ce variant naturel a sûrement un rôle de régulation à jouer, par rapport à la protéine Elk-1 entière, dans la cellule dans laquelle il sera exprimé (Bhattacharya et al., 1993 ; Rao et Reddy, 1993).

5.1.3. Région régulatrice dans la protéine Erp/Net

Une autre protéine de la famille Ets, récemment caractérisée, contient un domaine de régulation négative de la liaison à l'ADN séquence spécifique. Il s'agit de Erp/Net (Figure 21), protéine voisine de Elk-1, qui interagit avec la séquence de fixation E74. Cependant, l'activité de liaison à cette séquence n'est significative que lorsque la partie carboxy-terminale de la protéine est délétée. A nouveau, on peut supposer que le domaine carboxy-terminal réprime la liaison à l'ADN par un mécanisme intramoléculaire qui masquerait le domaine ETS, situé dans la région amino-terminale de la protéine. Une interaction avec une autre protéine, ou encore, une modification post-traductionnelle pourrait alors lever l'inhibition et augmenter l'affinité de Erp/Net pour l'ADN (Giovane et al., 1994; Lopez et al., 1994).

5.2. Modification de la fixation par phosphorylation et épissages alternatifs

Les protéines Ets-1 et Ets-2 deviennent rapidement phosphorylées en réponse aux ionophores ou autres conditions qui augmentent la concentration de calcium intracellulaire (Fujiwara et al., 1988b; Pognonec et al., 1988; Fujiwara et al., 1990; Koizumi et al., 1990). Dans les cellules humaines, une protéine Ets-1 de 51 kDa est détectée, ainsi qu'une isoforme phosphorylée de 53 kDa (Koizumi et al., 1990). Hu-Ets-2 est une protéine de 54 kDa qui passe à 56 kDa sous l'effet de la phosphorylation (Fujiwara et al., 1988a; 1988b; 1990). Ets-1 et Ets-2 contiennent toutes les deux des sites consensus pour la phosphorylation par des kinases telle que, par exemple, la "calcium/calmodium kinase". Plusieurs auteurs ont montré, en relation avec ceci, que la phosphorylation des protéines Ets diminue leur

capacité de fixation à l'ADN non spécifique (Pognonec et al., 1989; 1990; Boulukos et al., 1990) ou spécifique (Fisher et al., 1994; Rabault et Ghysdael, 1994). Des résidus sérine situés au niveau de séquences consensus de phosphorylation sont localisés dans la partie de la protéine correspondant à l'exon VII. Celui-ci se trouve éliminé dans l'isoforme de Ets-1 de 42 kDa qui provient d'un événement d'épissage alternatif (Koizumi et al., 1990; Jorcyk et al., 1991; Fisher et al., 1992). Nous avons précédemment précisé que le domaine codé par l'exon VII était également impliqué dans la répression intramoléculaire de l'activité de fixation à l'ADN, mais des analyses de l'effet de mutation des quatre résidus sérine potentiellement phosphorylés suggèrent qu'ils ne sont pas impliqués dans cette propriété d'inhibition intramoléculaire de la liaison à l'ADN (Rabault et Ghysdael, 1994). La phosphorylation de la protéine Ets-1 (qui a lieu pendant l'activation des cellules T et B) semble imposer un niveau supplémentaire de contrôle dans l'activité du domaine inhibiteur.

Les événements de phosphorylation pourraient, par exemple, modifier la conformation de Ets-1 d'un état compétent pour la liaison à l'ADN à un état incompétent. Celui-ci pourrait résulter d'interactions spécifiques entre les groupes phosphates des résidus sérine cibles et les acides aminés basiques du domaine ETS qui sont essentiels pour l'activité de liaison à l'ADN de la protéine (Rabault et Ghysdael, 1994).

Fleishman *et al.* (1993), en étudiant l'expression des protéines Ets durant le cycle cellulaire à partir de cellules synchronisées, ont révélé la présence d'une isoforme hyperphosphorylée de Ets-1 (et pas pour Ets-2) durant la phase mitotique. Ou, plus exactement, la forme Ets-1 hyperphosphorylée est présente transitoirement pendant la phase précoce de la mitose, avant ou aux environs de la transition métaphase-anaphase. Cette forme semble provenir de phosphorylation sur un résidu sérine, différent de ceux habituellement touchés dans les formes simplement phosphorylées, et aussi localisé dans le domaine de la protéine codé par l'exon VII. Cette phosphorylation ne semble pas altérer l'activité de liaison à l'ADN séquence-spécifique (Fleischman *et al.*, 1993). Cependant, il se peut qu'il y ait un changement dans la séquence cible. Ou alors, la phosphorylation permet de maintenir la fixation à l'ADN pendant la condensation de la chromatine ou induit un changement de conformation du complexe protéine-ADN, ce qui pourrait influencer l'interaction de la protéine avec d'autres facteurs de transcription. Autant d'hypothèses qui, pour l'instant, n'ont pas été démontrées.

Nous verrons plus tard que la phosphorylation peut avoir un impact sur d'autres propriétés de la protéine.

5.3. Modification de la fixation par interaction intermoléculaire

Un des sous-groupes de la famille Ets est constitué par les TCFs (pour Ternary Complex Factors). Plusieurs TCFs différents ont été identifiés : Elk-1 (Hipskind et al., 1991), Sap-1 (Dalton et Treisman, 1992) et, le dernier caractérisé, Erp/Net (Giovane et al., 1994 ; Lopez et al., 1994). Ils sont capables de se fixer sur certaines séquences cibles Ets (EBS) et aussi sur la séquence SRE du promoteur de c-fos. Mais, dans ce cas, une fixation stable des TCFs sur le SRE se forme seulement si s'établissent des contacts protéine-protéine entre le facteur SRF, déjà fixé à l'ADN sur sa séquence cible proche du noyau GGAT, et la région B homologue à tous les TCFs (Figures 21 et 22). L'interaction intermoléculaire est donc indispensable dans ce cas pour activer la transcription du gène c-fos qui, lui-même, intervient dans la régulation précoce des événements de transcription dans une cellule (Dalton et Treisman, 1992 ; Janknecht et Nordheim, 1992 ; Treisman et al., 1992 ; Janknecht et al., 1994 ; Lopez et al., 1994 ; Shore et Sharrocks, 1994).

5.4. Modification de la fixation par compétition sur la cible ADN

5.4.1. Pax

De récentes études ont permis de montrer une nouvelle façon de modifier la fixation des protéines Ets à leur séquence cible. Elle fait intervenir une protéine de la famille Pax issue de gènes impliqués dans le contrôle du développement chez divers organismes. Dans le cas étudié, il s'agit de la protéine Pax-QNR de caille, homologue à la protéine Pax-6 de souris. Elle possède deux domaines de liaison à l'ADN souvent présents dans des protéines jouant un rôle important dans le contrôle du développement: le domaine paired et le domaine homéo. Le noyau de séquence reconnu par le domaine paired des protéines Pax est TTCC (équivalent de GGAA sur le brin complémentaire). Les auteurs n'ont pas manqué de reconnaître là, le site de fixation des protéines Ets. Ils ont donc montré que la protéine Pax-QNR produite in vitro était capable de reconnaître certains EBS tels que MSV-LTR, PEA3 max ou encore PyB (la séquence enhancer du polyomavirus) et même de transactiver un gène "rapporteur" par l'intermédiaire de la séquence MSV-LTR. Par contre, Pax-QNR ne transactive pas par la séquence PyB mais est capable d'inhiber la capacité de transactivation de la protéine p68c-ets-1 ou p55erg par cette séquence. Il se peut que la fixation de la protéine Pax-QNR sur la séquence PyB empêche la fixation des protéines Ets par un simple mécanisme d'"occlusion" et que la transactivation par Pax-QNR ne soit possible qu'avec l'aide d'un autre facteur de transcription, ce qui permettrait une régulation tissu-spécifique ou temporelle, ou sur certains sites placés dans un contexte particulier de séquence (Plaza *et al.*, 1994).

5.4.2. NFAT

L'induction du gène IL-2 (Interleukine 2), après l'activation des cellules T, requiert un élément NFAT-1 qui contient un site AP-1 précédé d'un site contenant le motif GGAA. Une protéine de la famille Ets, Elf-1, est capable de se fixer sur ce site *in vitro*, en coopération avec Fra-1 et JunB (Boise *et al.*, 1993). Ceci est semblable au rôle du complexe Elf-1/AP1 pour l'induction du gène GM-CSF (Leiden *et al.*, 1992). Cependant, d'autres résultats sont en contradiction avec cette identification puisque Elf-1 ne semble pas être le composant du complexe NFAT observé *in vivo*. Il s'agirait plutôt du facteur, nommé NFAT, qui présente une certaine homologie avec le produit p65 du gène *relA* et qui a donc pour cible nucléotidique le noyau GGAA (McCaffrey *et al.*, 1993). Même si ceci reste à démontrer, on peut imaginer qu'il puisse y avoir compétition des protéines de la famille Ets et de la famille Rel ou que chacune ait un moment et un contexte protéique bien précis pour se fixer sur l'ADN et réguler la transcription.

6. Structure du domaine ETS

6.1. Avant les données de structures 2D et 3D

L'alignement des séquences du domaine ETS de tous les membres de la famille indique que 18 % des acides aminés sont parfaitement conservés et que 14 autres % sont retrouvés dans la plupart des cas (Lautenberger et al., 1992 ; Laudet et al., 1993). Ces acides aminés conservés se situent notamment dans les portions amino- et carboxy-terminales du domaine, de part et d'autre d'une région charnière dans laquelle seulement deux acides aminés sont préservés entre toutes les protéines Ets alignées. A l'origine, la formation d'une hélice α dans la partie amino-terminale du domaine a été prédite par analyse informatique (programmes de prédiction de structure secondaire) et la forte concentration d'acides aminés basiques dans la partie carboxy-terminale lui a valu le nom de domaine basique (Wang et al., 1992) (Figure 23).

Les comparaisons de séquences n'ont jamais révélé aucune homologie convaincante du domaine ETS avec les autres motifs de liaison à l'ADN déjà connus et bien caractérisés comme le "doigt de zinc", le domaine homéo, le motif

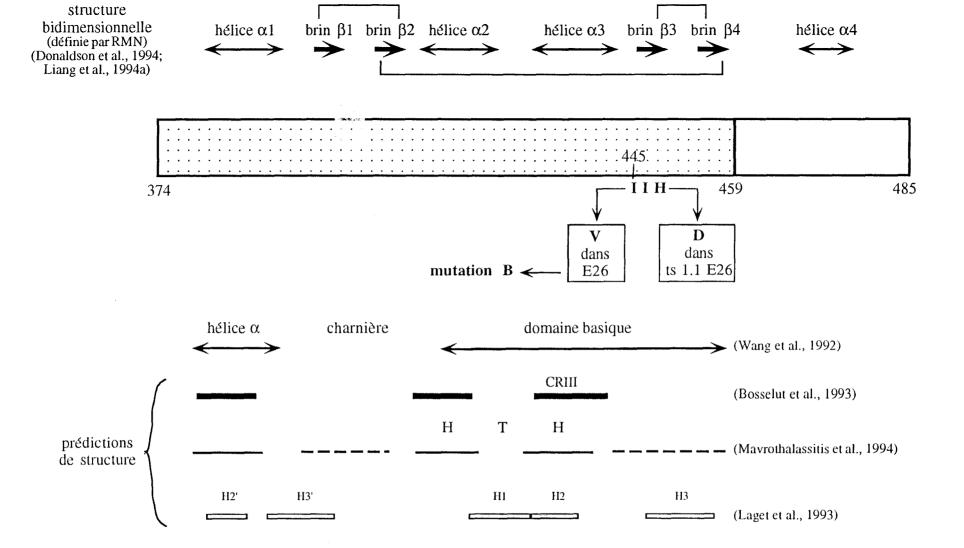


Figure 23 : Structure du domaine ETS et de la queue carboxy-terminale de la protéine p68c-ets-1 HTH: "Helix Turn Helix" La topologie du feuillet β est figurée par des lignes joignant les brins β Domaine ETS

HTH ("Helix-Turn-Helix") ou encore "leucine zipper" (Karim *et al.*, 1990). Les nombreux résidus chargés positivement du domaine basique ne peuvent pas vraiment être alignés avec les résidus basiques d'autres types de domaine de liaison à l'ADN. L'élément de reconnaissance des protéines Ets (GGAA/T) n'est similaire à aucun autre site consensus de fixation à l'ADN d'autres protéines. Le "modèle" de contacts de la protéine sur le grand, et aussi sur le petit sillon d'ADN, couvre une région qui est grande, et donc, inhabituelle pour la fixation d'une protéine sous forme de monomère, et ne ressemble pas aux types de contacts déjà connus (Nye *et al.*, 1992).

Ce sont autant d'observations qui ont d'abord conduit les différents auteurs qui se sont penchés sur le sujet à conclure que la famille ETS comportait un nouveau motif structural de liaison à l'ADN. Cependant, la présence de trois résidus tryptophane, dont deux sont strictement conservés dans tous les membres de la famille, espacés de 17 à 18 acides aminés, rappelle les répétitions de tryptophanes observées dans les protéines de la famille Myb (Anton et Frampton, 1988). Ceci, ainsi que la prédiction de structure secondaire par la méthode HCA (Hydrophobic Cluster Analysis) suggéraient que le domaine ETS pouvait être similaire au domaine de liaison à l'ADN de Myb et éventuellement à celui de la protéine HMG (High Mobility Group). Ceux-ci sont composés de deux motifs HTH (Laget et al., 1993). D'autres prédictions de structure secondaire, par analyse informatique, avait identifié, en plus de l'hélice α localisée dans la partie amino-terminale du domaine, un éventuel motif HTH dans la région basique du domaine ETS de la protéine Ets-1 (Reddy et Rao, 1990; Bosselut et al., 1993; Mavrothalassitis et al., 1994) ou "H-T-H-T-H" pour la protéine Spi-1/Pu-1 (Galson et al., 1993 ; Klemsz et al., 1990) sachant que celle-ci est la plus éloignée de Ets-1 dans l'évolution et qu'il peut donc y avoir une différence par rapport aux autres membres de la famille. La présence et la localisation des hélices formant le motif HTH ont en effet pu être confirmées par de récentes études de détermination de structure secondaire par les techniques de RMN, dichroïsme circulaire et FT-IR spectroscopie (Donaldson et al., 94 ; Liang et al., 1994a) sur le domaine ETS des protéines Ets-1 et Fli-1.

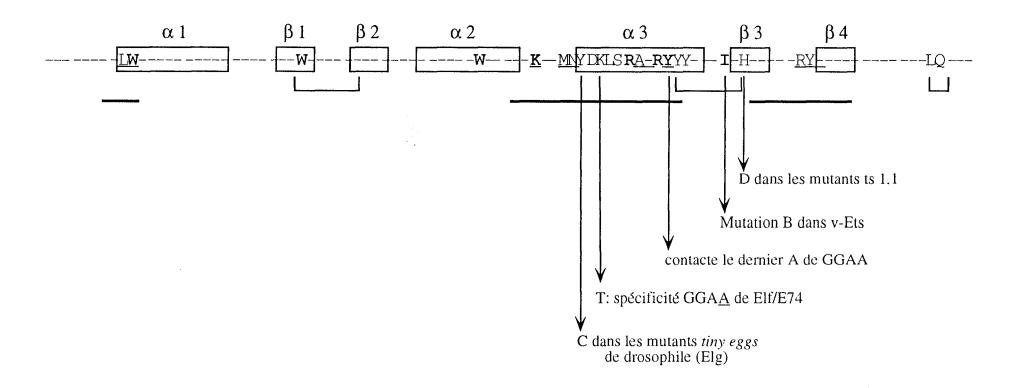
6.2. Structures 2D et 3D

Ces études montrent que le domaine ETS n'est pas similaire au domaine de Myb, comme ceci avait été prédit mais plutôt à celui des protéines, capables de se fixer à l'ADN, classées dans la famille des protéines "winged-HTH" (Donaldson *et al.*, 1994; Liang *et al.*, 1994a). Shore *et al.* (1995) ont récemment montré, par des

expériences de RMN sur le domaine ETS de Elk-1, qu'il est composé d'un mélange d'hélices α et de feuillets β . Plus exactement, le domaine ETS de Ets-1 et Fli-1 consiste en trois hélices α, formant un noyau hydrophobe, qui s'appuie sur l'"échafaudage" formé par les quatre brins d'un petit feuillet β antiparallèle (Figure 23). La troisième hélice contient des résidus polaires et chargés sur un côté, ce qui lui permet d'interagir avec l'ADN comme hélice de reconnaissance au niveau des bases du grand sillon. Les régions flanquant cette hélice, c'est à dire la "boucle" qui précède l'hélice α, d'une part et, d'autre part, les troisième et quatrième brins du feuillet β ainsi que la boucle connectant ces deux brins d'autre part, contactent l'ADN au niveau du petit sillon. La deuxième hélice (α2) stabiliserait alors l'interaction de l'hélice α3 avec l'ADN en instaurant des contacts phosphates (Figure 24). Ces données confirment les interprétations des expériences d'interférence de méthylation et de mutagenèse réalisées auparavant (Nye et al., 1992 ; Wang et al., 1992 ; Bosselut et al., 1993 ; Mavrothalassitis et al., 1994). Entre autres, le changement de la lysine "K54", située dans la région CRIII du domaine, c'est à dire dans la troisième hélice, en une thréonine (T) est responsable de la différence de spécificité de liaison entre les protéines Elf-1 et E74 par rapport aux autres protéines de la même famille (GGAA-> GGAT) (Bosselut et al., 1993). De même, la plupart des mutations ponctuelles (réalisées par Mavrothalassitis et al., 1994) qui abolissent pratiquement complètement la fixation à l'ADN d'un peptide Ets-1, se localisent soit dans la région HTH (aussi bien dans les hélices que dans la boucle qui les sépare), soit dans les brins du feuillet β .

A priori, rien ne pouvait laisser présager l'appartenance des protéines Fli-1 et Ets-1 à la famille des protéines "wHTH". En effet, on ne relève que très peu d'homologie de séquence entre le domaine ETS de Fli-1 et le domaine de liaison à l'ADN de la protéine CAP (Catabolite gene activator protein) d'E.coli (Schultz et al., 1991) (20% sur 80 résidus alignés). Les sites de fixation sur l'ADN sont différents avec les protéines appartenant à la famille "wHTH" qu'elles soient procaryotes ou eucaryotes. Il s'agit notamment de l'histone H₅ (Ramakrishnan et al., 1993), de la protéine HNF3 (Hepatocyte nuclear factor) (Clark et al., 1993), du facteur de transcription "Heat Shock"(HSF) (Harrisson et al., 1994; Vuister et al., 1994), et de la protéine d'E.coli bir R (biotin repressor) (Wilson et al., 1992). Le domaine ETS se fixe sur sa séquence cible en monomère alors que d'autres protéines de la famille wHTH se fixent en dimère.

Les deux études indépendantes de la structure du domaine ETS ont pourtant apporté les critères qui permettent de mettre en évidence la ressemblance de ces protéines entre-elles : (i) les trois hélices s'appuyant sur le feuillet β , (ii) les contacts



sur l'ADN avec, notamment, le rôle des deuxième et troisième hélices et des régions du feuillet β , (iii) les résidus hydrophobes enfouis dans le noyau hydrophobe formé par les hélices. D'autres critères regroupent également ces protéines dans la même famille : il s'agit des structures tertiaires similaires (Brennan *et al.*, 1993; Burley *et al.*, 1994) ou encore des différences par rapport aux autres HTH tels que les domaines *homéo* par exemple.

Cependant, les auteurs ont remarqué quelques différences. (i) Le "coude serré" du motif HTH de CAP est allongé en une boucle pour les domaines ETS de Fli-1, comme c'est le cas pour les autres protéines eucaryotes de la famille wHTH. (ii) L'hélice α3 de la protéine HNF3 est bordée de deux boucles qui interagissent avec l'ADN, en plus de l'hélice de reconnaissance. Mais Liang et al. (1994a) pensent que, comme les résidus qui suivent le dernier brin du feuillet β peuvent être délétés sans abolir la fixation à l'ADN (Jancknecht et Nordheim, 1992), le domaine ETS de Fli-1 ne semble pas avoir la deuxième boucle similaire à celle de HNF3. On peut cependant noter que, en ce qui concerne Ets-1, les 25 derniers acides aminés localisés en carboxy-terminal par rapport au domaine ETS forment une quatrième hélice α et semblent être essentiels pour la solubilité du peptide produit, d'où leur importance dans l'établissement de la structure (Donaldson et al., 1994). (iii) De plus, suite à des expériences de mutagenèse, Liang et al. (1994b) concluent que Fli-1 utilise plutôt le milieu de la troisième hélice pour interagir avec l'ADN alors que les autres protéines HTH utilisent la partie amino-terminale de la troisième hélice.

En conclusion, la structure du domaine ETS permet de classer les protéines de la famille Ets dans la superfamille des protéines à domaine de liaison "Winged Helix-Turn-Helix", mais présente une nouvelle variation par laquelle le motif habituel est sans doute quelque peu différent afin de faciliter la liaison à l'ADN de ces protéines à l'état de monomère.

3ème Partie: la famille Ets : des facteurs de transcription

1. La fonction de facteur de transcription

Après la découverte du domaine de liaison à l'ADN des protéines de la famille Ets, les tests de capacité de transactivation vis-à-vis d'éléments de réponse artificiels (motifs d'ADN multimérisés) ou de promoteurs naturels contenant le motif reconnu ont classé les protéines Ets dans la superfamille des facteurs de transcription (Ets-1 et Ets-2 : Bosselut et al., 1990 ; Wasylyk et al., 1990 ; Seneca et al., 1991 ; Gégonne et al., 1992 ; Lim et al., 1992 ; Erg : Reddy et Rao, 1990 ; PEA3 : Xin et al., 1992 ; Elk: Rao et Reddy, 1992a ; Pu-1 : Klemsz et al., 1990). Les domaines responsables de cette propriété, qui ont été cernés grâce à l'étude de mutants de délétion, sont relativement peu conservés dans les différents membres de la famille, ce qui suggère qu'ils n'empruntent pas tous le même mécanisme pour réguler la transcription de leurs gènes cibles.

1.1. Domaines transactivateurs (TA)

Le domaine de transactivation de Spi-1/Pu-1 se localise dans sa partie aminoterminale et semble être de type "riche en résidus glutamine" (Figure 25). Ce type de domaine est responsable de l'interaction directe de certains facteurs de transcription (exemple: Sp1) avec le complexe de transcription général TFIID. Ainsi, le contact entre le domaine TA de Spi-1/ Pu-1 et le complexe TFIID a été démontré (Hagemeier *et al.*, 1993).

La protéine Elk-1, quant à elle, possède deux domaines transactivateurs localisés respectivement derrière le domaine ETS, qui se trouve à l'extrémité amino-terminale, et en position carboxy-terminale. Ils comportent tous les deux une proportion importante de résidus sérine et proline. Il semble que les deux domaines ne fonctionnent pas en même temps, selon la présence ou non du cofacteur SRF et selon la séquence-cible. Une telle composition est également observée dans la protéine Sap-1 qui présente certaines homologies avec Elk-1 mais dont le domaine TA s'étend sur presque toute la protéine mis à part le domaine ETS et une courte région adjacente (Bhattacharya et al., 1993).

Les protéines Erg et Fli-1 possèdent également deux domaines TA à forte concentration en sérine ou proline/sérine ou proline/glutamine/sérine selon les régions. Ils sont localisés au milieu et à l'extrémité carboxy-terminale des protéines (Rao et al., 1993 ; Siddique et al., 1993).

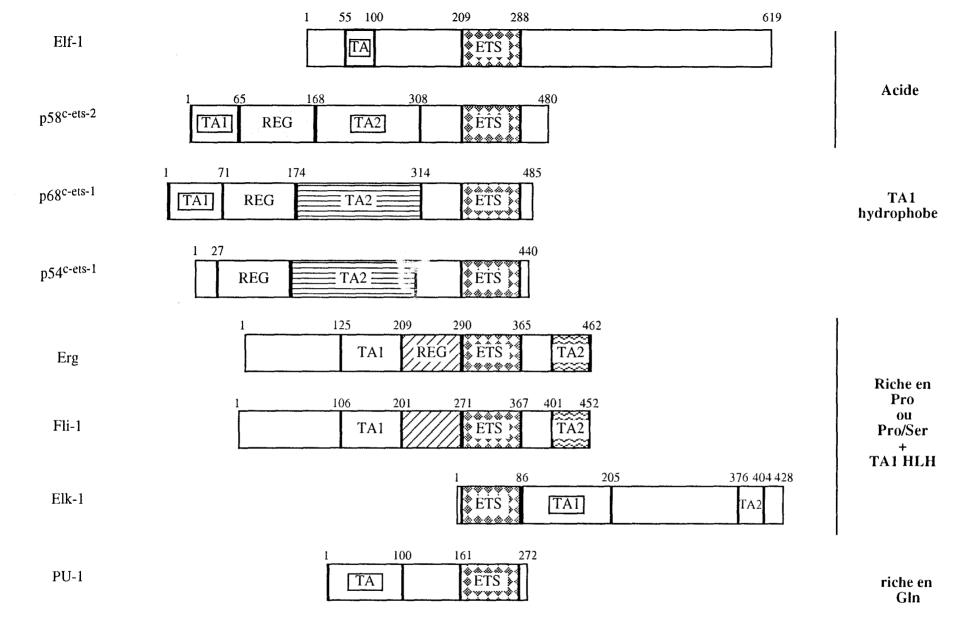


Figure 25 : Domaines transactivateurs (TA) de quelques protéines de la famille Ets Les figurés identiques représentent des homologies de séquences

Une faible homologie, et surtout la structure en hélice-boucle-hélice (ou HLH: Helix-Loop-Helix) du domaine TA1 de Erg et Fli-1 sont retrouvées dans la protéine GABPα et au niveau de la zone qui a été nommée Reg (régulatrice) dans les protéines Ets-1 et Ets-2. Cette région, située au milieu des deux domaines transactivateurs, est capable de moduler positivement les propriétés de transactivation du domaine TA2 des protéines p68°c-ets-1, p54°c-ets-1 et p58°c-ets-2 et d'inhiber celles du domaine TA1 des protéines p58°c-ets-2 et p68°c-ets-1 (Schneikert et al., 1992). Ainsi, cette région est dotée de propriétés transactivatrices dans les protéines Erg et Fli-1 alors qu'elle a des fonctions de régulation dans les protéines Ets-1 et Ets-2. Cependant, il est connu que le type de structure HLH retrouvé ici, soit responsable d'interactions intra- et inter-moléculaires dans de nombreux facteurs de transcription, que ce soit au niveau de domaines TA proprement-dits ou de domaines régulateurs. La frontière entre ces deux types de domaines n'est pas très bien délimitée.

Les protéines p68c-ets-1 et p54c-ets-1 possèdent le domaine TA2 en commun, ainsi que la séquence localisée juste en amont du domaine ETS et qui présente une faible activité transactivatrice (Wasylyk *et al.*, 1992), mais diffèrent cependant dans leurs extrémités amino-terminales puisque les exons α et β ou I⁵⁴ codent respectivement le début de chacune des protéines. La protéine p54c-ets-1 ne porte donc qu'un domaine transactivateur (TA2) alors que la p68c-ets-1 contient, en plus, le domaine TA1 codé par les exons α et β .

1.2. un modèle d'évolution basé sur la conservation de la séquence BEC

L'organisation structurale et fonctionnelle de la p $58^{c-ets-2}$ ressemble à celle de la p $68^{c-ets-1}$:

- p68c-ets-1 et p58c-ets-2 portent deux régions transactivatrices localisées de la même façon dans les deux protéines (amino-terminale et centrale) (Figure 26), alors que la p54c-ets-1 n'en possède qu'un (Gégonne *et al.*, 1992). D'ailleurs, p68c-ets-1 et p58c-ets-2 ont un effet transactivateur plus important que la p54c-ets-1 sur certains éléments de réponse (Wasylyk *et al.*, 1991; Wu *et al.*, 1994), mais pas sur tous (Coffer *et al.*, 1994). De plus, bien que leurs domaines soient différents au point de vue séquence en acides aminés, p68c-ets-1 et p58c-ets-2 peuvent interagir avec le même co-activateur (Schneikert *et al.*, 1992). Les deux domaines de la p58c-ets-2 sont de type acide (Chumakov *et al.*, 1993), tout comme le domaine TA de Elf-1 d'ailleurs (Wang C.Y. et *al.*, 1993), mais sans aucune homologie.
 - Le domaine régulateur (Reg) est homologue en séquence et, par sa

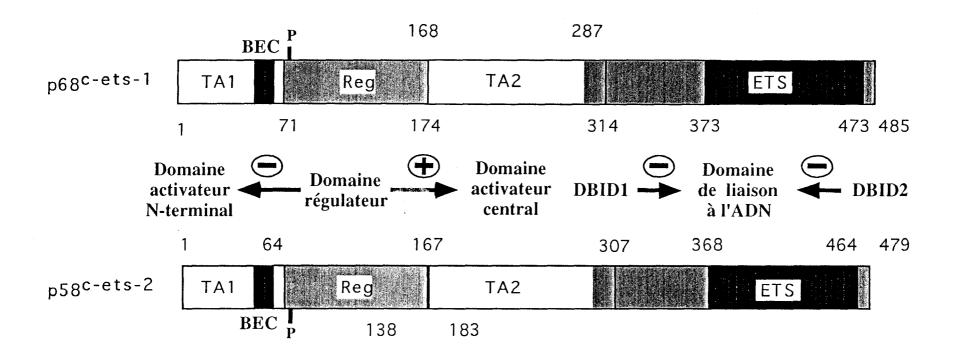


Figure 26: Similitudes fonctionnelles et structurales entre p68c-ets-1 et p58c-ets-2

TA: domaines transactivateurs

DBID: domaines inhibiteurs de la liaison à l'ADN

Reg: domaine de régulation de l'activité des TA

P: site de phosphorylation par les MAP kinases

BEC: "Ets-1-Beta-Ets-2-Conserved domain"

localisation entre les domaines TA1 et TA2, ainsi que par sa fonction régulatrice.

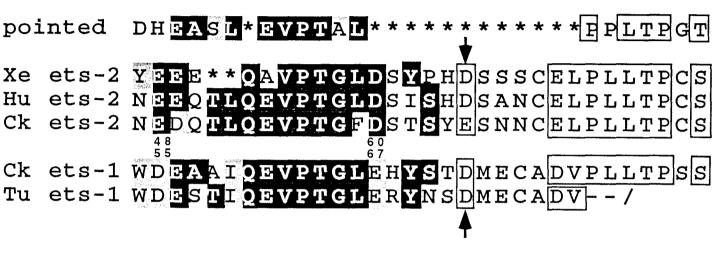
- Leurs domaines TA1 sont tous les deux de nature hydrophobe, contrairement à la partie amino-terminale hydrophile de p54^{c-ets-1}. Leurs séquences sont différentes mis à part la petite séquence BEC (Ets-1-<u>B</u>eta-<u>E</u>ts-2-<u>C</u>onserved domain) de 13 acides aminés (Figure 27A), remarquée à l'origine par sa bonne conservation au sein du domaine codé par l'exon β dans les quelques organismes où il a été identifié (Albagli *et al.*, 1992). La séquence BEC semble être importante d'un point de vue fonctionnel puisque sa délétion supprime l'activité transactivatrice du domaine TA1 dans les deux protéines (Albagli *et al.*, 1994). Curieusement, elle est également retrouvée dans la protéine Pointed de drosophile (Klämbt *et al.*, 1993).

Les protéines p68c-ets-1 et p58c-ets-2 semblent donc être équivalentes au point de vue structural et fonctionnel. Cette redondance pourrait expliquer pourquoi les exons α et β n'ont pas été conservés au cours de l'évolution. On ne les retrouve en effet que jusque chez les reptiles (Figure 27B). C'est sur ces observations que peut être basé le modèle d'évolution des gènes *ets-1* et *ets-2*. (Figure 28) Le gène *pointed* serait un ancêtre commun *c-ets1/2* qui aurait donné *c-ets-1* et *c-ets-2* après un événement de duplication qui aurait eu lieu assez tôt après la séparation des lignées Invertébrés/Vertébrés. Pour le gène *c-ets-1*, il y aurait eu acquisition de l'exon I⁵⁴. Puis, les exons Y, α et β de *c-ets-1* auraient été perdus, ne laissant que l'exon I⁵⁴ chez les mammifères; ceci étant dû au fait que les protéines p58c-ets2 et p68c-ets-1 tiennent le même rôle dans la régulation transcriptionnelle. Il y a alors redondance avec peut-être un petit avantage pour la p58c-ets2 notamment au niveau des séquences régulant sa transcription (Albagli *et al.*, 1994).

Ces résultats sont parus dans la publication: Albagli O., <u>N. Soudant</u>, E. Ferreira, P. Dhordain, F. Dewitte, A. Bègue, A. Flourens, D. Stehelin et D. Leprince. "A model for gene evolution of the Ets-1/Ets-2 transcription factors based on structural and functional homologies". (Oncogene 9, 3259-3271). Ils ne seront pas repris dans la partie "résulats" dans un souci d'homogénéité et de clarté.

Mis à part le cas de Ets-1 et Ets-2, il apparaît donc que les protéines de la famille Ets possèdent des domaines transactivateurs localisés à divers endroits dans chaque molécule, et de natures différentes. Quelle est la signification de cette divergence? Soit les domaines transactivateurs n'ont pas subi les mêmes contraintes sélectives que le domaine ETS, soit la divergence a été "organisée" de façon à obtenir une diversité de fonctions des protéines Ets quant à la

(A)



 \odot

α

Figure 27 : A Définition de BEC: Ets-1-B eta-Ets-2-Conserved domain les flèches indiquent la frontière de l'exon β des protéines Ets-1 de poulet et de tortue, et du $2^{\grave{e}me}$ exon codant des protéines Ets-2 de poulet et d'homme

Xe: xénope; Hu: homme; Ck: poulet; Tu: tortue

(B) Séquences des exons α et β des protéines Ets-1

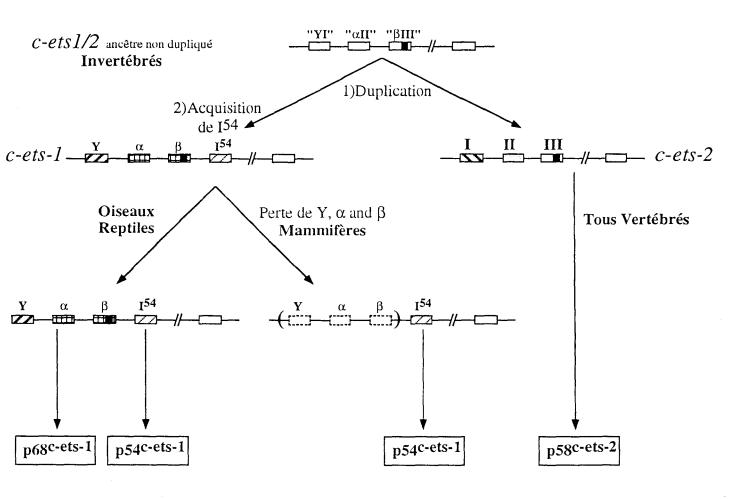


Figure 28 : Modèle d'évolution des gènes ets-1 et ets-2

transactivation; ceci étant possible par les interactions de leurs domaines transactivateurs ou régulateurs, ou encore, d'autres parties des protéines, avec des co-facteurs ou des composants de la "machinerie de transcription" différents. La coopération intermoléculaire est en effet l'un des moyens d'établir la sélectivité de la régulation transcriptionnelle puisque ceci n'est possible, par la reconnaissance de la protéine elle-même pour ses séquences-cibles, que dans quelques cas.

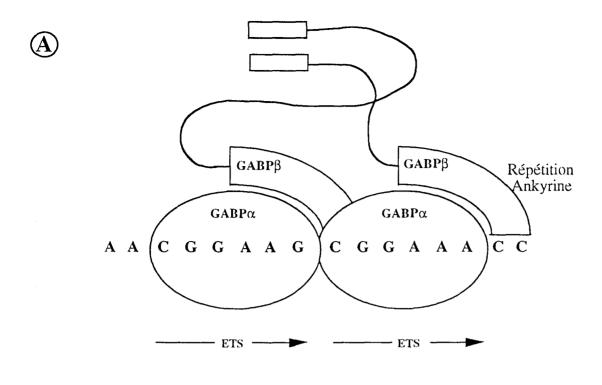
2. Coopération Ets/ autres facteurs

La coopération de plusieurs facteurs de transcription s'exerce souvent par une interaction directe des protéines, ceci régulant d'ailleurs parfois la capacité et la spécificité de fixation à l'ADN de l'un ou l'autre (ou des deux) des éléments. Quelques exemples faisant intervenir les protéines Ets sont présentés ici. Cependant, dans certains cas, le mode de coopération n'est pas connu, même si celle-ci a été démontrée.

2.1. Interaction des protéines de la famille Ets avec leurs partenaires

2.1.1. GABP α / GABP β

Le complexe GABP (pour "GA binding protein") a été isolé sur la base de sa capacité à fixer une séquence régulatrice importante pour l'activation du gène ICP4 (Infected Cells Protein 4) du virus HSV-1 (Herpes Simplex virus type 1): (CGGAAG/A)₂ (La Marco et al., 1991). La caractérisation de GABP a révélé deux sous-unités distinctes : GABPα et GABPβ qui s'associent pour former un tétramère $\alpha_2\beta_2$ (Thompson *et al.*, 1991). La protéine GABP β présente 4 répétitions de 33 acides aminés, dénommées "motifs ankyrine", que l'on retrouve notamment dans l'Ankyrine (Lux et al., 1990) et dans plusieurs protéines transmembranaires telle que Notch de drosophile par exemple (Wharton et al., 1985). La sous-unité GABPa est une protéine de la famille Ets puisqu'elle possède un domaine présentant une homologie avec le domaine ETS des autres protéines Ets (Thompson et al., 1991). C'est d'ailleurs grâce à lui que le complexe se fixe à la séquence d'ADN spécifiquement (Figure 29). En effet, GABP α est capable de se fixer à l'ADN lorsqu'elle est seule, mais avec une faible affinité. GABPB, par contre, n'est pas capable de s'y lier et il faut que le complexe α/β soit formé pour observer une bonne fixation à la séquence de l'"enhancer" de ICP4. L'augmentation de capacité de fixation du complexe par GABPβ n'est pas obtenue lorsque GABPα est remplacée par des protéines Ets qui présentent une forte homologie telles que ER71 ou ER81,



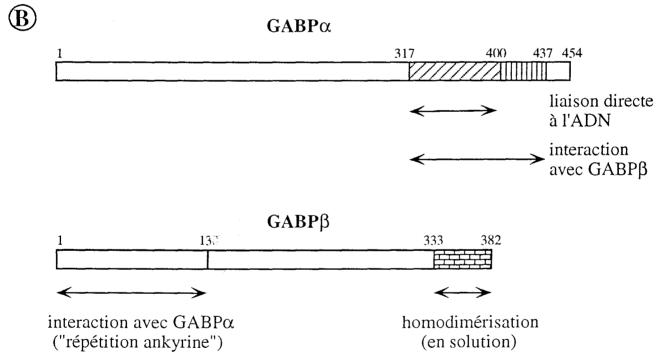


Figure 29 : \bigcirc Le complexe GABP α 2 β 2

f B Les domaines fonctionnels des sous-unités f GABPlpha et f GABPeta

démontrant ainsi la grande spécificité de GABP α pour l'action du complexe GABP. Si le domaine ETS est suffisant pour la fixation à l'ADN, il ne l'est pourtant pas pour l'interaction avec GABP β et requiert la présence des 37 acides aminés situés en aval. Du côté de GABP β , ce sont les quatre "motifs ankyrine", localisés en position amino-terminale, qui sont nécessaires à l'interaction avec GABP α . Il semble que les deux molécules de GABP β forment d'abord un dimère en solution grâce à leurs extrémités carboxy-terminales et que le dimère capture ensuite deux molécules GABP α . Une fois le complexe GABP α 2 β 2 lié à la séquence spécifique, il semble que le rôle d'activateur de la transcription soit porté par la composante β (Brown et McKnight, 1992).

Récemment, GABP a également été impliqué dans la régulation de la transcription du gène de l'apolipoprotéine A-II humaine. Un effet négatif passe par la fixation de deux autres protéines (A-IID1 ou/et A-IID4) sur l'élément D du promoteur. La réversion de cet effet négatif est obtenue par l'occupation du même élément (sites pour A-IID2 et A-IID4 adjacents; site pour A-IID1 recouvrant les deux précédents) par A-IID2/GABP (Cardot et al., 1994).

2.1.2. Pu-1/NF-EM5 ; Pu-1/Rb ; Pu-1/TFIID ; Pu-1/facteurs de la famille HLH

Le facteur NF-EM5, spécifique des cellules B, est incapable de se fixer sur l'"enhancer" 3' du gène de la chaîne K des immunoglobulines (IgK3') mais le devient lorsqu'il est recruté par le facteur Pu-1, spécifique des cellules B et des macrophages (Klemsz et al., 1990). Les sites de fixation sont adjacents et l'interaction entre les deux protéines semble être nécessaire à leur coopération pour l'activation de la transcription dans ce cas. Du côté de Pu-1, l'interaction ne passe pas par une séquence qui présente une structure HLH comme c'est souvent le cas dans les interactions protéine-protéine, mais passe par la séquence PEST de la protéine, riche en résidus proline (P), acide glutamique (E), sérine (S) et thréonine (T). Ce type de séquence serait impliquée dans la dégradation de certaines protéines qui la contiennent (Rogers et al., 1986). Les auteurs proposent que l'interaction protéineprotéine via cette séquence pourrait non seulement assister la fixation à l'ADN, mais aussi protéger la protéine Pu-1 de la dégradation en masquant la région PEST de l'action des protéases cellulaires (Pongubala et al., 1992). En plus de l'interaction protéine-protéine, un niveau supplémentaire de régulation réside en la phosphorylation d'une sérine localisée dans la séquence PEST. Lorsqu'elle n'est pas phosphorylée, l'interaction entre Pu-1 et NF-EM5 est impossible (Pongubala et al., 1993).

L'interaction de Pu-1 avec la protéine Rb (<u>rétinob</u>lastoma tumor suppressor) ou le facteur TFIID de la machinerie générale de la transcription, passe par une autre région. C'est en effet au niveau du domaine transactivateur (amino-terminal) de Pu-1 que la séquence "pocket" de Rb ou celle qui lui est homologue dans TFIID viennent s'accrocher. Ces deux protéines se fixant sur la même séquence de Pu-1, on peut imaginer que Rb fixe et régule les facteurs de transcription, tels que Pu-1, qui contactent et régulent à leur tour les éléments du complexe de pré-initiation nécessaires au recrutement de l'ARN polymérase II (Hagemeier *et al.*, 1993).

Il semblerait que le facteur Pu-1, les facteurs TFE3 et USF de la famille des facteurs HLH, et les séquences "purine tract" et MyE de l'élément MRR (<u>M</u>yéloïd <u>R</u>estricted <u>R</u>egion) du promoteur du gène du récepteur Fc pour les IgG (FcγRIIIA) forment un complexe ternaire responsable en partie de l'activité spécifique de ce récepteur dans les cellules myéloïdes (Feinman *et al.*, 1994).

2.1.3. Elf-1/Rb; Elf-1/HMG-I(Y)

Un site de liaison à la protéine Rb a été découvert dans le facteur de transcription Elf-1, chevauchant le domaine de transactivation (amino-terminal). Il est connu que Elf-1 régule l'expression de certains gènes inductibles pendant l'activation des cellules T, alors que Ets-1 en est incapable, cependant, le mécanisme permettant ceci n'est pas déterminé (Thompson et al., 1992). Or, d'une part, l'interaction entre Elf-1 et Rb n'est possible que lorsque la protéine Rb n'est pas phosphorylée, et d'autre part, l'état de phosphorylation de Rb varie en fonction du cycle cellulaire. Wang C.Y. et al. (1993) proposent donc un mécanisme de "séquestration" ou d'inactivation de Elf-1 par Rb pendant la phase de quiescence des cellules T puisqu'on sait que Rb devient hyperphosphorylée quand les cellules T sont activées (Elf-1 se "décroche") et puisque la sur-expression de Rb dans une forme non phosphorylée inhibe l'activation de la transcription dépendante de Elf-1 dans les cellules T (sur GM-CSF et HIV2). Rb, en se fixant à Elf-1, empêcherait la fixation de Elf-1 à sa séquence-cible ou/et inhiberait sa capacité de transactivation.

Le gène de la chaîne α du récepteur de l'interleukine 2 (IL-2Rα) est rapidement induit dans les cellules T en réponse aux stimuli mitogéniques. Deux éléments de régulation positive, PRR I et PRR II, sont requis à ce sujet. L'un d'entre eux contient un site pour Elf-1 et des sites pour le facteur de transcription HMG-I(Y). Ils sont tous nécessaires pour obtenir une activité maximale du promoteur, ce qui suggère que Elf-1 et HMG-I(Y) coopèrent. Or leur interaction a été montrée *in vitro*, en solution, et passe par le domaine ETS de Elf-1. On peut facilement imaginer alors, que l'interaction Elf-1/HMG-I(Y) favorise la coopération de ces deux

facteurs pour la régulation de la transcription de IL-2Rα. Elf-1 est aussi capable, d'ailleurs, d'interagir avec les protéines NF-KB et c-Rel *in vitro*, sachant que NF-KB régule aussi la transactivation de IL-2Rα. C'est à partir de ces données que John *et al.* (1995) ont proposé un modèle de régulation du promoteur IL-2Rα avant et après stimulation mitogénique sur les cellules T (Figure 30).

2.1.4. TCF: Elk ou Sap/ SRF/ SRE

La protéine Elk-1 possède une double spécificité de liaison à l'ADN. Elle peut interagir de façon autonome avec certaines séquences EBS telle que E74 par exemple (Reddy et Rao, 1992) ou alors, elle se fixe sur un motif de type EBS au niveau du SRE (Sérum Response Element), mais nécessite pour cela la fixation préalable d'une autre protéine, le facteur SRF (Sérum Response Factor) sur une séquence "CArG" adjacente au noyau GGAT, l'ensemble des nucléotides concernés définissant le SRE (Figure 21A). Cet élément a été mis en évidence dans le promoteur du proto-oncogène c-fos parce qu'il représente l'une des séquences responsables de l'induction rapide de l'expression de c-fos en réponse aux facteurs de croissance du sérum et autres agents, dans des cultures cellulaires (Curran et Franza, 1988; Shaw et al., 1989; Hipskind et al., 1991; Treisman et al., 1992). Egalement, la protéine Sap-1 a été isolée par clonage des partenaires qui interagissent avec le SRF, alors que Elk-1 avait été mise en évidence à la suite du test de fixation de plusieurs protéines Ets sur le site (Dalton et Treisman, 1992). Elk-1 et Sap-1 présentent 3 régions de forte homologie: les domaines A, B et C (Figures 21 et 22). Les domaines A (domaine ETS) et B contribuent à la formation du complexe ternaire, notamment le domaine A pour l'interaction avec l'ADN et le domaine B pour le contact protéine-protéine avec le SRF, même sans liaison à l'ADN. Néanmoins, cette région B semble empêcher la liaison autonome de Elk-1, sûrement en masquant le domaine ETS, sur le SRE de c-fos (Janknecht et Nordheim, 1992; Rao et Reddy, 1992; Treisman et al., 1992; Janknecht et al., 1994; Shore et Sharrocks, 1994). La région C correspond au domaine d'activation de la transcription qui fonctionne in vivo par les éléments EBS et SRE (Bhattacharya et al., 1993; Hill et al., 1993; Marais et al., 1993). Cependant, l'induction du gène c-fos ne semble pas être régulée uniquement par la formation du complexe ternaire Elk-1/ SRF/ SRE, mais également par un mécanisme de phosphorylation de Elk-1 par les MAP (microtubule-associated protein) kinases (Bhattacharya et al., 1993; Janknecht et al., 1993; Marais et al., 1993), et par une fonction inter-dépendante de tous les éléments régulateurs du promoteur (séquences SIE, FAP, SRE, Ca/CRE) (souris transgéniques "fos-lacZ": Robertson et al., 1995).

Cellules T activées

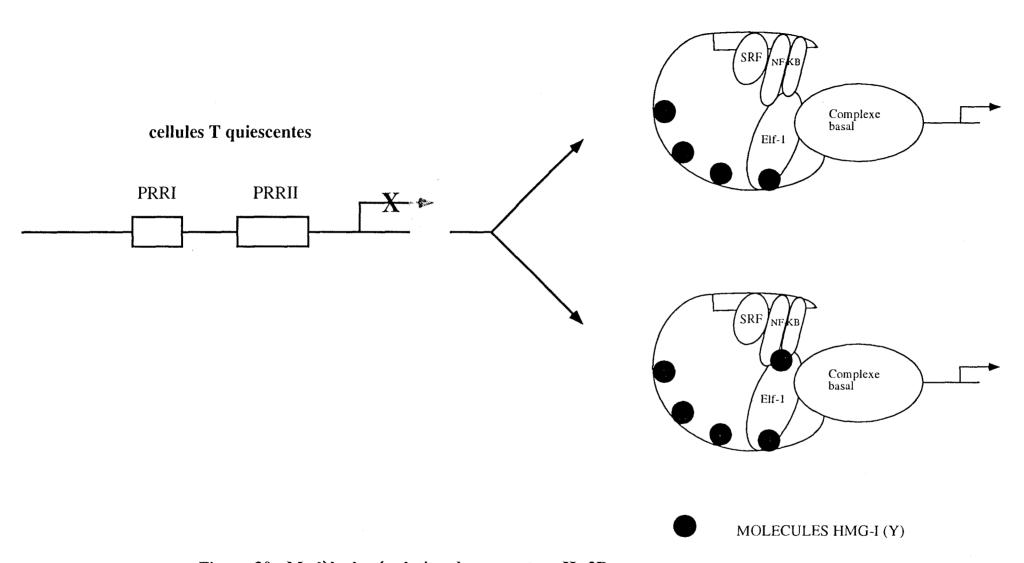


Figure 30 : Modèle de régulation du promoteur IL-2Rα avant et après stimulation mitogénique des cellules T, décrivant des interactions directes entre Elf-1 / NFkB / HMG-I(Y)

2.1.5. Ets-1/ CBF

Un autre exemple suggère l'interaction de Ets-1 avec le CBF (Core binding factor) qui augmenterait l'affinité des interactions Ets-1/ADN et diminuerait la vitesse de dissociation de CBF à l'ADN, ceci sur la séquence activatrice du gène du récepteur β des cellules T humaines. Les sites de liaison pour ces protéines sont présents dans plusieurs séquences activatrices de gènes dont l'expression est spécifique des cellules T, suggérant que cette interaction est importante pour la transcription spécifique des cellules T (Wotton $et\ al.$, 1994).

2.1.6. Le complexe multi-protéique Ets-1/ PEBP2α/ ATF/ LEF-1

De même que dans le cas précédent impliquant les protéines Ets-1 et CBF, il se peut que les protéines Ets-1 et PEBP2α coopèrent pour la liaison à l'ADN sur des sites adjacents, localisés dans l'"enhancer" du gène de recepteur α des cellules T $(TCR\alpha)$, en établissant des contacts protéine-protéine entre elles (Giese et al., 1995). Cependant, le complexe ternaire PEBP2α-Ets-1-ADN possède une demi-vie très courte. Il semble être stabilisé par interaction avec d'autres protéines tel que le complexe ATF/CREB par exemple. Les sites de liaison pour Ets et ATF/CREB n'étant pas adjacents sur la portion d'ADN considérée, il semble que la liaison de la protéine LEF-1 sur l'ADN favorise ces interactions. En effet, la protéine LEF-1, spécifique des lymphocytes pré-B et T, et qui appartient à la famille des protéines à domaine HMG, induit la formation d'un coude dans l'hélice d'ADN, en se fixant sur son site spécifique situé entre le site ATF/CREB d'une part et les sites Ets et PEBP d'autre part, facilitant ainsi les interactions protéine-protéine ATF/Ets-1. Des changements dans la disposition ou l'espacement entre les divers sites impliqués pour la fixation de protéines spécifique (Ets-1) et non-spécifique (ATF/CREB) des cellules T, affectent l'activité spécifique de l'"enhancer" du gène $TCR\alpha$. En fait, LEF-1 sert de "coordinateur" dans l'assemblage d'un complexe protéique "ordonné", spécifique et stable sur l'"enhancer" de $TCR\alpha$.

2.2. Coopération sans interaction démontrée

Voici quelques exemples de coopération des protéines de la famille Ets avec d'autres facteurs pour lesquels l'interaction moléculaire n'a pas été démontrée.

2.2.1. Lyf-1/ Ets-1 ou Fli-1

L'activité de l'élément D du promoteur du gène TdT (Terminal

<u>d</u>eoxynucleotidyl-<u>T</u>ransferase) est requise pour son expression dans les étapes précoces de l'ontogénie des cellules B et T. Cet élément comporte deux séquences voisines qui peuvent être fixées par les protéines Lyf-1 d'une part, et Ets-1 et Fli-1 d'autre part. La coopération des deux protéines est envisageable dans ce mécanisme de régulation (Ernst *et al.*, 1993).

2.2.2. E12/ Erg ou Fli-1

Le site de fixation π est crucial pour l'activation du gène de la chaîne lourde d'immunoglobuline. Les protéines Fli-1, Pu-1 et l'isoforme Erg-3 sont capables de s'y fixer. Cependant, seules Erg-3 et Fli-1 agissent en synergie avec le facteur E12 de la famille des protéines HLH sur une construction contenant une multimérisation de sites de liaison. L'interaction entre les protéines Ets et le domaine HLH de E12, qui a déjà été montrée dans d'autres exemples, n'a jusqu'à présent pas été prouvée pour ce cas (Rivera et al., 1993).

2.2.3. Ets-1/ autres partenaires

La protéine p54^{c-ets-1} coopère avec Sp1 dans la transactivation et la liaison à la région ERR1 (<u>E</u>ts <u>responsive region 1</u>) du LTR du virus HTLV1 (<u>H</u>uman <u>T</u> <u>L</u>ymphotropic <u>v</u>irus) (Gégonne *et al.*, 1993) et dans la transactivation sur le promoteur du gène *PTHrP* (<u>Parathyroïd hormone-related protein</u>) (Dittmer *et al.*, 1994), ainsi qu'avec la protéine GATA-1 pour l'expression tissu-spécifique de la glycoprotéine mégacaryocytaire GPIIB (Lemarchandel *et al.*, 1993).

2.2.4. Ets-1/ Ap-1

La co-expression de protéines de la famille Ets d'une part, et des familles Fos et Jun formant des complexes Ap-1 d'autre part, aboutit à une stimulation synergique d'un certain nombre de gènes-cibles notamment, pour la plupart des exemples déjà étudiés, suite à l'action de facteurs mitogéniques tels que certains oncogènes, facteurs de croissance du sérum ou agents chimiques comme le TPA:

- enhancer des gènes précoces du virus de polyome: Wasylyk *et al.,* 1989; 1990; Nothias *et al.,* 1993
 - promoteur du gène de la collagénase: Gutman et Wazylyk, 1990 ; 1991
 - promoteur de l'urokinase: Rorth et al., 1990 ; Nerlov et al., 1992
 - retrotransposon NVL3 murin : Reddy et al ; 1992
 - gène du récepteur "scavenger" des macrophages : Wu et al., 1994
 - kératine 18 (K18) : Pankov *et al.*, 1994.

Dans ce dernier cas, les auteurs présentent un modèle de régulation de

l'expression de K18, suite à l'induction de la différenciation de cellules embryonnaires par l'acide rétinoïque, faisant intervenir (i) l'augmentation de la quantité de transcrits et de l'activité des protéines issues des gènes *ets-2*, *c-jun* et *jun-B* qui régulent positivement, (ii) et l'activité de protéines "silencers" (encore inconnues) qui régulent négativement la transcription de K18. C'est la combinaison des deux effets qui module l'induction de K18 (Pankov *et al.*, 1994).

Certains auteurs ont montré l'importance de deux paramètres: l'espacement et l'orientation des sites impliqués dans la fixation de ces facteurs sur les éléments de réponse nommés ORE (<u>O</u>ncogene <u>response element</u>) ou RRE (<u>ras responsive element</u>) (Galang et al., 1994 ; Gutman et Wasylyk, 1991). L'oncogène ras apparaît en effet, être au centre d'une cascade d'événements qui aboutissent souvent à la coopération entre facteurs de transcription, tels que Ets et Ap-1, pour la régulation de la transcription en réponse à des stimuli mitogéniques externes (Bruder et al., 1992 ; Langer et al., 1992 ; Galang et al., 1994 ; Wasylyk et al., 1994). C'est la voie de transduction Ras/Raf que nous décrivons plus loin.

C'est dans un schéma identique qu'interviennent les protéines c-Ets-1 et GHF-1/Pit-1 vis-à-vis d'éléments Ets et GHF, localisés sur le promoteur du gène de la prolactine (*PRL*), requis pour l'augmentation de l'activation de ce promoteur par l'oncogène *ras* et *via* la voie Raf/MAP Kinase. Cet événement a été spécifiquement montré dans les cellules pituitaires de rat GH4. Même si l'interaction directe de ces deux protéines n'a pu être mise en évidence, il semble que la formation d'un complexe ternaire entre l'ADN d'une part, le facteur de transcription GHF-1/Pit-1 spécifique des cellules pituitaires et le produit c-Ets-1 exprimé dans de nombreuses cellules d'autre part, soit à l'origine d'un important mécanisme par lequel la cascade de transduction générale "Ras" peut être modifiée de manière cellule-spécifique. Le domaine de c-Ets-1 requis pour l'augmentation de l'activation du promoteur *PRL* médiée par Ras ou Ras-plus-GHF-1 correspond à un segment d'une quarantaine d'acides aminés dans la région amino-terminale de la protéine (résidus 57 à 98 de la protéine p68c-ets-1) (Bradford *et al.*, 1995).

D'autres exemples vont venir allonger cette liste dans les années à venir car c'est par là que passe la compréhension de la régulation de la transcription des gènes. Jusqu'à présent, nous avons développé la coopération de facteurs à un moment donné, dans une cellule donnée. Mais il ne faut pas oublier que la spécificité d'expression dépend également du tissu considéré et de l'aspect temporel.

2.3. Régulation du même gène par Ets et d'autres facteurs, pour la spécificité d'expression

L'effet positif de certaines protéines de la famille Ets (Ets-1, Ets-2, Pu-1; mais pas PEA3) s'oppose à l'effet négatif de la protéine c-Myb sur l'induction de l'expression du gène *c-fms* (récepteur du facteur CSF-1). Les auteurs proposent le rôle des facteurs Ets dans l'expression "tissu-restrictive" de *c-fms* et le rôle de c-Myb dans la régulation temporelle de l'expression de *c-fms* pendant la différenciation myéloïde (Reddy *et al.*, 1994).

Les facteurs Ets-1 et Ets-2 d'une part, et E2F1 d'autre part, régulent indépendamment l'expression du gène *myc*, à travers le même site de fixation mais à des moments différents, à la suite de la stimulation mitogénique par des facteurs de croissance tel que le CSF-1 (Roussel *et al.*, 1994).

3. Autres modes de régulation de l'activité des protéines Ets

Mis à part les coopérations des protéines Ets avec d'autres facteurs de transcription, toute une variété de modulateurs de croissance affectent l'activité des protéines Ets. Ces modulateurs de croissance sont, par exemple, des facteurs de croissance, les oncoprotéines non-nucléaires appartenant à la cascade de transduction des signaux mitogénique, les activateurs de phosphorylation, des agents cellulaires (exemple: le calcium) ou chimiques. Ils interviennent à différents niveaux incluant la transcription des gènes *Ets*, les modifications post-traductionnelles ou encore la stabilité des protéines.

3.1. Les protéines Ets

La régulation de la transcription des gènes *Ets* passe notamment par leur **promoteur**. Les promoteurs des gènes *ets-1* et *ets-2* de différentes espèces ont été clonés et des sites de liaison pour certains facteurs de transcription ont été identifiés (Mavrothalassitis *et al.*, 1990a, 1990b ; Jorcyk *et al.*, 1991 ; Mavrothalassitis et Papas, 1991 ; Oka *et al.*, 1991 ; Chen J.H *et al.*, 1993a ; 1993b ; Majerus *et al.*, 1992 ; Crépieux *et al.*, 1993). Des combinaisons de sites AP-1 et PEA3, semblables à celles qui ont été trouvées dans d'autres promoteurs, comme nous l'avons décrit auparavant, sont présentes dans ces promoteurs, suggérant qu'ils sont également régulés par les signaux mitogéniques. Le gène *ets-1* humain est positivement auto-régulé (Seth et Papas, 1990 ; Majerus *et al.*, 1992), tout comme la p68c-ets-1 de poulet régule sa

propre expression. Les protéines de poulet p68^{c-ets-1} et p54^{c-ets-1} ne sont pas issues de l'expression à partir d'un seul site d'initiation régulé par un seul promoteur, mais présentent, au contraire, chacune le leur (Crépieux *et al.*, 1993) (Figure 2).

La régulation au niveau de ces différents promoteurs permet une expression tissulaire spécifique, également sous la dépendance du degré de différenciation des cellules, notamment pendant le développement de l'organisme, et du cycle cellulaire puisque la quantité des transcrits Ets-1 et Ets-2 varie selon l'état des cellules T par exemple.

Une fois qu'elles ont été transportées vers le noyau grâce, pour les protéines Ets-1, à la séquence peptidique GKRKNKP (Boulukos et al., 1989 ; Pognonec et al., 1989 ; Leprince et al., 1990), la stabilité des protéines Ets représente un autre niveau de régulation. Notamment, la demi-vie de la protéine Ets-2 est de 20 minutes mais peut être augmentée à 140 minutes lorsque la protéine kinase C est activée par le TPA (Fujiwara et al., 1988b). Ceci n'est pas observé pour Ets-1 pour laquelle la durée de vie n'excède pas 45 à 90 minutes (Pognonec et al., 1988; Koizumi et al., 1990). La séquence de type PEST, présente dans une grande partie des protéines de la famille, pourrait être à l'origine de cette rapide dégradation, comme cela a été montré dans d'autres protéines (Rogers et al., 1986). Cependant, la protéine Erg, qui possède également une séquence PEST, a une durée de vie élevée de 21 heures (Murakami et al., 1993). Dans ce cas, est-ce que la protection par interaction moléculaire, comme cela a été imaginé pour la protéine Pu-1 (Pongubala et al., 1992), ou la phosphorylation peuvent empêcher la dégradation? Cela reste à définir.

Les mécanismes d'épissage alternatif ou l'utilisation de signaux de polyadénylation divers (par Ets-2 : Watson et al., 1988b) génèrent, à partir d'un seul gène, de multiples protéines douées de propriétés biologiques qui peuvent être distinctes. Certains des cas cités ci-dessous ont déjà été traités dans la partie "modification de la liaison à l'ADN". Les épissages des exons IV ou/et VII des protéines Ets-1 humaine et murine (Reddy et Rao, 1988 ; Koisumi et al., 1990 ; Jorcyk et al., 1991 ; Wasylyk et al., 1992) engendrent des modifications de capacité de liaison à l'ADN, soit en supprimant les signaux majeurs de phosphorylation de la protéine (Pognonec et al., 1990), soit en éliminant l'un des domaines responsables de la répression intra-moléculaire de la fixation à l'ADN (Wasylyk et al., 1992).

L'épissage de l'ARNm de la protéine Elk-1 aboutit à la création d'une protéine Δ Elk-1, dépourvue du domaine responsable de l'interaction avec le SRF, et capable de reconnaître le motif SRE du promoteur de *c-fos* en absence du SRF,

contrairement à Elk-1. On peut imaginer son effet répresseur sur l'expression de *c- fos* par compétition pour la fixation au SRE (Rao et Reddy., 1993).

Les mécanismes d'épissage provoquent également la création de deux protéines Ets-1 chez le poulet (p68 et p54). Alors que la p68^{c-ets-1} possède deux domaines transactivateurs, la p54^{c-ets-1} n'en possède plus qu'un. Même si cela n'a pas encore été démontré, on imagine très bien que ces deux protéines puissent ne pas tenir le même rôle en ce qui concerne la régulation de la transcription.

D'autres épissages, dont les conséquences sont inconnues, ont également été mis en évidence. Il s'agit, entre autres, de ceux qui s'exercent sur le gène *erg* humain. Cinq ADNc ont été identifiés (Rao *et al.*, 1987 ; Duterque-Coquillaud, 1993). Les isoformes issues de ces épissages diffèrent par leur extrémité 5' et par la présence, ou l'absence, des exons A81 ou/et A72. Toutefois, aucune modulation de la fonctionnalité des différents produits n'a pu être observée jusqu'à présent, tant en ce qui concerne leur spécificité de liaison à l'ADN que leurs propriétés transactivatrices.

3.2. Phosphorylation et transduction des signaux extracellulaires

Les protéines Ets-1 sont abondantes dans les cellules lymphoïdes alors que Ets-2 est exprimé de façon plus "ubiquitaire". La stimulation mitogénique et antigénique des lymphocytes T et B a pour conséquence une rapide phosphorylation de Ets-1 suivie d'une diminution de l'expression du gène ets-1, contrairement à ets-2. Ces événements de phosphorylation sont transitoires et dépendent de l'augmentation de la concentration intracellulaire en ions calcium, caractéristique de l'activation des cellules T et B (Pognonec et al., 1988 ; 1990 ; Fisher C.L. et al., 1991). Des sites consensus pour la calcium/calmoduline protéine kinase II (RXXS/T) ont été repérés dans la partie codée par l'exon VII de ets-1 et sont effectivement fonctionnels in vitro (Seth et al., 1992). Récemment, 4 résidus sérine ont été précisément localisés dans ce même domaine (ser^{251} , ser^{257} , ser^{282} , ser^{285}) et feraient intervenir la CaM-Kinase IV, ainsi qu'une autre kinase "calciumdépendante" pour leur phosphorylation (Rabault et Ghysdael, 1994). D'ailleurs, l'isoforme p42c-ets-1 humaine, ainsi que son équivalent murin p52c-ets-1, qui sont amputés de ce domaine, ne sont pas phosphorylables comme les protéines natives et ne sont ainsi pas affectées dans leur capacité de fixation à l'ADN (Pognonec et al., 1990). Que ce soit en tant qu'activateurs de gènes connus pour être exprimés dans les cellules T non-activées ou en tant que répresseur de gènes "sur-régulés" dans les premiers stades de l'activation, Ets-1 est impliquée dans la transduction des signaux mitogéniques ou antigéniques de la surface cellulaire au noyau, pour les cellules lymphoïdes. Son rôle a également été remarqué dans des astrocytes primaires où la phosphorylation de Ets-1 est rapidement stimulée par des agonistes qui induisent une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire *via* des récepteurs liés aux voies de transduction qui passent par le phospho-inositide et l'IP3 (inositol -4,5 triphosphate). Dans ce cas, ce pourrait être la MLC Kinase ("myosin light-chain kinase") qui serait impliquée dans la phosphorylation de Ets-1 *in vivo*. Ets-1 sert donc également d'intermédiaire dans les chemins impliqués dans la prolifération et la différenciation des astrocytes (Fleischman *et al.*, 1995).

Parmi les inducteurs de signaux mitogéniques impliqués dans la transformation cellulaire, on trouve certains facteurs de croissance contenus dans le sérum (CSF-1 ou EGF par exemple), des agents chimiques (tel que le TPA) ou encore des proto-oncogènes tels que ras ou fms. Or la transduction de ces signaux passe par la stimulation de la transcription d'éléments promoteurs contenant des sites (ORE: "oncogene response element") de fixation aux protéines des familles Fos/Jun et Ets (déjà décrites dans le paragraphe 2.2.4) (Galang et al., 1994). L'effective intervention des protéines Ets a été démontrée sur les divers promoteurs impliqués et, également, par l'utilisation de mutants "trans-dominants négatifs" ne contenant que le domaine de liaison à l'ADN et aucun domaine transactivateur. Dans ce cas, les mutants induisent une réversion du phénotype transformé obtenu par l'oncogène ras (Langer et al., 1992; Conrad et al., 1994; Wasylyk et al., 1994).

Les protéines Ets sont donc des médiateurs importants de l'état de transformation induit par *ras* mais, la "liaison" entre *ras* et Ets n'est pas directe. Plusieurs intervenants ont déjà été décrits à ce sujet:

- la kinase Raf-1 est requise pour l'expression contrôlée par les promoteurs contenant des sites AP-1 et Ets (Bruder *et al.*, 1992). Ras activerait Raf-1 en induisant sa phosphorylation et son changement de conformation. Le domaine kinase de Raf-1 étant alors capable de phosphoryler d'autres protéines qui activeraient à leur tour les protéines responsables de la transcription par les ORE.
- les kinases "calcium-dépendantes" sont impliquées dans la phosphorylation de Ets-1 alors que les protéines Ets-2 et Erg seraient plutôt phosphorylées par l'intermédiaire de la PKC (<u>p</u>rotéine <u>k</u>inase <u>C</u>) (Boulukos *et al.*, 1990 ; Murakami *et al.*, 1993).
- de récentes évidences ont montré que la voie impliquant la cascade Ras/Raf/MAPK ("Microtubule-Associated Protein Kinase") contrôle directement l'activité des protéines Ets de la sous-famille Elk-1/Sap-1. Ces protéines sont notamment capables d'induire l'expression du gène *c-fos* par la formation du

complexe ternaire: SRE/SRF/TCF. Les différents TCFs ("Ternary complex factor") identifiés sont: Elk-1; Sap-1a et Sap-1b; Erp/Net. Or la phosphorylation de Elk-1 augmente la quantité de complexes ternaires formés *in vitro* ainsi que l'activité de transactivation sur le SRE (Gille *et al.*, 1992 ; Bhattacharya *et al.*, 1993 ; Hill *et al.*, 1993 ; Jancknecht *et al.*, 1993 ; Marais *et al.*, 1993). Cette phosphorylation a lieu au niveau de 5 résidus (sérine ou thréonine) localisés dans le domaine carboxyterminal de Elk-1 sous l'action d'une protéine kinase de la famille des MAPK: ERK-1 (extracellular signal-regulated kinase) (Gille *et al.*, 1995). Ce serait également une protéine ERK qui serait à l'origine de la phosphorylation de la protéine Sap-1a, en partie sur les résidus déjà impliqués dans Elk-1 et conservés chez les différents membres du groupe (Janknecht *et al.*, 1995a; 1995b). L'activation de ERK a été montrée suffisante pour rendre possible l'activité transcriptionnelle par la région carboxy-terminale des trois protéines TCFs (Price *et al.*, 1995).

Même si le mécanisme qui régule l'activité de la protéine Net/Erp (Giovane et al., 1994; Lopez et al., 1994) sur la transactivation n'est pas encore connu, on sait que l'expression des oncoprotéines Ras, Src et Mos la transforme en activateur alors que Net/Erp réprime la transcription en temps normal, ce qui n'a jamais été montré pour Elk-1. Cette différence entre les diverses protéines de la sous-famille Elk-1/Sap-1, ainsi que leurs patrons d'expression distincts, expliqueraient l'existence de plusieurs protéines homologues (Giovane et al., 1994). La ou les cascades qui précèdent l'action des MAPK sur les TCFs et qui permettent la transduction de divers signaux extracellulaires, sont schématisées sur la figure 31.

- Chez la drosophile, la protéine Yan/Pokkuri de la famille Ets semble jouer un rôle de modulateur négatif de la différenciation des cellules précurseurs du photorécepteur R7, lors du développement de l'oeil, en réponse au signal de transduction qui passe par "Sevenless" (Lai et Rubin, 1992; Tei et al., 1992). Un modèle simple, schématisé par la figure 32, impliquerait la cascade Sevenless-Ras-1-Raf-MAPK qui aboutirait à la phosphorylation des deux protéines de la famille Ets: Yan et Pointed P2. Dans cet état phosphorylé, Yan n'est plus capable d'exercer son activité répressive alors que Pointed P2 et AP-1 coopèrent pour stimuler la transcription des gènes cibles responsables de la différenciation cellulaire (Brunner et al., 1994; O'Neill et al., 1994; revue de Dickson 1995). La protéine Pointed P1, obtenue par épissage alternatif dans le locus pointed et qui diffère de Pointed P2 dans toute sa moitié amino-terminale, ne semble pas pouvoir être phosphorylée. Elle agit en tant qu'activateur constitutif de la transcription (O'Neill et al., 1994). Ces deux protéines Pointed P1 et P2 sont également impliquées dans le développement des cellules gliales de la drosophile (Klämbt et al., 1993; Klaes et al., 1994).

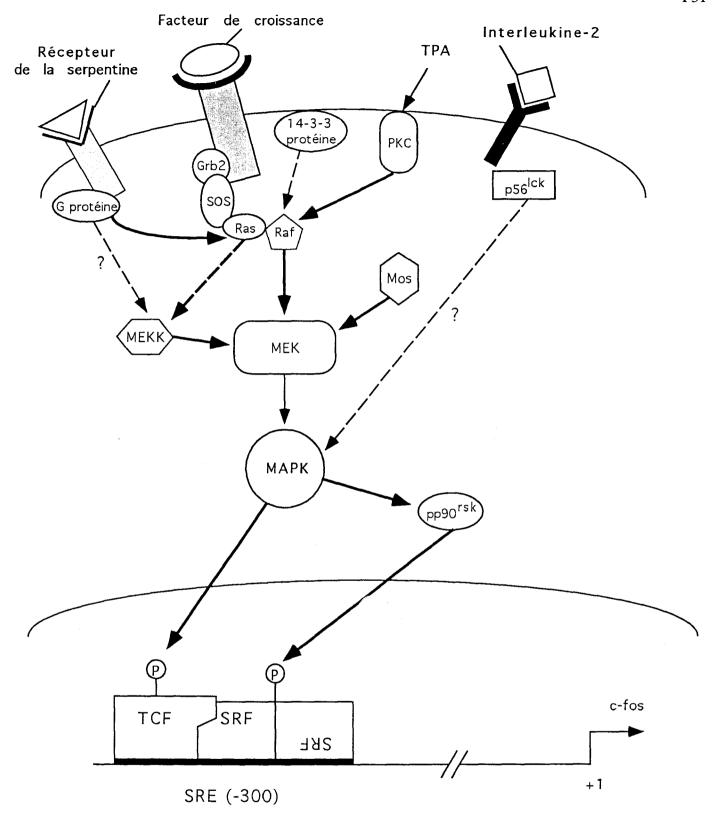


Figure 31 : La transduction des signaux extracellulaires (d'après Janknecht *et al.*, 1995b)

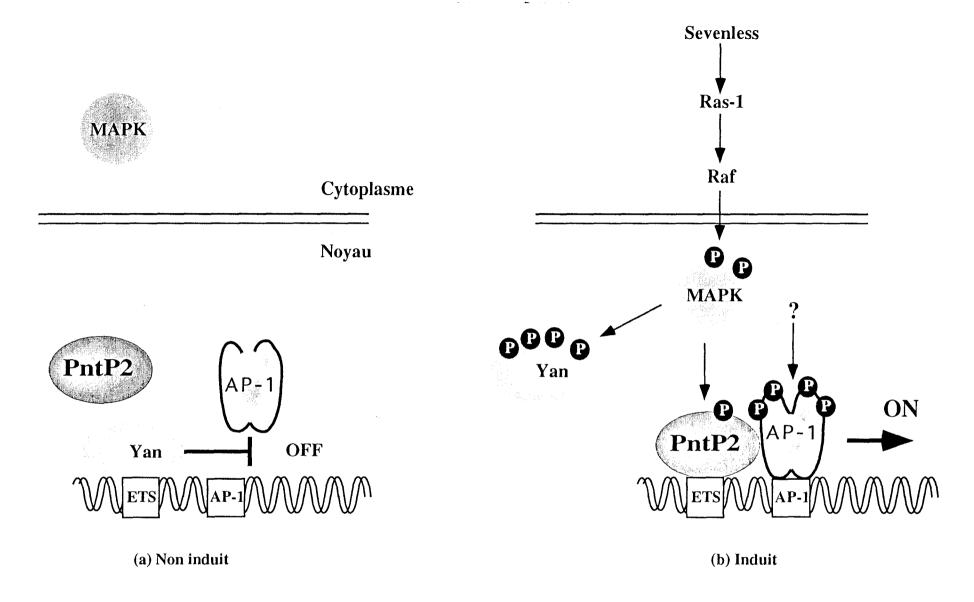


Figure 32 : Modèle des rôles possibles de Pointed P2, Yan et AP1 dans la mise en place des photorécepteurs

4ème partie: Rôles physiologiques des protéines Ets.

L'une des importantes participations des protéines Ets à la vie cellulaire intervient dans la transduction des signaux extracellulaires. Cela a été étudié dans la partie précédente. Les variations d'expression des différents gènes ets dans les cellules hématopoïétiques (Romano-Spica et al., 1994), ainsi que les effets oncogéniques induisant, pour beaucoup, des anomalies dans le système hématopoïétique (voir 5ème partie), suggèrent que la famille Ets constitue un déterminant majeur de la différenciation hématopoïétique (Mignotte et al., 1995). L'importance des protéines Ets dans le développement embryonnaire sera également étudiée dans cette partie.

1. Gènes ou promoteurs régulés par les membres de la famille Ets.

Après la découverte du premier gène *ets* puis de la famille, bon nombre de recherches ont été et sont encore déployées afin d'identifier les gènes cibles des protéines Ets dans le but ultime de définir leur(s) fonction(s) biologique(s). Mais ceci n'est pas si simple: comme nous l'avons vu, les protéines Ets n'agissent pas seules. De plus, elles interviennent aussi bien sur des gènes cibles communs, que sur des gènes spécifiques soit des cellules, soit d'un moment du cycle cellulaire ou même de l'état d'activation des cellules (notamment les lymphocytes B et T). De plus, des gènes-cibles putatifs contenant un motif GGAA peuvent fixer et être transactivés par plusieurs protéines de la famille Ets *in vitro*, sans que l'on sache si c'est effectivement le cas *in vivo*.

1.1. Promoteur/"enhancers" cellulaires

Certaines protéines Ets stimulent l'expression de gènes liés à la prolifération cellulaire tels que les proto-oncogènes *c-jun* (Coffer *et al.*, 1994), *c-fos* (Hipskind *et al.*, 1991), *c-myc* (Roussel *et al.*, 1994), ou *c-fms* (Ross *et al.*, 1994).

Des facteurs de la famille Ets sont également d'importants déterminants dans l'expression de gènes spécifiques des cellules mammaires. Dans le cas du gène de la "whey acidic protein", le site EBS est requis pour la fonction promotrice hormone-indépendante et non pas pour la réponse aux hormones lactogènes (Welte *et al.*, 1994).

L'idée de l'intervention des protéines Ets dans la régulation du cycle

cellulaire est évoquée par l'effet de Ets-2 sur la régulation de l'expression du gène *cdc-2* et, peut être même, par l'expression coordonnée de *cdc-2* et *cycline A* (Wen *et al.*, 1995).

Les protéines Ets entrent également dans d'autres processus de régulation importants que nous allons étudier.

1.1.1. Ontogenèse des cellules du système immunitaire

Le phénomène d'ontogenèse des cellules du système immunitaire a également été analysé du point de vue de l'expression des gènes *c-ets-1*, *c-ets-2*, *elf-1*, *fli-1*, *spi-1/pu-1*, et de leur éventuel rôle dans ce système.

La concordance entre l'expression de cts-2 et le réarrangement de la chaîne α du récepteur des cellules T (TCR α) a guidé l'étude de la régulation de ce gène par les protéines Ets. C'est par un élément (T α 2) de l'"enhancer" 3' du gène $TCR\alpha$ que passe leur effet transactivateur (Ho ct al., 1990). L'"enhancer" du gène de la chaîne β du TCR possède également deux sites de fixation de Ets-1. Les protéines CBF et Ets-1 coopèrent pour leur fixation (Wotton ct al., 1994).

Sans que le mécanisme de régulation ait été effectivement identifié, on sait que les protéines Ets-1 et Fli-1 reconnaissent, *in vitro*, un élément *cis*-régulateur du promoteur du gène *TdT* (<u>Terminal desoxynucleotidyl Transferase</u>). L'enzyme TdT est exprimé au début du développement lymphocytaire et son taux chute au cours de la maturation des lymphocytes (Hermans *et al.*, 1989; Ernst *et al.*, 1993).

Un autre phénomène intéressant, bien qu'imparfaitement compris, consiste en la balance entre les taux des protéines Ets-1 et Ets-2 dans les lymphocytes T humains. En culture, ces lymphocytes expriment assez fortement la protéine Ets-1 à l'état quiescent, mais très peu la protéine Ets-2. L'activation des lymphocytes, par un anticorps anti-CD3, inverse les rapports Ets-1/Ets-2 (Bhat *et al.*, 1990 ; Romano-Spica *et al.*, 1994). Ets-2 jouerait donc un rôle dans la prolifération des cellules T, alors que Ets-1 permettrait le maintient des lymphocytes T à l'état quiescent. Dans ce cas, les gènes cibles n'ont pas encore été identifiés.

L'expression coordonnée de CD4 et CD8 pendant le développement des cellules T est couplée avec l'état de maturation de ces cellules. De plus, l'expression mutuellement exclusive de ces récepteurs dans les cellules T matures est représentative de sous-classes fonctionnelles (CD4+; CD8+). Wurster *et al.* (1994) ont montré que Elf-1 fixe un élément dans le second "enhancer" du gène *CD4*, important pour la spécificité CD4+.

La régulation du gène de l'interleukine 2 (IL-2) par les protéines Elf-1 et Rb en fonction du cycle cellulaire et de l'état de phosphorylation de Rb a déjà été citée

auparavant. Le gène de l'Il-2 est inductible puisqu'il n'est pas transcrit dans les lymphocytes T quiescents, mais le devient, par contre, une heure après délivrance du signal d'activation. Cependant, il semble que les protéines des gènes *junB* et *fra-1* soient directement impliquées dans ce mécanisme de régulation (Thompson *et al.*, 1992 ; Boise *et al.*, 1993 ; Wang C.Y. *et al.*, 1993). D'autres gènes codant des facteurs de croissance possèdent un ou plusieurs EBS putatifs dans leur promoteur, mais l'effective action des protéines Ets sur ces sites n'a pas toujours été montrée.

La coopération des protéines Pu-1 et NF-EM5, pour l'activation de l'"enhancer" situé en 3' du gène *IgK*, a déjà été citée (Pongubala *et al.*, 1992).

1.1.2. Importance des motifs Ets dans les régions régulatrices des gènes spécifiques de la lignée myélo-monocytaire

Ets-2 est fortement exprimée dans les macrophages de poulet, et son abondance augmente rapidement et transitoirement en réponse à des signaux mitogènes (Boulukos *et al.*, 1990). Le promoteur du gène *mim-1*, exprimé uniquement dans les promyélocytes, a pu être transactivé de manière synergique par les protéines Myb et Ets-2, mais le rôle direct de Ets-2 n'a pas été établi (Dudek *et al.*, 1992; Ness *et al.*, 1993).

D'autre part, la protéine Pu-1, dont l'expression est spécifique des lymphocytes B et des macrophages, joue un rôle majeur dans la lignée myélomonocytaire par son action régulatrice sur plusieurs gènes. Parmi ceux-ci, on trouve les gènes des protéines CD11a, CD11b et CD18 qui correspondent à des chaînes des intégrines β2 (Pahl *et al.*, 1993 ; Shelley *et al.*, 1993 ; Böttinger *et al.*, 1994). Le site Pu-1 du promoteur du gène du récepteur à la région constante des immunoglobulines G (FcαRIIIA) est important pour l'expression dans une lignée continue macrophagique (Feinman *et al.*, 1994). Le promoteur monocytaire du gène humain du récepteur au M-CSF (Macrophage-colony stimulating factor) (Zhang *et al.*, 1994) et l'"enhancer" du gène du lysozyme de poulet (Ahne *et al.*, 1994) sont également activés par Pu-1.

Le promoteur du gène du "scavenger receptor" des macrophages, qui est activé lors de la différenciation des monocytes en macrophages, contient notamment deux sites importants dont, l'un est reconnu par Pu-1, et l'autre par un complexe constitué de Ets-2 et des protéines de la famille Jun (Moulton *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 1994). Récemment, Kominato *et al.* (1995) ont montré que l'expression spécifique du gène de l'interleukine 1β (IL-1β) dans les monocytes stimulés est dépendante de séquences promotrices qui sont capables de fixer le facteur Spi-1/Pu-1. Les études des régions régulatrices de gènes exprimés dans les

monocytes/macrophages et granulocytes ont donc révélé une implication générale de la protéine Pu-1 dans cette spécificité tissulaire. Une preuve supplémentaire a été apportée par la description de souris porteuses d'une mutation inactivatrice du gène *pu-1*. Entre autres anomalies hématopoïétiques, les embryons, qui meurent entre 17 et 18 jours de gestation, sont initialement dépourvus de monocytes, macrophages, granulocytes (et lymphocytes T et B).

1.1.3. Les protéines Ets dans les mastocytes et mégacaryocytes

Dans les mastocytes, l'activité de l'"enhancer" du gène *IL-4* chute de moitié lorsque le site Ets qu'il contient est détruit (Henkel *et al.*, 1994).

Tous les promoteurs de gènes mégacaryocytaires décrits jusqu'à présent contiennent des motifs Ets et GATA, souvent disposés en tandem. Citons, par exemple, les gènes *Gp11b* et *c-mpl* (récepteur à la thrombopoïétine) pour lesquels ces deux facteurs ont un effet additif sur la transactivation (Lemarchandel *et al.*, 1993 ; Zhang *et al.*, 1993 ; Mignotte *et al.*, 1994).

1.1.4. Régulation de l'expression des métalloprotéases par les protéines Ets

La protéine Ets-1 active le gène de la stromélysine *in vitro* (Wasylyk *et al.*, 1991). Les promoteurs des gènes de collagénase I (Buttice et Kurkinen, 1993) et uPA (Rorth *et al.*, 1990 ; Nerlov *et al.*, 1992) contiennent de multiples régions, répondant à Ets, cruciales pour leur activation. L'expression du gène de la gélatinase A (collagènase de type IV) pourrait également être régulée par les protéines Ets. Cette protéine joue un rôle important dans la destruction de la membrane basale (Sato *et al.*, 1994). Nous verrons par la suite que la "corrélation" Ets/Métalloprotéases suggère que les protéines Ets pourraient intervenir dans le processus de métastase (Wernert *et al.*, 1994).

1.1.5. Les protéines Ets pour l'initiation de la transcription

Dans certains promoteurs, des sites pour les protéines Ets ont été localisés au voisinage des sites d'initiation de la transcription. Il s'agit, par exemple, des promoteurs des gènes de la thymidylate synthétase (Jolliff *et al.*, 1991), de Ets-2 (Mavrothalassitis et Papas, 1991), de la sous-unité IV de la cytochrome c oxydase (Virbasius et Scarpulla, 1991), ou du gène CD4 qui joue un rôle important dans l'activation antigène-spécifique et le développement des cellules T (Salmon *et al.*, 1993). Ces divers sites sont requis pour l'activité promotrice mais, malgré leur proximité avec le lieu de démarrage de la transcription, il n'a jamais été prouvé que

les protéines Ets interagissent avec les composants de la machinerie générale de transcription ou du complexe d'initiation, ou en fassent partie.

1.2. "Enhancers" viraux

De façon intéressante, des séquences-cibles Ets ont été trouvées dans plusieurs éléments de régulation viraux. Quelques exemples peuvent être cités : virus de polyome (Wasylyk et al., 1990 ; Bolwig et Hearing, 1991), le LTR du MSV (Gunther et al., 1990, Nye et al., 1992), HIV2 CD3R (Wang et al., 1992), le LTR de HLTV1 (Gitlin et al., 1991 ; Clark et al., 1993 ; Gitlin et al., 1993), l'"enhancer" du gène E1A de l'adénovirus (Higashino et al., 1993), E1AV (Carvalho et Derse, 1993), l'"enhancer" du Mo-MuLV (Gunther et Graves, 1994). Le complexe GABP interagit avec l'élément ICP4 du promoteur de HSV1 (LaMarco et al., 1991) ou les séquences du promoteur du gène E4 de l'adénovirus (Watanabe et al., 1993).

Ainsi, les protéines cellulaires Ets sont utilisées par les virus pour faciliter la transcription des gènes viraux. De plus, puisque certaines de ces séquences-cibles sont aussi impliquées dans la réplication des virus, il se peut que les protéines Ets cellulaires soient requises pour la propagation virale.

Yoo *et al.* (1991) ont montré que le motif Ets de l'"enhancer" du virus de polyome peut fonctionner dans l'infection comme activateur de la transcription précoce et, après le début de la réplication de l'ADN, comme un élément initiateur de la transcription des gènes "tardifs".

2. Les protéines Ets dans le développement embryonnaire

2.1. Développement de la drosophile

La métamorphose qui signe le passage de l'état larvaire (3ème stade) au stade nymphal chez la drosophile est initiée par un pic de production d'ecdysone, une hormone stéroïde. Ce pic hormonal déclenche des changements coordonnés du développement des tissus imaginaux qui se différencieront progressivement en tissus adultes, et des tissus larvaires qui, pour la plupart, disparaîtront. La liaison de l'ecdysone à son récepteur induit l'activité transitoire des gènes précoces qui, à leur tour, activent des gènes tardifs et répriment leur propre expression. Les produits précoces sont des régulateurs géniques d'expression certes ubiquitaire, mais dont la combinatoire variée à différents stades du développement nymphal permet l'expression coordonnée des gènes d'expression tissu-spécifique (Ashburner *et al.*,

1974 ; Andres et Thummel., 1992). Le gène E74 est l'un de ces gènes précoces. Il code, à partir de promoteurs différents, deux protéines aux extrémités amino-terminales différentes: E74A et E74B (Burtis et al., 1990; Urness et Thummel., 1990). L'expression de E74A est induite transitoirement en réponse à chacun des six pics d'ecdysone qui se produisent tout au long du développement de la drosophile. Elle est d'ailleurs directement régulée par l'ecdysone (Thummel et al., 1990), probablement au niveau d'un élément de réponse situé dans le premier exon (Burtis et al., 1990; Karim et Thummel, 1991). La transcription du locus E74 est directement corrélée à l'apparition consécutive des transcrits issus des gènes tardifs, bien qu'aucun gène cible n'ai été clairement défini. Il semble que la transcription de E74B ne soit pas régie par les mêmes mécanismes que celle de E74A, tant en ce qui concerne leur répartition spatiale que leur expression temporelle. Récemment, suite à l'observation des effets de mutations récessives de perte-de-fonction introduites dans le gène E74, l'influence de ce gène sur la métamorphose a été montrée (Fletcher et al., 1995). Les mutations des protéines E74A et E74B sont principalement léthales pendant le développement prépupal et pupal, ce qui indique que la fonction de ces protéines est requise pour la pupariation et la nymphose. Elle est aussi requise pour la métamorphose des tissus larvaires et imaginaux. D'un point de vue moléculaire, les protéines E74 sont nécessaires pour une régulation correcte et appropriée, suite à l'effet de l'ecdysone, de nombreux gènes tardifs (de "réponse secondaire") (Fletcher et Thummel, 1995). Notamment, la protéine E74B est requise pour l'induction maximale des gènes de glu dans les glandes salivaires du 3ème stade larvaire, alors que la protéine E74A est requise, pendant le stade précoce prépupal, pour l'induction maximale et temporellement correcte d'un ensemble de gènes tardifs. Les protéines E74 non mutées sont également nécessaires pour une régulation correcte des gènes exprimés de façon prédominante dans le corps gras, l'épiderme et les disques imaginaux.

Par ailleurs, des interactions cellules neuronales/cellules gliales de la ligne médiane ventrale sont nécessaires pour l'élaboration correcte des commissures dans le système nerveux central embryonnaire de drosophile. En particulier, les cellules gliales en migration interviennent dans le processus de la séparation des commissures segmentaires. Le gène *pointed*, de la famille Ets, qui correspond vraisemblablement au gène *D-ets-2* isolé auparavant (Pribyl *et al.*, 1987 ; 1988 ; Chen T. *et al.*, 1992), permet la synthèse de deux transcrits P1 et P2 (Figure 33). Le domaine ETS se situe à l'extrémité carboxy-terminale des protéines (Klämbt, 1993 ; Scholz *et al.*, 1993). Le gène *pointed* est requis pour l'interaction entre cellules gliales et neuronales puisque des mutations, qui se traduisent par une perte de fonction des

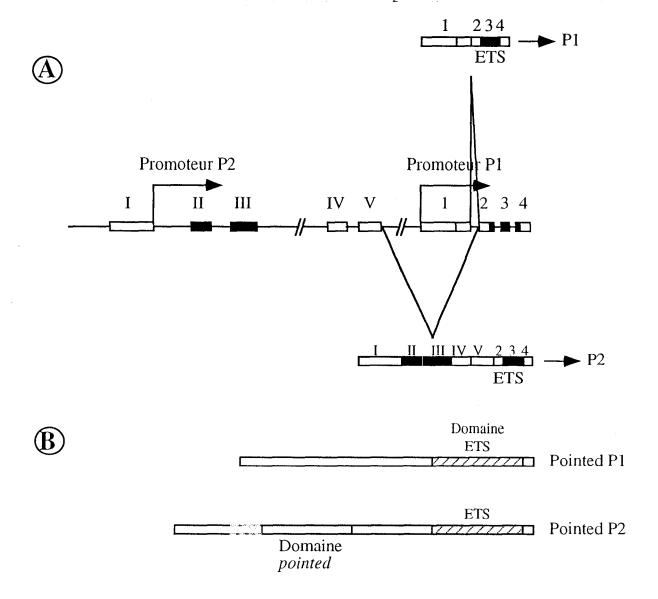


Figure 33 : A : Organisation génomique du gène pointed B : Les protéines Pointed P1 et P2

protéines Pointed, conduisent à des altérations dans le système nerveux central. Le déroulement de la migration des cellules gliales de la ligne médiane est perturbé et, les commissures antérieures et postérieures ne sont pas séparées mais paraissent fusionnées (Klämbt, 1993). De plus, Klaes et al. (1994) ont montré que les facteurs de transcription P1 et P2 codés par pointed interviennent, et même, sont suffisants pour diriger certains aspects de la différenciation des cellules gliales dans le système nerveux central embryonnaire. La protéine P2 est une cible des MAP kinases (Scholz et al., 1993).

La capacité de phosphorylation de P2 par les MAP kinases a également été vérifiée lors du développement de l'oeil de drosophile, en particulier dans la détermination des cellules photoréceptrices R7 (Brunner *et al.*, 1994). P1 est un transactivateur constitutif alors que P2 ne devient active que lorsqu'elle est phosphorylée (O'Neill *et al.*, 1994) (Figure 32).

C'est aussi le cas d'une autre protéine de la famille Ets, issue du gène de drosophile *yan/pokkuri*. A l'état non phosphorylée, elle joue un rôle de régulateur négatif de la transcription des gènes qui permettent la détermination des photorécepteurs R7 mais cesse de l'être lorsqu'elle est phosphorylée. Des mutations de perte de fonction de *yan/pokkuri* induisent la différenciation, en surnombre, de photorécepteurs "R7-like" et autres (Lai et Rubin, 1992 ; Tei *et al.*, 1992 ; O'Neill *et al.*, 1994).

Un autre gène de la famille Ets, D-elg (Pribyl $et\ al.$, 1991), qui correspond à $GABP\alpha$ chez les vertébrés, est impliqué dans le développement embryonnaire de la drosophile. La mutation de la tyrosine en position 397, conservée dans les domaines ETS de toutes les protéines de la famille, en une cystéine, est responsable de la stérilité des femelles mutantes nommées $tiny\ eggs$ (tne) (Schultz $et\ al.$, 1993a). Des mutations situées en dehors du domaine ETS provoquent des anomalies de la segmentation abdominale, suggérant que D-elg joue un rôle dans l'organisation de l'axe antéro-postérieur (Schultz $et\ al.$, 1993b).

Les autres gènes *Ets* de drosophile isolés : *D-ets-3*, *D-ets-4* et *D-ets-6* n'ont jusqu'à présent pas été impliqués dans ce genre d'anomalies obtenues par des mutations naturelles ou artificielles. Cependant, on sait que l'expression de *D-ets-3* et *D-ets-6* est régionalisée dans le système nerveux ventral de l'embryon mais, tandis que celle de *D-ets-3*, contrôlée par le complexe bithorax, est exclusivement thoracique, celle de *D-ets-6* est aussi abdominale (Chen T. *et al.*, 1992).

2.2. Développement du xénope

La distribution tissulaire des ARNm issus des gènes X-ets-1 et X-ets-2 de xénope a été décrite. Celle de l'ARNm X-ets-1 est notamment corrélée à l'oogenèse (jusqu'au stade III dans l'oocyte) et à l'embryogenèse (au moment de la neurulation) (Stiegler et al., 1990 ; 1993). Pour X-ets-2, son rôle a pu être démontré dans l'oogenèse par l'absence de dissolution de l'enveloppe nucléaire suite à la micro-injection d'oligonucléotides anti-sens de l'ARNm X-ets-2 dans l'oocyte. La méiose qui est, dans ce cas, interrompue, peut reprendre son cours normal après injection d'un ADNc ets-2 (Chen T. et al., 1990).

Par ailleurs, X1-fli, l'homologue chez le xénope des gènes fli-1 murin et humain, est exprimé dans les territoires envahis par les cellules de la crête neurale pendant l'embryogenèse (Meyer *et al.*, 1993).

2.3. Développement des Vertébrés: poulet et souris

Des expériences d'hybridation *in situ* chez l'embryon de poulet ont permis la description de la répartition spatio-temporelle des ARNm de la famille Ets, en particulier des deux transcrits *c-ets-1* codant les protéines p54 et p68 et d'un transcrit *erg*.

L'expression des transcrits *c-ets-1* est observée dans bon nombre de dérivés mésodermiques (Vandenbunder *et al.*, 1989 ; Quéva *et al.*, 1993 ; Pardanaud et Dieterlen-Lièvre, 1993) parmi lesquels les vaisseaux sanguins en cours de formation, que ce soit par angiogenèse (bourgeonnement de capillaires préexistants) ou par vasculogenèse (émergence à partir d'une cellule souche), les cellules migratrices de la crête neurale, et les cellules du bourgeon plumaire en cours de condensation (Desbiens *et al.*, 1991). Dans les stades précoces de la morphogenèse de la peau, les transcrits *c-ets-1* sont abondants uniquement dans les cellules de derme qui se différencient et s'accumulent sous l'épiderme et jamais dans les cellules de l'épiderme. Pendant les stades plus tardifs, la transcription de *c-ets-1* se restreint aux cellules endothéliales des vaisseaux sanguins en formation. On peut associer l'expression de *c-ets-1* à la différenciation ou à la migration des cellules endothéliales plutôt qu'à la prolifération cellulaire (Desbiens *et al.*, 1991).

Chez l'embryon de souris, *c-ets-1* est exprimé dans les cellules mésenchymateuses impliquées dans l'angiogenèse et la vasculogenèse, notamment pendant l'implantation de l'embryon (Grévin *et al.*, 1993 ; Kola *et al.*, 1993).

De même que pour *c-ets-1*, l'expression de *ck-erg* se localise dans les dérivés mésodermiques et la crête neurale de l'embryon de poulet. Mais, au stade E6 du développement, une nouvelle aire est envahie par le transcrit *erg*. Elle regroupe les

zones de condensation précartilagineuse et la "primordia" du squelette cartilagineux dans les étapes qui précèdent la formation des os pendant l'élaboration du squelette. Ceci suggère l'implication de *erg* dans la morphogenèse du cartilage (Dhordain *et al.*, 1995).

5ème partie: Propriétés oncogéniques

Comme nous l'avons vu dans la première partie, le gène cellulaire *c-ets-1* a été transduit par le rétrovirus E26. Ainsi, dès sa découverte, *c-ets-1* était connu comme un gène impliqué, suite à l'acquisition de plusieurs modifications, dans les mécanismes qui aboutissent à l'oncogenèse. L'oncogénicité de certaines protéines de la famille Ets a pu être démontrée dans des expériences de transfection dans les cellules NIH 3T3. De plus, *in vivo*, plusieurs gènes *ets* sont impliqués dans des tumeurs dues à des phénomènes d'insertion provirale ou de translocation.

1. Sur-expression

1.1. Transformation par sur-expression

La sur-expression des protéines p56c-ets-2 (Seth et al., 1989) ou p54ck-c-ets-1 (Seth et Papas, 1990) dans des fibroblastes de souris NIH 3T3 stimule la prolifération de ces cellules et abolit leur dépendance vis-à-vis du sérum. Celles-ci sont alors capables de former des colonies en milieu semi-solide et induisent des tumeurs lorsqu'elles sont administrées à des souris "nude". Les gènes c-ets-1 et c-ets-2 sont donc porteurs d'une activité transformante et mitogénique. Sans toutefois expliquer intégralement le mécanisme mis en jeu dans cette situation, on peut noter que (comme nous l'avons développé dans le paragraphe "transduction du signal") les protéines de la famille Ets sont impliquées dans les voies de transduction des signaux mitogéniques, notamment les protéines humaine Ets-2 et de drosophile Pointed (équivalent de Ets-1/Ets-2) dans la voie "ras/MAP kinase/raf". Ainsi, l'expression de protéines mutantes ("transdominants négatifs"), ne comportant que le domaine ETS de liaison à l'ADN, supprime les phénotypes de transformation induits par ras et la réponse mitogénique induite par les facteurs de croissance qui empruntent cette voie, dans des cellules NIH 3T3 (Langer et al., 1992; Wasylyk et al., 1994).

Afin de déterminer si l'activation transcriptionnelle est requise pour la transformation par ets-2, Chumakov et al. (1993) ont utilisé les cellules Rat-1 comme système d'étude. L'expression de ets-2 dans ces cellules induit une transformation, contrairement aux mutants dans lesquels ils ont supprimé le domaine transactivateur (ets-2-TA: mutant "dominant négatif") ou introduit la mutation thermosensible (ets-2-TS) correspondant à celle qui a été identifiée dans le

virus E26 ts-1.1, au niveau du domaine ETS. Les auteurs suggèrent que *ets-2* transforme les cellules en se fixant aux sites qu'il reconnaît et en activant alors la transcription puisque que la co-expression de *ets-2* et *ets-2-TA* bloque la transformation, tandis qu'aucune diminution de la transformation n'est observée par co-expression de *ets-2* et *ets-2-TS*.

1.2. Ets-1 "suppresseur de tumeur"

Par contre, très récemment, une nouvelle propriété de la protéine c-Ets-1 humaine a été mise en évidence. Son expression dans des cellules de lignées issues de cancers du colon (DLD-1 et HCT116) induit la réversion du phénotype transformé et de la tumorigénicité de manière "dose-dépendante" (Suzuki et al., 1995). En temps normal, ces cellules ne contiennent pas de protéine Ets-1 endogène mais, après sur-expression de protéine Ets-1 exogène, plusieurs clones indépendants ont été isolés pour lesquels, plus la sur-expression est importante, plus la croissance indépendante de l'adhésion au support est réduite. Les cellules qui expriment la protéine Ets-1 au plus fort taux forment, en "agar mou", de plus petites colonies, en moins grande quantité, et montrent une incidence tumorale en souris "nude" réduite par rapport aux cellules des lignées tumorales non modifiées. Par contre, la sur-expression d'une protéine Ets-1 mutée dans la région transactivatrice, ayant ainsi perdu sa capacité de transactivation - alors qu'elle est toujours capable de se lier à l'ADN-, ne réduit pas le potentiel tumorigénique des cellules DLD-1. Il semble donc que, dans le cas de la protéine Ets-1 non mutée, la réduction de la tumorigénicité soit liée à la sur-expression.

Plusieurs hypothèses concernant le mécanisme mis en jeu dans ce système sont évoquées par les auteurs. Il se peut que Ets-1 bloque les gènes-cibles du produit Ets-2 endogène présent dans ces cellules, ou qu'elle induise l'expression de nouveaux gènes requis pour la suppression tumorale. Il se peut aussi que Ets-1 modifie les voies de transduction du signal impliquées dans ces cellules cancéreuses. Mais aucune évidence directe ne favorise actuellement l'une ou l'autre de ces hypothèses.

Ainsi, dans des conditions expérimentales différentes, des effets opposés peuvent être obtenus par la sur-expression de la protéine Ets-1.

2. Insertion provirale

2.1. Virus de Friend

La mutagenèse par insertion rétrovirale représente également l'un des moyens d'activation oncogénique des gènes de la famille Ets.

Les érythroleucémies murines, induites par divers virus de Friend, sont des cancers "multi-étapes" caractérisés par la prolifération polyclonale de cellules progéniteurs érythroïdes non leucémiques suivie d'une étape dans laquelle il y a expansion d'un clone de cellules transformées. Les virus de Friend, FV-A qui induit des anémies et FV-P qui induit au contraire une augmentation de la quantité d'érythrocytes dans le sang, correspondent en fait à des complexes composés d'un virus défectif pour la réplication (SFFV-A ou SFFV-P pour "spleen focus-forming virus"). La nature "multi-étapes" des érythroleucémies de Friend a constitué une opportunité pour identifier et analyser les événements moléculaires et cellulaires qui contribuent à l'évolution des populations de cellules transformées. La première étape de croissance de cellules qui ne sont pas encore différenciées indépendante de la présence d'érythropoïétine (EPO). En réalité, il semble que la glycoprotéine gp55, codée par le gène env du virus SFFV, soit responsable de cette première étape et de cette indépendance vis-à-vis de l'EPO. Elle activerait constitutivement le récepteur de l'érythropoïétine, ce qui conférerait un avantage de croissance à ces cellules (Hino et al., 1991; Zon et al., 1992; Wang Y. et al., 1993). Cependant, ceci n'est pas suffisant pour induire la leucémie et d'autres événements sont requis pour son apparition (pour revue, voir Lewin, 1991). Ainsi, trois gènes ont été identifiés pour lesquels l'activation ou l'inactivation ont été associées à l'évolution de la maladie. L'inactivation, due à des mutations, du gène suppresseur de tumeur p53, est une des étapes de l'évolution des leucémies de Friend. Les étapes suivantes sont associées à l'activation de deux membres de la famille Ets par insertion provirale (pour revue, voir Ben David et Bernstein, 1991). Chez l'animal adulte infecté par le complexe de Friend, les cellules érythroblastiques qui se distinguent dans cette étape sont bel et bien transformées, ce qui se traduit par leur capacité à se renouveler et à s'établir en lignée ; leur croissance devient indépendante du stroma et elles sont incapables de se différencier. Dans la plupart des cas (95%), le virus SFFV s'est intégré dans leur génome en amont du gène pu-1(Klemsz et al., 1990)/spi-1 (pour "SFFV proviral integration"), dans une orientation inversée. La structure de la protéine Pu-1/Spi-1 n'est en rien altérée mais son expression, devenue constitutive, est fortement augmentée par l'influence de la séquence activatrice ("enhancer") du LTR viral (Moreau-Gachelin et al., 1988 ; 1989 ; 1994 ; Paul et al., 1991). Cette sur-expression suffit à perturber les

voies qui contrôlent la différenciation des cellules érythroïdes puisque lorsque les cellules immortalisées et transformées, issues d'érythroleucémies de Friend, sont traitées avec des agents chimiques (DMSO) qui suppriment le blocage de leur différenciation, le transcrit et la protéine Pu-1 sont rapidement dégradés. Les cellules semblent alors suivre le programme normal de différenciation hématopoïétique (Schuetze et al., 1992; 1993). D'autres changements génétiques peuvent aussi contribuer à la progression de l'érythroleucémie de Friend, tels que l'intégration provirale dans le gène EpoR (récepteur à l'érythropoïétine), réarrangement chromosomique ou amplification des gènes c-myc et CD43 (Lacombe et al., 1991 ; Misawa et al., 1992), mais leur rôle dans la genèse des leucémies n'est pas encore bien cerné.

D'autre part, le virus auxiliaire F-MuLV du complexe de Friend est capable d'infecter seul des animaux, dès leur naissance, puisqu'il est compétent pour la réplication et provoque alors l'apparition de leucémies. Dans ce cas, aucun réarrangement n'est observé au voisinage du locus *spi-1*. Par contre, le virus F-MuLV s'intègre dans 75% des cas en orientation inverse devant le locus *fli-1*(pour "friend leukemia integration") situé sur le même chromosome, à 240 kpb du gène *c-ets-1*. Mais ici, même si l'activation de gènes localisés à 270 kpb du site d'intégration d'un provirus a déjà été montrée dans d'autres cas (Tsichlis *et al.*, 1989), il semble que seule la sur-expression de *fli-1* soit nécessaire à l'établissement de la malignité des cellules alors que *c-ets-1* ne semble pas affecté par l'intégration du virus dans le génome (Ben David *et al.*, 1990 ; 1991).

2.2. Virus Cas-Br-E: même site d'intégration, mais conséquences différentes

Le locus *fli-1*, originellement dénommé *sic-1* dans ce cas, correspond également à la région réarrangée dans 67% des leucémies murines analysées, induites par le virus Cas-Br-E. Ce virus est non défectif et induit des lymphomes de cellules "non-T" et "non-B" dans des souris NIH/Swiss (Bergeron *et al.*, 1991). Son intégration se localise toujours dans une région de 100 pb et en orientation 5'->3', alors qu'avec le virus de Friend (F-MuLV), les intégrations s'étalent sur une région de 2 kpb et dans une orientation opposée. Ces variations dans l'organisation structurale des provirus F-MuLV et Cas-Br-E dans la région *fli-1* suggèrent que des contraintes moléculaires, dans le mécanisme d'intégration, diffèrent dans les deux systèmes (par des séquences homologues, par exemple) et peuvent refléter la différence dans les cellules cibles, ainsi que l'utilisation de deux mécanismes d'activation oncogénique différents ou encore de l'activation de certains gènes.

fli-1 est aussi impliqué dans une translocation chromosomique qui est associée à une tumeur solide: le sarcome d'Ewing. Il serait d'autant plus intéressant de comparer le spectre de gènes cibles activés dans les cellules dérivées du sarcome d'Ewing avec les gènes activés dans les cellules transformées suite à l'intégration des virus F-MuLV et Cas-Br-E proche du site fli-1, sachant que ces gènes-cibles ne seront peut être pas forcément les mêmes.

2.3. spi-1/pu-1 et fli-1: sites d'intégration différents et conséquences identiques (érythroleucémies de Friend dans les deux cas)

fli-1 est activé uniquement dans les érythroleucémies murines induites chez le nouveau-né par le virus F-MuLV alors que spi-1 est activé seulement dans les leucémies murines induites chez l'adulte par le complexe de Friend, suite à l'intégration du virus SFFV (pour revue, voir Moreau-Gachelin et al., 1994). Compte-tenu des similitudes observées entre Fli-1 et Spi-1/Pu-1, dans leur domaine de liaison à l'ADN notamment, de leur spécificité commune pour les érythroleucémies, et de leurs mécanismes d'activation semblables par intégration rétrovirale, il est surprenant de trouver une spécificité quant à l'intégration des deux virus pour les deux gènes respectifs. On peut proposer plusieurs explications à ces observations. Même si les protéines Fli-1 et Spi-1/Pu-1 sont toutes deux des membres de la famille Ets, elles peuvent transactiver différents gènes. Ceci parce qu'elles reconnaissent différents éléments sur les séquences d'ADN (Zhang et al., 1993) (Spi-1/Pu-1 et Fli-1 sont des membres éloignés l'un de l'autre dans la famille) et/ou qu'elles interagissent spécifiquement avec différentes protéines comme nous l'avons vu auparavant (interaction Pu/NFEM5 par exemple ou Elf-1/Rb qui varie en fonction du cycle cellulaire). Cependant, les clones leucémiques, induits par l'infection du virus de Friend dans différentes conditions, sont similaires dans leurs propriétés leucémiques et dans leurs caractéristiques érythroïdes, ce qui suggère que l'activation des gènes fli-1 et spi-1/pu-1 peut altérer l'expression d'ensembles de gènes distincts mais "chevauchants".

On peut se demander par ailleurs, si la spécificité d'activation de *spi-1/pu-1* et *fli-1* peut être due à des différences dans les cellules cibles de la transformation érythroïde. Sachant que le complexe de Friend peut induire des érythroleucémies soit dans des animaux nouveau-nés soit chez les adultes alors que l'érythroleucémie F-MuLV n'atteint que les nouveau-nés, on peut imaginer que les cellules cibles pour la transformation soient distinctes pour le complexe de Friend et, pour le virus auxiliaire F-MuLV, pris isolément. A ce propos, rappelons que la

glycoprotéine gp55 codée par le gène *env* de SFFV offre un avantage sélectif aux cellules qui la contiennent. Si on suppose alors que les cellules cibles sont bloquées à différents stades de l'hématopoïèse et que la structure de la chromatine change pendant l'hématopoïèse, on peut imaginer que l'accessibilité des gènes *spi-1* et *fli-1* change durant la différenciation cellulaire et favorise ainsi l'intégration spécifique. La caractérisation précise des cellules érythroïdes transformées par chacun des deux virus permettrait de répondre à ces questions et fournira des systèmes dans lesquels il sera possible de décrire les gènes dont l'expression est modifiée suite à l'activation des gènes *spi-1/pu-1* et *fli-1*.

2.4. Autres gènes ets impliqués dans des leucémies murines

- L'érythroleucémie murine ELM a permis l'isolement de cellules leucémiques dont la culture est dépendante du contact avec une couche de cellules nourricières issues de la moelle osseuse (ELM-D), ou indépendante (ELM-I). Nibbs et al.(1993) ont mis en évidence que, dans ce cas, fli-1 n'est pas activé mais que, par contre, l'augmentation de l'expression d'un autre gène de la famille Ets, le gène erg, est responsable de l'arrêt de différenciation et de la croissance indépendante de cellules nourricières.

L'intégration du virus MMLV (Moloney murine leukemia virus ou MoMuLV) dans un site initialement baptisé tpl-1 (tumor progression locus), a été démontrée dans quelques cas de lymphomes de cellules T induits chez le rat par ce virus (Bear et al., 1989). Il s'est avéré que ce locus correspondait au locus ets-1. L'intégration a eu lieu juste en amont du premier exon de ets-1. Cependant, aucune modification notable n'a été mise en évidence au niveau de la quantité des deux transcrits ou des deux protéines issues de ce gène. Le site majeur d'initiation de la transcription est le même dans les cellules normales et transformées ; l'épissage de l'exon VII existe également et le rapport des deux transcrits Ets-1 n'est pas affecté par l'insertion du virus. C'est peut-être la "régulation fine" du gène qui est touchée, notamment la régulation de l'expression du gène pendant le cycle cellulaire. On peut imaginer que le cycle des cellules transformées est modifié par une dérégulation du contrôle de Ets-1 (Bellacosa et al., 1994).

En conclusion, ce n'est pas un hasard si trois types de tumeurs hématopoïétiques résultent de l'activation de trois gènes de la famille Ets par insertion de trois rétrovirus différents. Ceci suggère que ces gènes sont impliqués dans les contrôles de la différenciation hématopoïétique et renvoie bien évidemment au premier gène, v-ets, identifié dans le rétrovirus E26.

3. Translocation

3.1. Translocations EWS/Fli-1, EWS/Erg et EWS/Etv-1

Le sarcome d'Ewing (ES) est une tumeur d'origine neuro-ectodermique, hautement maligne, qui affecte le plus souvent les jeunes adolescents. Elle fait partie de la famille des pPNETs (peripheral primitive neuroectodermal tumors). Trois translocations - t (11; 22) (q24; q12) dans 86% des cas, t (21; 22) (q22; q12) dans 9% des cas, et une t (7; 22) (p22; q12) qui est beaucoup plus rare - caractérisent les pPNETs et sont considérées comme spécifiques de cette classe de tumeurs. Les translocations fusionnent la partie 5' du gène EWS localisé en 22q12 à la partie 3' du gène fli-1 localisé en 11q24 ou du gène erg dont la localisation chromosomique est 21q22 ou du gène etv-1. Les protéines chimères issues de la translocation réciproque n'ont jamais été identifiées, ce qui suggère fortement que les chimères EWS/Fli, EWS/Erg et EWS/Etv-1 sont responsables de l'induction de la tumeur.

La protéine EWS est composée d'un domaine de liaison à l'ARN localisé dans sa partie carboxy-terminale et perdu par la translocation, et d'un domaine amino-terminal (NTD-EWS) (NTD : N-terminal transactivation domain), riche en résidus glutamine et proline, qui régule la spécificité d'activité de liaison à l'ARN (Ohno et al., 1994). Ce domaine présente une homologie avec la partie carboxy-terminale de la polymérase II (Delattre et al., 1992) et peut être subdivisé en deux sous-domaines (A et B) quant à leurs propriétés respectives dans la protéine de fusion.

3.1.1. Fli

Jusqu'à présent, quatre types principaux (et de nombreux cas particuliers) de fusion avec fli-1 ont été identifiés dans les cellules de divers sarcomes d'Ewing en fonction du point de cassure. Mais dans tous les cas le domaine NTD-EWS et le domaine ETS (DBD-Fli) sont fusionnés et maintenus intacts (Figure 34) (Delattre et al., 1992; May et al., 1993; Zucman et al., 1993b). La fonction de liaison à l'ADN du domaine ETS est conservée dans la protéine chimérique et il a même été montré que les protéines Fli-1 et EWS-Fli possèdent la même spécificité et la même affinité de liaison à l'ADN (Bailly et al., 1994; Mao et al., 1994). Cependant, ce domaine se retrouve, dans ce cas, sous le contrôle d'un promoteur ectopique fort et ubiquitaire, ce qui est contraire au promoteur habituel de fli-1. De plus, les expressions des

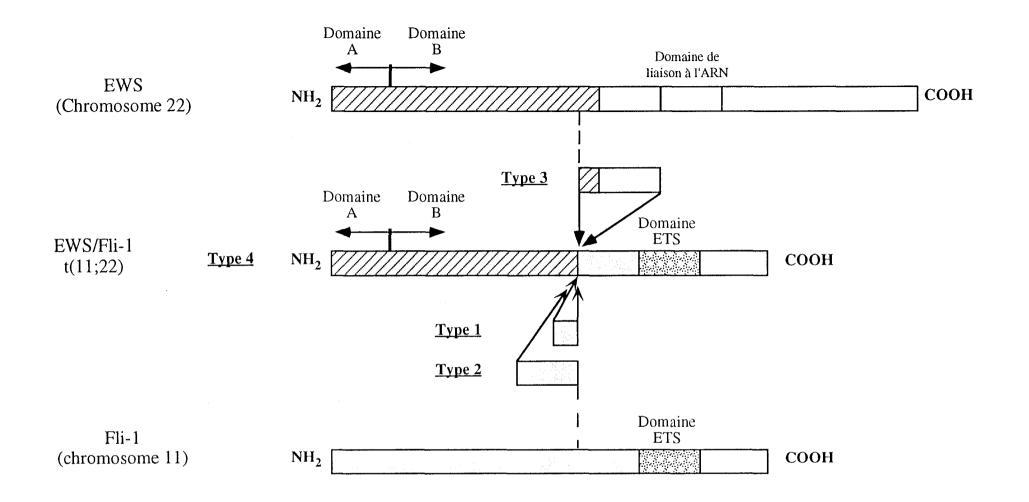


Figure 34 : Quatre types de protéines chimériques EWS/Fli-1

protéines EWS et Fli sont opposées selon le cycle cellulaire puisque le transcrit *fli-1* est détectable dans les lymphocytes quiescents et disparaît après activation des cellules, à l'inverse du transcrit *EWS* présent uniquement lorsque les cellules T sont activées et entrent dans le cycle cellulaire. On peut imaginer alors qu'il y a dérégulation ou régulation non programmée des gènes cibles normaux de *fli-1* au cours de la prolifération et de la différenciation cellulaire. D'autant plus que, si l'un des domaines NTD-EWS ou DBD-Fli est délété, aucune transformation n'est possible, ce qui implique que c'est la formation d'un facteur de transcription chimère qui médie les effets de la translocation (May *et al.*, 1993 ; Bailly *et al.*, 1994). La propriété d'activateur transcriptionnel a en effet été démontrée pour la protéine chimère EWS-Fli (Ohno *et al.*, 1993 ; Bailly *et al.*, 1994). Par exemple, le taux d'expression du gène *c-myc* est augmenté sous le contrôle de la protéine EWS-Fli.

De plus, le NTD-EWS peut être subdivisé en deux domaines : le domaine A, suffisant pour la plupart de l'effet transformant mais pauvre activateur transcriptionnel, et le domaine B, bon activateur transcriptionnel mais avec une faible activité en ce qui concerne la transformation. Le remplacement de ce domaine B par d'autres domaines transactivateurs de protéines hétérologues n'empêche en rien la protéine de transactiver. Par contre, les protéines chimères, obtenues avec certains de ces domaines hétérologues, ne sont plus capables d'induire une transformation cellulaire. Et ceci n'est pas forcément le cas lorsque l'on tient compte de la richesse en résidus glutamine et proline du domaine (Lessnick et al., 1995). Ceci confirme que la protéine EWS-Fli constitue un facteur de transcription "aberrant" mais ajoute l'idée d'une autre fonction biochimique du domaine EWS telle qu'une potentielle modulation de la liaison à l'ADN de la protéine ou même de son activité transcriptionnelle par des interactions protéineprotéine au niveau du domaine A. Même si les deux domaines A et B interviennent plus ou moins pour la transformation, ils sont capables de coopérer pour l'effet sur les cellules NIH 3T3 et restent sûrement tous les deux aussi importants in vivo, lors de l'apparition du sarcome d'Ewing.

3.1.2. Erg

La deuxième translocation découverte dans les cellules transformées du sarcome d'Ewing fait intervenir les exons 6 à 9 du gène erg, dans lesquels on retrouve la séquence codant le domaine ETS (Zucman et al., 1993b ; Sorensen et al., 1994). Même si la région du point de cassure s'étend sur un grand nombre d'exons selon les cas (ainsi que pour les translocations EWS-Fli d'ailleurs), aucune association n'a pu être faite entre le point de cassure et le phénotype des tumeurs

(localisation de la tumeur, différenciation variable), contrairement à ce qui avait pu être montré dans un type de mélanomes malins, tumeurs neuroectodermales qui n'appartiennent pas à la famille des tumeurs d'Ewing, impliquant des fusions EWS-ATF1 (Zucman et al., 1993a ; 1993b ; Giovannini et al., 1994).

erg et fli-1 ont des structures similaires et jouent probablement des rôles similaires dans les chimères avec EWS. En dehors du domaine ETS, qui présente 98% d'identité entre Erg et Fli-1 et qui est requis pour la transformation, les 87 acides aminés localisés immédiatement en aval du domaine ETS sont identiques à 72% entre Erg et Fli-1. La fonction de cette région est inconnue dans les protéines natives mais il est possible qu'elle module la liaison à l'ADN, ce qui suggérerait que les sites naturels de Erg et Fli-1 seraient similaires mais pas tout à fait identiques. Ceci dit, les chimères EWS-Fli et EWS-Erg agissent peut-être par un même mécanisme pour induire l'action dérégulée ou non programmée de gènes cibles similaires. Rappelons que la naissance des gènes erg et fli-1 est basée sur un événement de duplication à partir d'un ancêtre commun (Lautenberger et al., 1992; Laudet et al., 1993), ce qui suggère que l'environnement et, donc, les structures de la chromatine et des introns impliqués dans les réarrangements de erg et fli-1 avec EWS, peuvent être similaires. Les translocations t(11; 22) et t(21; 22) relèveraient d'une "sélection biologique".

Quoiqu'il en soit, ce sont sûrement les gènes de la famille Ets qui guident l'oncogenèse sur le chemin du sarcome d'Ewing puisque le gène *EWS*, fusionné à un autre facteur de transcription ATF, de la famille bzip, induit la formation d'un autre type de tumeur (Zucman *et al.*, 1993a). Dans ce cas, c'est également le domaine NTD-EWS qui régule les propriétés d'activation transcriptionnelle de la protéine chimère créée.

3.1.3. Etv-1

Le troisième type de translocation, beaucoup plus rare, t(7; 22) (p22; q12), fusionne le gène *EWS* au gène *etv-1* (pour "Ets translocation variant"), homologue humain du gène murin *ER81* (Brown et McKnight, 1992), localisé en 7p22 (Jeon *et al.*, 1995). Une fois de plus, on ne sait pas si la voie utilisée par la protéine chimère pour induire l'oncogenèse est la même que dans les deux autres types de translocation. Seule l'identification des gènes cibles de ces différentes protéines chimères pourrait élucider le problème.

3.2. Sarcome biphénotypique et EWS-Fli-1

Les pPNETs tels que le sarcome d'Ewing, sont considérés comme des tumeurs histogénétiquement distinctes des rhabdomyosarcomes, tumeurs mycogéniques dans lesquelles aucune fusion avec le gène EWS n'a été décelée. Cependant, dans un type de sarcome biphénotypique touchant les différenciations neuroectodermale et mycogénique, Sorensen et al. (1995) ont décelé la présence de protéines de fusion EWS/Fli-1 identiques à celles qui ont été décrites pour le sarcome d'Ewing. Dans ce contexte, le phénotype musculaire observé dans le sarcome biphénotypique peut être dû à des altérations génétiques supplémentaires ou être le reflet d'une capacité de différenciation de la cellule d'origine en plusieurs types cellulaires. Les cellules pluripotentes issues de la crête neurale embryonnaire ou de l'ectomésenchyme sont en effet capables de se différencier non seulement en tissu neuroectodermal mais aussi en lignées mésenchymales, incluant le muscle squelettique (Stemple et Anderson, 1992).

3.3. TLS/FUS-Erg

Les gènes EWS et TLS/FUS qui codent des protéines homologues, capables de se lier à l'ARN, sont impliqués dans des tumeurs "solides" humaines. Le gène TLS/FUS est impliqué dans des liposarcomes myxoïdes humains par la translocation t (12; 16) (q13; p11) (Crosat et al., 1993; Rabbitts et al., 1993) et dans des leucémies myéloïdes humaines par la translocation t (16; 21) (p11; q22) (Shimizu et al., 1993; Ichikawa et al., 1994; Prasad et al., 1994). Le gène TLS/FUS est ainsi fusionné soit au répresseur transcriptionnel CHOP (dans les liposarcomes), soit à l'activateur transcriptionnelerg (dans les leucémies myéloïdes). Le site de translocation de erg se situe au même niveau que dans la translocation EWS-erg, ce qui permet le maintien du domaine ETS. De même, c'est un domaine homologue à celui de EWS qui est transloqué pour TLS/FUS (TFD: TLS/FUS fusion domain). En dépit du fait que les protéines EWS et TLS/FUS soient très proches, elles exercent différents effets sur les propriétés de liaison à l'ADN et d'activation transcriptionnelle des protéines de fusion. En effet, l'activité de liaison à l'ADN du domaine ETS, dans la protéine de fusion, est régulée négativement par le TFD (alors qu'elle était régulée positivement avec EWS). De plus, l'activité transcriptionnelle de la protéine TLS/FUS-Erg, portée par le domaine TFD et le domaine carboxy-terminal de Erg, est plus faible que celle de la protéine Erg seule.

La leucémie peut donc être due à l'altération des propriétés de ce facteur de transcription aberrant par rapport au facteur Erg habituellement exprimé dans ces cellules. Il est possible que le TFD interagisse avec des facteurs cellulaires et active ainsi le ou les domaines responsables de la transactivation. Ces deux domaines peuvent également fonctionner indépendamment selon les séquences cibles et/ou les interactions protéine-protéine (Shimizu *et al.*, 1993 ; Ichikawa *et al.*, 1994 ; Prasad *et al.*, 1994).

Il apparaît donc que les domaines de EWS et TLS/FUS impliqués dans la translocation puissent avoir différents effets sur les propriétés transcriptionnelles des protéines de fusion selon le partenaire de fusion (Fli, Erg, ATF, CHOP), les séquences cibles et les partenaires pour les interactions protéine-protéine.

3.4. Tel

3.4.1. Tel/PDGFRB

Golub et al. (1994) ont cloné un gène de fusion issu d'une translocation t (5; 12) (q33; p13) trouvée chez les patients atteints de leucémie myélomonocytaire chronique (CMML) (Wessels et al., 1993). Cette translocation fusionne un membre de la famille des facteurs de transcription Ets nommé Tel (pour "translocation Ets leukemia") au récepteur tyrosine kinase (RTK): PDGFRβ (pour "platelet-derived growth factor receptor β). La CMML correspond à un syndrome myélodisplasique caractérisé par la prolifération anormale de clones myéloïdes, pouvant progresser en une leucémie myéloïde aiguë (AML) si une autre translocation s'ajoute.

La fusion tel-PDGFRβ semble donc être une des premières mutations de ce processus multi-étapes aboutissant aux AML. Contrairement aux autres translocations impliquant un gène Ets, dans ce cas, ce n'est pas la partie carboxyterminale avec le DBD mais la partie amino-terminale comportant le domaine putatif HLH (Helix-loop-Helix) qui est transloquée. Elle est fusionnée aux domaines transmembranaires et tyrosine kinase du PDGFRβ. Le domaine de liaison au ligand du PDGFRβ est exclu (Figure 35). Le domaine HLH de Tel est conservé dans une partie des membres Ets. Il présente une faible homologie avec les autres facteurs de transcription à HLH, n'a aucune activité de liaison à l'ADN mais possède une fonction de transactivation, et interagit probablement avec d'autres protéines. La protéine de fusion réciproque n'a pas été décelée chez les patients atteints de CMML.

Plusieurs hypothèses peuvent être formulées quant au mécanisme de transformation. Il s'agirait tout d'abord de déterminer la localisation de la protéine de fusion dans la cellule. Puisque le domaine transmembranaire du PDGFRβ est maintenu, on peut imaginer que la protéine de fusion sera ancrée à la surface membranaire. Mais on peut aussi imaginer le passage de la chimère dans le noyau,

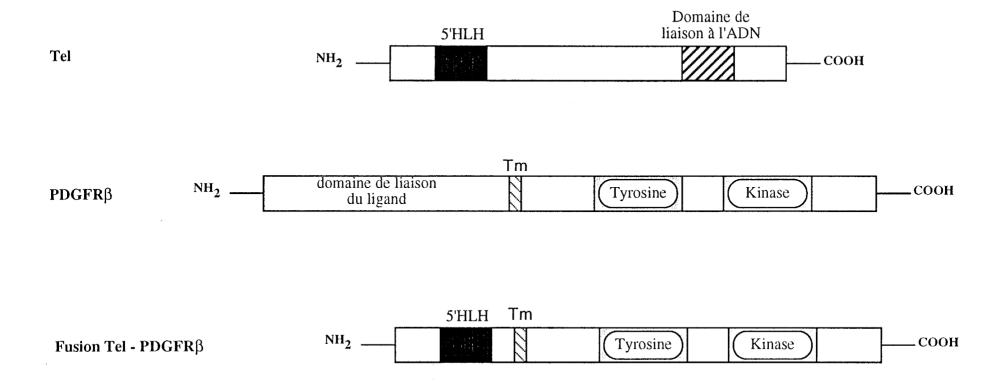


Figure 35 : Fusion Tel- PDGFRβ
Tm: domaine transmembranaire

lieu d'action habituel des protéines transactivatrices. Dans ce cas, la protéine aurait un rôle de transactivateur aberrant ou induirait la phosphorylation et régulerait l'activité, grâce à son domaine tyrosine kinase, d'autres facteurs de transcription présents dans le noyau. Ou alors, elle agirait tout simplement comme dominant négatif vis-à-vis de la protéine Tel non mutée.

Partant de l'hypothèse pour laquelle la protéine de fusion se situe dans le cytoplasme, on peut imaginer que la fusion résulte en une protéine à activité tyrosine kinase constitutive, ou encore que le domaine HLH de Tel facilite la dimérisation du PDGFRβ de façon indépendante de la fixation au ligand. La dimérisation est en effet une étape critique, avant la phosphorylation, pour l'activité d'un récepteur à tyrosine kinase. Il est aussi possible que Tel n'apporte aucune fonction supplémentaire mais qu'elle induise l'expression d'un PDGFRβ constitutivement actif, tout simplement par le fait qu'il soit tronqué. Ainsi, c'est la voie de transduction du signal passant par *ras* qui serait perturbée puisque le PDGFRβ constitue l'un des premiers maillons de cette voie (Figure 36) (Sawyers et Denny, 1994).

3.4.2. Tel/Abl

Récemment, un deuxième type de translocation t (9; 12) (q34; p13) entre le domaine HLH de Tel et le domaine tyrosine kinase d'une autre protéine a été mis en évidence chez un patient présentant une leucémie. Cette fois, le partenaire de translocation est la protéine ABL, protéine à activité tyrosine kinase (mais "non récepteur"), dont le gène est localisé sur le chromosome 9 (Papadopoulos *et al.*, 1995). Il a été montré que la protéine chimère développe une activité tyrosine kinase élevée par rapport à la protéine normale. Le gène *abl* est également fusionné avec le gène *bcr* dans la translocation *bcr/abl* ("chromosome Philadelphie") et la partie Bcr de la protéine de fusion engendre la dimérisation. On peut donc supposer que la partie Tel de la chimère Tel-Abl fonctionnerait de la même façon et permettrait la dimérisation. Mais ceci reste à vérifier.

3.4.3. Tel/ MN1

La translocation t(12; 22) (p13; q11) a récemment été mise en évidence chez deux patients atteints de leucémie myéloïde et un patient atteint du syndrome myélodisplasique (MDS) (Buijs et al., 1995). Dans ce type de translocation, les gènes tel et MN1 sont fusionnés. L'expression des deux ARNm chimères réciproques, tel-MN1 et MN1-tel, a pu être montrée dans les cellules de moelle osseuse de deux patients sur trois. La protéine chimère MN1-Tel est composée de la partie contenant

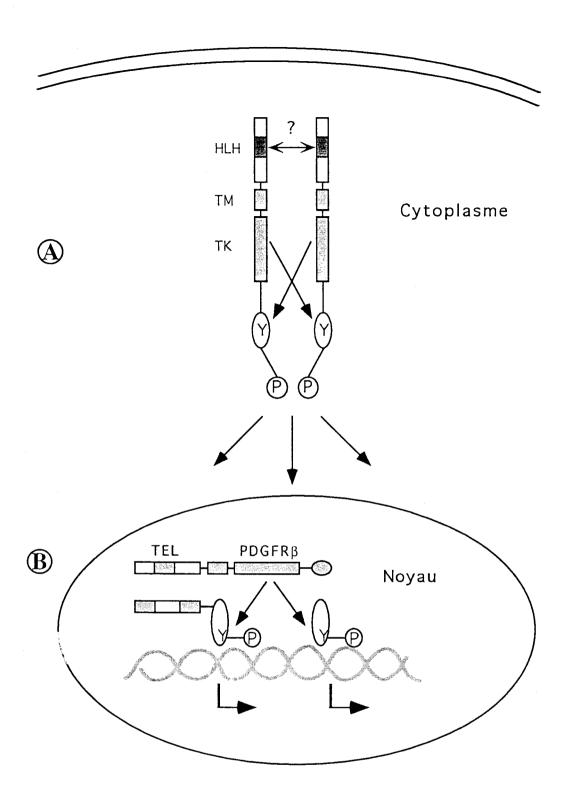


Figure 36 : Deux mécanismes possibles (A ou B) de la transformation par Tel-PDGFR β selon sa localisation cellulaire TK: domaine Tyrosine Kinase

le domaine ETS de Tel fusionnée à la presque totalité de la protéine MN1. Le gène MN1 a été isolé dans un cas de méningiome (Lekanne-Deprez et al., 1995) mais peu de choses sont actuellement connues sur la protéine MN1, si ce n'est qu'elle possède des zones riches en résidus glutamine et proline. Ces zones n'ont pas encore été montrées comme étant des domaines transactivateurs mais la structure de cette chimère fait néanmoins penser à un facteur de transcription aberrant, par analogie aux chimères EWS-Fli-1 et EWS-Erg. Ceci reste à démontrer ainsi que le rôle de cette altération dans l'apparition des leucémies myéloïdes.

3.5. Autres translocations

Les gènes *c-ets-1*, *c-ets-2*, *elk-1* et *elk-2/erg* sont également situés près des points de "cassure" d'autres translocations associées à d'autres tumeurs, notamment des leucémies pour *c-ets-1* et *c-ets-2*. Cependant, leur réarrangement et leur rôle dans la pathogénicité n'a jamais été démontré jusqu'à présent (Tableau 2).

4. Implications dans d'autres tumeurs

4.1. Irrigation et invasion tumorales

Les ARNm *c-ets-1* sont détectés, chez le poulet ou la souris adulte, préférentiellement dans les organes lymphoïdes. Dans les embryons de poulet ou de souris, ces transcrits sont aussi exprimés dans des régions bien localisées, notamment dans les cellules mésenchymateuses adjacentes aux structures épithéliales parallèlement à l'induction des interactions épithéliomésenchymateuses. Ils sont également détectés pendant la migration des cellules de la crête neurale et la formation des vaisseaux sanguins, qui représentent des exemples physiologiques de l'invasion de tissus (Vandenbunder *et al.*, 1989; Desbiens *et al.*, 1991 ; Grévin *et al.*, 1993 ; Kola *et al.*, 1993 ; Quéva *et al.*, 1993).

Dans les tumeurs, l'invasion est une des étapes cruciales dans la cascade métastasique pendant laquelle on observe une dégradation et un "remodelage" de la matrice extracellulaire. Les protéases qui dégradent cette matrice telles que l'u-PA ("urokinase-Plasminogen Activator"), les collagénases I et IV, ou la stromélysine sont impliquées dans ce processus. Or, in vitro, les facteurs de transcription Ets-1 et Ap-1 coopèrent pour activer l'expression de ces protéases (Gutman et Wasylyk, 1990; Rorth et al., 1990; Buttice et al., 1991; 1993; Nerlov et al., 1991; Wasylyk et al., 1991). Dans plusieurs tumeurs ainsi que dans des cultures de fibroblastes humains

Translocation	Gène transloqué	Tumeur
-t(9;11)(p22;q23) -t(6;11)(q27;q23) -t(2;11)(p13;q23)	ets-1	 - Leucémie monocytaire aigue - Cellules leucémiques (AMMOL) - Syndrome myélodysplasique et préleucémie - Sous-type de leucémie(expansion cellules
-t(4;11)(q21;q23)		précurseurs myéloïde/lymphoïde
-t(8;21)(q22;q22)	ets-2	- Leucémie myéloïde aigue, avec morphologie M2 (AML-M2)
-t(X;18)(p11,2;q11,2)	elk-1	- Sarcome synovial
-Point de cassure : 14q32	elk-2	- "Ataxia télangiectasia" et autres tumeurs de cellules T

Tableau 2 : autres translocations des gènes de la famille Ets

stimulées par le bFGF ou le TNF α , il a été montré que l'expression de c-ets-1 était superposée à celle de ces protéases. Il est donc tentant d'imaginer que, in vivo, c-Ets-1 contrôle leur expression, en coopération ou indépendamment d'autres facteurs de transcription (Wernert et al., 1994).

Dans ces tumeurs (carcinomes invasifs humains), ainsi que dans un modèle pour l'invasion tumorale chez la souris, les transcrits *c-ets-1* ont été détectés dans les fibroblastes du stroma, notamment ceux qui sont directement en contact avec la tumeur, et non pas dans les cellules épithéliales cancéreuses proprement dites, ni dans les fibroblastes de lésions non-invasives ou de tissus normaux. Les cellules endothéliales des capillaires qui irriguent la tumeur sont également positives vis-àvis de l'expression de *c-ets-1*. Ces vaisseaux sont néoformés puisqu'ils sont recrutés par la tumeur *via* des facteurs angiogéniques afin de permettre sa croissance. Le parallèle est alors fait avec la détection de l'expression de *c-ets-1* dans les vaisseaux sanguins en formation chez l'embryon de poulet (Vandenbunder *et al.*, 1989 ; Wernert *et al.*, 1992 ; 1994).

Ainsi, le gène *c-ets-1* serait impliqué dans l'irrigation de certaines tumeurs, ce qui permettrait leur croissance, ainsi que dans la régulation du processus d'invasion des cellules tumorales.

4.2. Cancers du sein

La sur-expression du produit du proto-oncogène her-2/neu a été trouvée dans 20 à 30% des cancers primaires du sein et autres tumeurs. Plus ce récepteur membranaire du facteur de croissance, p185her-2, est sur-exprimé, plus la croissance de la tumeur est "agressive" et la survie du patient réduite. Or le nombre de copies du gène n'a pas été trouvé augmenté dans les cellules touchées par certains de ces cancers, ce qui suggère qu'un événement plus précoce a induit la dérégulation de la transcription du gène her-2. Scott et al (1994) ont donc eu l'idée d'identifier l'élément promoteur de ce gène qui est responsable de l'augmentation de la quantité de transcrit *her-2* dans des lignées de cellules de cancers du sein. Ils ont ainsi mis en évidence le rôle d'un site GAGGAA, conservé en séquence et en position (38 bases en amont de la boite CAAT) entre les gènes humain (her-2) et murin (neu). Ils ont démontré que ce site est effectivement reconnu par une protéine de 60 kDa présente abondamment dans les cellules sur-exprimant her-2 et que, lorsqu'il est muté, l'activité promotrice de lier-2 est réduite de plus de 60%. Les "candidats" Ets exprimés dans ces cellules sont $GABP\alpha$, elk-1, elf-1 et PEA3. Or la sur-expression de PEA3 avait auparavant été montrée dans des adénocarcinomes

mammaires de souris transgéniques portant le gène *neu* sous le contrôle du promoteur de MMTV (<u>m</u>ouse <u>m</u>ammary <u>t</u>umor <u>v</u>irus) ainsi que dans les métastases pulmonaires. Le transcrit, quant à lui, n'est peu ou pas détecté dans les épithéliums mammaires environnant les tumeurs ou dans les tissus pulmonaires normaux. La corrélation a également été établie entre l'activité tyrosine kinase élevée et l'abondance de l'ARNm *PEA3* dans les cellules tumorales (Trimble *et al.*, 1993). D'où la supposition du rôle du gène *PEA3* ou d'un gène proche (ERM, ER 81, ...), dans la tumorigenèse et, peut-être aussi, dans la progression tumorale. Il augmenterait la transcription de gènes codant un récepteur au facteur de croissance, comme dans le cas étudié, ou de facteurs de croissance eux-mêmes, ou de protéases comme cela a été montré avec *ets-1*.

4.3. Lignée hématopoïétique

Des embryons de souris homozygotes pour une mutation dans le locus pu-1 ont été obtenus par le groupe de Scott vt ul. (1994). Des déficiences sont observées chez tous les individus dans la génération des progéniteurs pour les lymphocytes B et T, des monocytes et des granulocytes. On observe également une détérioration de la maturation des érythroblastes dans certains cas. pu-1 semble donc être important pour le développement et la différenciation lymphoïde et myéloïde. Le résultat n'est pas inattendu, étant donné le rôle du gène spi-1/pu-1 dans l'établissement des érythroleucémies de Friend et l'importance de Pu-1 dans la régulation de différents promoteurs myéloïdes spécifiques.

4.4. "Down Syndrome"

La localisation chromosomique du gène ets-2 en 21q22 a suggéré qu'il pouvait être un élément génétique contribuant appartenant au groupe de gènes dont l'amplification est associée avec le "Down Syndrome" (DS) (Sacchi et al., 1986; Rosenthal et al., 1987). Ce concept repose sur l'observation de la présence de trois copies du gène ets-2 dans les trisomies 21 partielles associées au phénotype DS (Sacchi et al., 1988a; 1988b), et sur la sur-expression de ets-2 dans des cellules dérivées d'individus atteints par le DS. La comparaison des cartes génétiques humaine et murine montre que ets-2 appartient à un groupe de gènes du chromosome 21, présents de manière synténique sur le chromosome 16 de souris (Watson et al., 1986). Or, dans les souris à trisomie 16, des caractéristiques du phénotype DS humain sont retrouvées (Sacchi et al., 1988a; Gearhart et al., 1986).

Afin de vérifier la possible relation entre la sur-expression de *ets-2* et les anomalies impliquées dans le DS, Sumarsono *et al.* ont généré des lignées de souris transgéniques sur-exprimant *ets-2*. Ils observent des anomalies similaires aux phénotypes des souris trisomiques pour le chromosome 16 et des individus atteints de DS. Ces données suggèrent que la sur-expression de *ets-2* pourrait être responsable d'une partie des anomalies phénotypiques impliquées dans le DS (Sumarsono *et al.*, présentation au congrès de "Frederick 1994").

RESULTATS

Lorsque ce travail a été initié, en 1991, la capacité de liaison à l'ADN des protéines c-Ets-1 avait été montrée. En premier lieu, il a été montré que ces protéines se fixaient, de manière aspécifique, sur de l'ADN fixé sur cellulose ("DNA-cellulose"). Puis, des séquences naturelles de promoteurs ou de régions régulatrices de la transcription de gènes cellulaires ou viraux ont permis de cerner la séquence spécifique de fixation des protéines Ets. Que ce soit la protéine humaine, celle de souris, ou celles de poulet, les protéines c-Ets-1 sont capables de se fixer à des motifs EBS naturels ("Ets binding site") contenant le noyau GGAA/T.

Puisque le gène *c-ets-1* a été isolé à partir de la découverte de l'oncogène *v-ets*, et dans l'optique de comprendre les mécanismes d'activation oncogénique, l'étude du rôle des différences existant entre le gène cellulaire et le gène viral a été abordée, notamment dans le contexte des propriétés de fixation à l'ADN.

1. mise au point des conditions expérimentales

(Ces résultats ont été en partie présentés au "Cold Spring Harbor Meeting on Cancer Cells: Mechanisms of eucaryotic transcription" dans un poster intitulé "Comparative analysis of the binding properties of various c-Ets-1 and v-Ets proteins to the EBS motif", N. Soudant, D. Stehelin and D. Leprince.)

D'une part, la fusion de Myb et Ets dans la P135∆gag-myb-ets (mutation F) (Figure 3) est indispensable à l'activité transformante du virus E26. Ceci a été développé dans la première partie de l'introduction. Nous y avons recensé les éléments démontrant les contributions réciproques de ces deux éléments de la protéine virale, pour les effets oncogéniques sur les différentes cellules atteintes. A l'évidence, on peut dire que la P135 constitue une nouvelle protéine aux propriétés inédites par rapport à celles des protéines cellulaires c-Ets-1 et c-Myb. D'autre part, l'acquisition des mutations A (A285V), B (I445V) et C (LHAMLDVKPDADE -> HSSASGLTSSMACSSF) présentes dans v-Ets, également détaillées dans la première partie de l'introduction de ce mémoire (Figure 3), pourrait modifier les propriétés normales de c-Ets-1, et par conséquent, de la protéine virale (la correspondance du "code à une lettre" pour les acides aminés est précisée dans le tableau 3). A ce propos, une première preuve a été apportée par Reddy et Rao (1990). Ces auteurs ont montré que l'activité de liaison à l'ADN "non spécifique" était modulée par

Les acides aminés et leurs symboles

Codons

A	Ala	Alanine	GCA	GCC	GCG	GCU		
С	Cys	Cystéine	UGC	UGU			 	
D	Asp	Acide aspartique	GAC	GAU	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·			
E	Glu	Acide glutamique	GAA	GAG				
F	Phe	Phénylalanine	UUC	UUU				
G	Gly	Glycine	GGA	GGC	GGG	GGU		
Н	His	Histidine	CAC	CAU				
	lle	Isoleucine	AUA	AUC	AUU			
K	Lys	Lysine	AAA	AAG				
Ĺ,	Leu	Leucine	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU
M	Met	Méthionine	AUG		-			
N	Asn	Asparagine	AAC	AAU		•		
P	Pro	Proline	CCA	CCC	CCG	CCU		
a	Gln	Glutamine	CAA	CAG				
R	Arg	Arginine	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU
S	S. 7	Sérine	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU
T	Thr	Thréonine	ACA	ACC	ACG	ACU		
V	Val	Valine	GUA	GUC	GUG	GUU		
W	Trp	Tryptophane	UGG					
Y	Tyr	Tyrosine	UAC	UAU				

Tableau 3 : le code génétique

l'extrémité carboxy-terminale de la protéine. En effet, lorsqu'ils remplacent les 13 derniers acides aminés de c-Ets-1 par les 16 acides aminés identifiés dans v-Ets (mutation C), ils observent une diminution de l'affinité de la protéine pour la "DNA-cellulose". C'est le rôle de cette mutation C, ainsi que celui des mutations ponctuelles A et B, vis-à-vis de la liaison à une séquence spécifique des protéines Ets: "PEA3", qui ont été étudiés au moyen de protéines "chimères" dans lesquelles les 3 mutations ont été insérées une à une de façon à obtenir tous les intermédiaires possibles entre une protéine c-Ets-1 et une protéine v-Ets. Chacune des substitutions diminue ou même abolit la fixation au motif PEA3. Ce sont apparemment les mutation C et B qui fournissent, même séparément (OBO; AOC), les effets les plus importants, le plus fort étant obtenu lorsqu'elles sont toutes les deux présentes, que la mutation A soit ajoutée ou non (ABC; OBC) (Leprince et al., 1992).

Par la suite, plusieurs publications sont parues, dans lesquelles la capacité de liaison des protéines c-Ets-1 et v-Ets, à des séquences-cibles spécifiques, étaient analysées. Apparemment, il y avait contradiction. Certains auteurs montraient, par la technique de retard sur gel, que la protéine c-Ets-1 était capable de se fixer à l'ADN, comme cela a été prouvé par ailleurs sur de nombreuses séquences naturelles de promoteurs, alors que la protéine v-Ets était beaucoup moins apte, voire pas du tout (Leprince et al., 1992; Nye et al., 1992; Wasylyk et Wasylyk, 1992). Par contre, d'autres groupes affirmaient l'inverse: la fixation à la séquence-cible de c-Ets était beaucoup moins importante que celle de v-Ets (Hagman et Grosschedl, 1992; Lim et al., 1992) (Tableau 4). En comparant les conditions de manipulations utilisées par les uns et les autres, un détail était remarquable et semblait corréler avec la divergence de résultats obtenus : la présence ou l'absence d'ions magnésium dans le tampon de réaction du retard sur gel.

C'est pourquoi, dans un premier temps, les conditions d'expériences de retard sur gel ont été ré-examinées, par rapport à celles qui étaient habituellement utilisées dans le laboratoire.

La sonde oligonucléotidique qui a été utilisée comme séquence d'ADN spécifique correspond à une version du site de l'"enhancer" du virus de polyome généralement nommé PEA3, mutée de façon à obtenir un site de fixation "optimisé" (de haute affinité) pour la protéine p68c-ets-1 (Wasylyk *et al.*, 1991 ; Wasylyk et Wasylyk, 1992); elle sera ultérieurement appelée "EBS": elle correspond à l'oligonucléotide TCGAGCC<u>GGAA</u>GTGACGTCGA et son complémentaire, hybridés entre eux.

Les protéines p68^{c-ets-1} (issue du gène *c-vts-1* de poulet) et p68^{v-ets} (dans laquelle les 3 mutations A, B et C sont présentes) sont synthétisées, *in vitro*, grâce

Auteurs	Sonde utilisée en ''retard sur gel''	Moyen de production des protéines	Protéines		Capacité de fixation à la sonde	Mg ²⁺
Leprince et al (1992)	PEA3 CGAGCA <u>GGAA</u> GTT	Bactéries Bl 21 (DE3)	(Poulet) p35 (p68 tronquée en N-terminal)	- c-Ets - v-Ets	+	+
Lim et al. (1992)	PEA3 TCGAGCA <u>GGAA</u> GTT GGACGT	Lysat de réticulocyte	(Poulet) p68	- c-Ets - v-Ets	+/-	-
Hagman et Grosschedl (1992)	(Promoteur mb-1)MuF2GAACA <u>GGAA</u> GTG	Lasatale réticulocyte	(souris) p63	- c-Ets - v-Ets	+/-	-
Wasylyk et Wasylyk (1992)	PEA3 TCGAGCA/C <u>GGAA</u> GTGACGTCGA	Bactéries Bl 21 (DE3)	(souris) p63	- c-Ets (entière) -ΔN 170 (semblable à la p35 de poulet)		+
Nye et al (1992)	Site de l'henhancer du MSV LTR ACC <u>GGAA</u> GCA	Lysat de réticulocyte	(Poulet) p68	- c-Ets - v-Ets	+/-	+

Tableau 4 : Comparaison des conditions utilisées et des résultats obtenus par différents groupes, en ce qui concerne la capacité de liaison à l'ADN des protéines c-Ets-1 et v-Ets.

au système d'expression en lysat de réticulocyte de lapin (système TNT de Promega) et à la T7 polymérase, à partir des vecteurs d'expression pSG5 dans lesquels ont été clonées les séquences codantes correspondantes. La synthèse des protéines est vérifiée et quantifiée par SDS-PAGE ("Sodium Dodecyl Sulfate-Poly Acrylamide Gel Electrophoresis": Electrophorèse en gel dénaturant de polyacrylamide-SDS).

L'oligonucléotide double-brin est marqué au $[\gamma^{32}P]$ -ATP par une réaction enzymatique en présence de kinase.

L'effet des conditions d'incubation sur la liaison à la sonde EBS de chacune de ces deux protéines a été testé par la technique de retard sur gel (voir matériel et méthodes, Soudant *et al.*, 1994). Les protéines sont incubées pendant 10 à 15 minutes dans un tampon de réaction de retard sur gel ("SB Buffer") contenant (+) ou non (-) 5mM de Mg²⁺ et des concentrations variables de DTT (<u>Dithiothreïtol</u>). Puis la sonde EBS est ajoutée et laissée en présence des protéines pendant 30 minutes avant électrophorèse.

Les figures R1 et R2 montrent respectivement les résultats obtenus avec la p68c-ets-1 d'une part et la p68v-ets d'autre part.

La première observation que nous avons pu faire est l'obtention d'un complexe protéine-sonde aussi bien avec la protéine v-Ets (Figure R2) qu'avec la protéine c-Ets-1 (Figure R1).

Par ailleurs, quelle que soit la protéine utilisée dans ces expériences, l'ajout de 5mM de Mg²⁺ diminue la liaison à la sonde EBS (Pistes 3, 5, 7, 9, 11, 13 des figures R1 et R2). La p68^{V-ets} semble toutefois être plus sensible puisque le différentiel, pour une même concentration de DTT, entre l'incubation avec (+) et sans (-) Mg²⁺ est plus important que celui qui est obtenu dans le cas de la p68^{C-ets-1}. Quant au DTT, c'est à la concentration de 1mM que la quantité maximale possible de complexes protéine-ADN formés de façon stable parait atteinte (Piste 8).

Ces deux expériences ne peuvent pas être comparées entre elles en ce qui concerne les capacités relatives des deux protéines à se fixer à l'ADN puisque, même si les quantités de protéines sont comparables, les temps d'autoradiographie des gels sont différents.

L'expérience présentée dans la figure R3 a par contre été réalisée dans des conditions permettant une analyse comparative. En effet, les mêmes quantités de protéines c-Ets-1 et v-Ets ont été incubées avec la sonde dans les différentes conditions expérimentales. Quelles que soient les conditions d'incubation étudiées ici, la fixation de la protéine p68^{v-ets} à la sonde EBS apparaît beaucoup moins importante que celle de la p68^{c-ets-1} (Comparaison des pistes 3 à 8 et 9 à 14).

Ces résultats ont été confirmés avec les mêmes protéines produites en

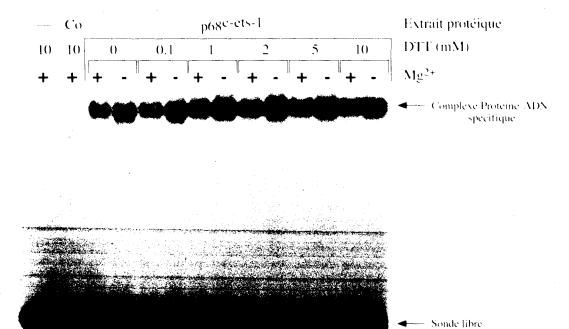


Figure R1 : effets des conditions d'incubations sur la liaison à l'ADN de la p68c-ets-1 sur une sonde "EBS"

9 10 11 12 13 14

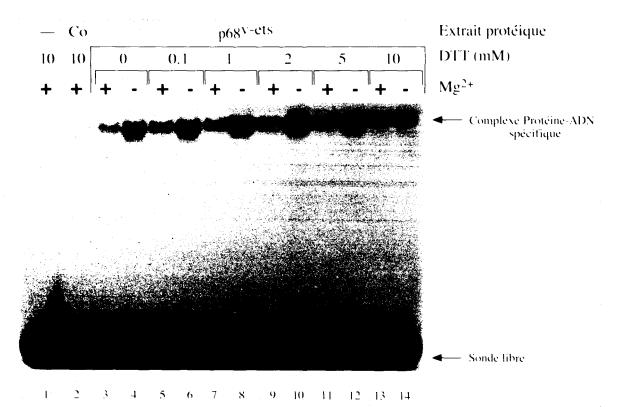


Figure R2: effets des conditions d'incubation sur la liaison à l'ADN de la p68^{v-ets} sur une sonde "EBS"

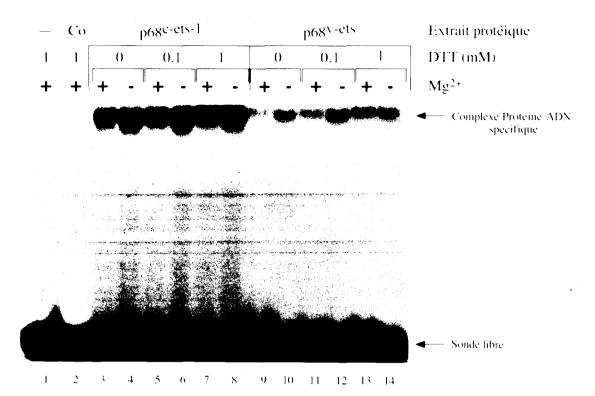


Figure R3 : analyse comparative des propriétés de liaison à l'ADN des protéines p68c-ets-1 et p68v-ets sur une sonde "EBS"

Légende des figures R1, R2 et R3: la protéine est synthétisée en lysat de réticulocyte (extraits des lignes 3 à 14) et incubée dans un tampon de retard sur gel contenant (+) ou non (-) 5 mM de Mg²⁺ et la concentration en DTT indiquée. Après incubation avec la sonde EBS, le tout est soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

La ligne 1 correspond à la sonde incubée avec aucun extrait protéique

La ligne 2 correspond à la sonde incubée avec un extrait de lysat de réticulocyte programmé avec le vecteur d'expression (pSG5) dépourvu de toute séquence codante (Co: Contrôle)

EBS: TCGAGCCGGAAGTGACGTCGA

système bactérien, inductible par l'IPTG, (BL21 (DE3) pLys S) à partir du vecteur d'expression pET dans lequel ces séquences codantes ont été clonées. Ce même système bactérien, inductible par l'IPTG, (BL21 (DE3) pLys S) à partir du vecteur d'expression pET dans lequel ces séquences codantes ont été clonées. Ce même système bactérien a été utilisé pour produire les protéines p35c-ets-1 et p35v-ets. Le polypeptide p35c-ets-1 représente une protéine c-Ets-1 tronquée pour les 174 premiers acides aminés amino-terminaux, ne gardant que les 311 résidus carboxy-terminaux parmi lesquels ceux qui composent le domaine ETS, et englobant les mutations A, B et C. La p35c-ets-1 a été montrée capable de se lier à une séquence qui porte le noyau GGAA: la séquence PEA3 (Leprince *et al.*, 1992). De la même façon que pour les protéines entières, nous avons toujours observé une meilleure fixation de la protéine p35c-ets-1, sur la sonde EBS, que de la protéine p35v-ets, que ce soit en présence ou en absence de Mg²⁺.

En ce qui concerne l'effet du Mg^{2+} sur la capacité de liaison à l'ADN des protéines $p68^{c-ets-1}$ et $p68^{v-ets}$, Wasylyk et Wasylyk (1993) ont obtenu les mêmes résultats que nous, c'est à dire une diminution de la fixation de v-Ets en présence de Mg^{2+} .

Ils ont également montré que l'extrémité carboxy-terminale de v-Ets rendait la protéine plus sensible à la phosphorylation par des kinases qui pourraient être, par exemple, des kinases calcium-dépendantes. A ce propos, nous avions remarqué que lorsque nous cherchions à synthétiser les protéines p35c-ets-1 et p35v-ets par le système d'expression en lysat de réticulocytes (système TNT de Promega), la forme protéique majoritaire de l'extrait contenant la p35^{v-ets} avait un "poids moléculaire apparent" en SDS-PAGE anormalement élevé par rapport à la p35c-ets-1. A ce propos, il a été montré que les protéines, exprimées en bactéries, qui possèdent l'extrémité carboxy-terminale de v-Ets migrent, en gel polyacrylamide-SDS, avec un poids apparent légèrement plus élevé que celles qui portent l'extrémité carboxyterminale de c-Ets (Leprince et al., 1992). Mais, dans notre cas, le différentiel de migration obtenu entre les protéines c-Ets et v-Ets exprimées en lysat de réticulocyte était plus important (Figure R4, pistes 1 et 2). L'utilisation d'un système eucaryote et le recul bibliographique sur les protéines c-Ets-1 suggéraient qu'il s'agissait d'une forme phosphorylée. Pour démontrer cela, des protéines p35c-ets-1 et p35v-ets ont été produites en lysat de réticulocyte, et immunoprécipitées par un anticorps antiets. Ensuite, des quantités similaires de protéines immunoprécipitées ont été traitées (Pistes 3 et 4) ou non (Pistes 1 et 2) par la phosphatase acide de pomme de terre. Cette phosphatase a été utilisée pour mettre en évidence les phénomènes de phosphorylation des protéines Ets-1 (Pognonec et al., 1988). Après migration en

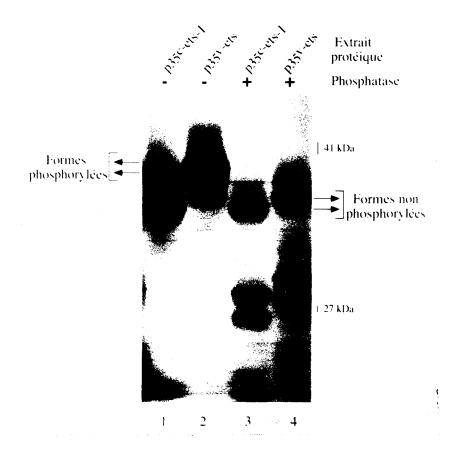


Figure R4: les protéines p35c-ets-1 et p35v-ets produites en système d'expression en lysat de réticulocyte de lapin sont présentes sous deux formes: phosphorylée ou non

Légende de la figure R4: les protéines sont synthétisées en lysat de réticulocyte de lapin en présence de [35S]-méthionine, puis les extraits sont immunoprécipités avec le sérum anti-ets-A, dirigé contre les acides aminés 354 à 409 de la p68c-ets-1 (Ghysdael et al., 1986) (lignes 1 et 2). On fait ensuite agir la phosphatase acide (à une concentration finale de 5 U/ml) pendant 45 minutes (lignes 3 et 4). Les extraits immunoprécipités, traités ou non, sont soumis à SDS-PAGE puis révélés par autoradiographie.

SDS-PAGE, on voit que les formes ayant une migration plus lente disparaissent après addition de la phosphatase. Ceci suggère donc qu'elles représentent des formes phosphorylées des protéines Ets-1 et v-Ets exprimées en système eucaryote de lysat de réticulocyte.

Comme peu de données étaient à l'époque connues en ce qui concerne la capacité de liaison spécifique à l'ADN des protéines Ets phosphorylées d'une part et que, d'autre part, ce phénomène risquait d'interférer avec la problématique étudiée par la suite d'autre part, nous avons décidé de réaliser les expériences suivantes avec des protéines p35 synthétisées en système bactérien. Dans ce système procaryote, les protéines ne semblent pas être modifiées par phosphorylation. Etant donné que la suite de notre étude reposait sur l'analyse comparative de la capacité de liaison à l'ADN de diverses protéines mutées ponctuellement, il était nécessaire de pouvoir quantifier correctement les quantités de protéines mises en jeu dans chaque réaction. L'existence d'une bande unique correspondant à la protéine p35 produite en système bactérien permet ceci.

2. Etude de la mutation ponctuelle I445V de l'oncogène v-ets, mutation B

L'approche du laboratoire, à propos de l'étude de la capacité de liaison à l'ADN des protéines Ets, s'est depuis longtemps basée sur l'étude de la caractérisation et de la pertinence biologique des mutations trouvées entre *c-ets-1* et *v-ets*.

Parmi les trois mutations A, B et C présentes dans *v-ets*, Leprince *et al.* (1992) ont montré que la mutation B (I445V) était la principale responsable de la diminution de liaison à l'ADN de la p35V-ets.

Elle se situe dans le domaine ETS de la protéine, domaine responsable de la liaison à l'ADN.

Elle affecte un résidu relativement bien conservé dans les différentes protéines de la famille Ets, mis à part dans les protéines GABP α ou D-Elg, et Spi-1 ou Spi-B (méthionine et acide glutamique).

De plus, l'isoleucine 445 est localisée seulement deux résidus en amont de la mutation ponctuelle (H447D) responsable de la thermosensibilité du virus E26 ts1.1 vis-à-vis de sa capacité de transformation de cellules érythroïdes (Golay *et al.*, 1988). Elle est aussi responsable de la liaison à l'ADN thermolabile de la protéine ts1.1 Ets correspondante (Kraut *et al.*, 1994).

La simple réversion de cette mutation B dans un virus E26 donne naissance à un mutant ayant perdu la majeure partie de ses propriétés oncogéniques (voir plus

loin).

Puisque cet acide aminé semble être localisé dans une zone importante pour la propriété principale de la protéine c-Ets-1, il se peut que ce soit par un effet structural que passent les modifications de fonctions observées dans les cas de mutations. D'autant plus que cette zone se situe au sein du motif HTH (Helix Turn Helix), jusqu'alors supposé par des programmes de prédiction de structure (Bosselut et al., 1993; Galson et al., 1993; Mavrothalassitis et al., 1994) et confirmé depuis peu par des analyses de structure par RMN et spectroscopie (Donaldson et al., 1994; Liang et al., 1994a; 1994b).

2.1. Contraintes structurales

A partir des connaissances que nous avions, nous avons décidé de nous intéresser à l'effet de la mutation B sur les activités de liaison à l'ADN et de transactivation de la protéine Ets-1 et de la protéine Ets-2, ce dernier étant le membre le plus proche de Ets-1 dans la famille Ets. Ce travail a fait l'objet de la publication :

[Soudant N., O. Albagli, P. Dhordain, A. Flourens, D. Stéhelin et D. Leprince; "A residue of the ETS domain mutated in the *v-ets* oncogene is essential for the DNA-binding and transactivating properties of the Ets-1 and Ets-2 proteins"; Nucleic Acids Research, 1994, vol. 22, 3871-3879] jointe.

A residue of the ETS domain mutated in the *v-ets* oncogene is essential for the DNA-binding and transactivating properties of the ETS-1 and ETS-2 proteins

Nathalie Soudant, Olivier Albagli, Philippe Dhordain, Anne Flourens, Dominique Stéhelin and Dominique Leprince*

Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, CNRS URA 1160, Institut Pasteur, 1 Rue Calmette, 59019 Lille Cédex, France

Received July 7, 1994; Accepted August 14, 1994

ABSTRACT

The c-ets-1 locus encodes two transcription factors, p54c-ets-1 and p68c-ets-1 that recognize purine-rich motifs. The v-ets oncogene of the avian retrovirus E26 differs from its cellular progenitor p68c-ets-1 by two amino acid substitutions (alanine 285 and isoleucine 445 in *c-ets-1* both substituted by valine in *v-ets*, mutations A and B respectively) and its carboxyterminal end (mutation C). The B mutation affects a well conserved residue in the carboxy-terminal 85 amino acids, ETS DNA-binding domain. To address the biological relevance of the B mutation found between v-ets and c-ets-1, we have randomly mutagenized isoleucine 445 of p68c-ets-1 by polymerase chain reaction. Using in vitro gel mobility shift assays, we show that this residue is crucial for the binding properties of c-ets-1 since the 12 mutations we have generated at this position, all diminish or even abolish the binding, to the 'optimized' Ets-1 binding site (EBS), of 35 kDa proteins corresponding to the 311 carboxyterminal residues of c-ets-1. Among them, substitutions of isoleucine to glutamic acid, glycine or proline have the highest inhibitory effects. Similar results were obtained when the same mutations were introduced either in full-length p68c-ets-1 protein or into a carboxyterminal polypeptide of 109 amino acids encompassing the ETS-domain which has previously been shown to display a very high binding activity as compared with the full-length protein. Consistent with the in vitro results, point mutations in p68c-ets-1 that decrease binding activity to EBS abrogate its ability to transactivate reporter plasmids carrying either the TPA Oncogene Response Unit of the Polyoma virus enhancer (TORU) or a sequence derived from the HTLV-1 LTR. Furthermore, as this isoleucine residue is rather well-conserved within the ETS gene family, we show that mutation of the corresponding isoleucine of c-ets-2 into glycine also abrogates its DNA-binding and hence, transactivating properties. Thus, the v-ets B mutation highlights the isoleucine 445 as an essential amino acid of the *c-ets-1* and *c-ets-2* DNA-binding domains.

INTRODUCTION

The first characterized member of the ETS gene family was the v-ets oncogene (1,2), one of the two cell-derived sequences, along with a truncated c-myb gene, transduced in the avian acute leukemia virus E26, which is able to transform erythroid and myeloid cells in vivo and in vitro (3-5). In addition to the cellular chicken locus c-ets-1 from which v-ets arose, a number of ETS genes have been identified in various species ranging from lower metazoan species to human (6,7 and references therein). Ets proteins are DNA-binding proteins and most of them are proved to be transcription factors acting either alone or in synergy with various cofactors to regulate numerous viral and cellular promoters (8,9 and references therein). To achieve this function, ETS family members interact in a sequence-specific manner with Ets-binding sites (referred to as EBS; 10,11). In most cases, the EBS are centered over a GGAA/T core sequence (10-12) but accept different flanking sequences, notably for Elf1 (13) or E74 (14). Strikingly, PU-1 which is most distantly related to the founder c-ets-1 gene, was shown to bind to and transactivate via a GGAA core but also in the immmunoglobulin J chain promoter through a motif centered over a AGAA core (15).

All Ets proteins share sequence homology in a domain of about 85 amino acids, called the ETS domain. This ETS domain is necessary and sufficient for the binding to EBS in gel retardation assays (12). Even though the DNA-binding domains studied so far exhibit a great deal of structural diversity, most of them use an α -helix to make sequence specific major-groove contacts (16). However, the ETS gene family represents a novel class of DNA-binding proteins since they produce a unique pattern of DNA contacts and display no structural homology with already described DNA-binding motifs such as the zinc finger, the basic leucine zipper, the helix—turn—helix (HTH), the helix—loop—helix or the recently described β -strand—turn— β -strand

motif (17). Clearly, such a fundamental issue will be solved by NMR analyses and/or crystal structure of an ETS domain bound to DNA. However, although far from the resolution of these powerful techniques, several approaches have been fruitful for our knowledge of the ETS domain. They fall into two distinct but complementary classes, namely, computer-assisted sequence alignments and structure predictions or site-specific mutagenesis.

Sequence alignments of the various ETS domains whose identities to ets-1 range from 98 to 37% highlight several invariant amino acids scattered all along the domain as well as clusters of high conservation. These include a highly conserved 10 aminoacids region rich in leucine residues and predicted to adopt an α -helix structure in the N-terminal and a basic region located in the C-terminal half of the domain (Fig. 1). The first identified similarity between the ETS domains was a repetition of tryptophan residues spaced by 17-18 amino acids and it was highly reminiscent of the one observed in the DNA-binding domain of Myb proteins (18). Recently, more sophisticated computer analyses with several ETS family members predicted two or three α -helices in the basic domain (19,20) in addition to the α -helix already described in the N-terminal domain (13). Together with methylation interference studies indicating that interaction between the ETS domain and DNA occurs in the major groove of the DNA helix (12), these analyses suggest that the ETS domain could adopt an HTH-like conformation (19-21). In another recent study, the HCA (Hydrophobic Cluster Analysis) method combined with known three-dimensional NMR data suggest that the ETS domain may be related to the Myb DNAbinding domain and possibly to the HMG (High Mobility Group) one (22). In that case, the ETS domain is likely to contain two HTH motifs.

Site-specific mutagenesis experiments have stressed the crucial role played by the HTH motif and specially by the 3' helix which is referred to as the CRIII motif (19,21). Mutations throughout

the ETS domain have a detrimental effect on binding activity but half of the mutations that reduce it below 10% of the original activity are clustered within the HTH motif. Furthermore, four residues namely lysine 379, lysine 381, arginine 391 and arginine 394 in the human ETS-1 protein absolutely required for the DNA-binding activity have been identified within this motif (19,21). Similarly, a single amino acid substitution in the ETS domain, lysine 388, alters core DNA-binding specificity of Ets-1 to that of the related transcription factors E74 and Elf1 (19). Taken together these data indicate that the HTH motif, and specially the CRIII region which contains lysine 388 and arginine 391 and 394, plays a key role in ETS domain recognition of the GGAA/T core motif.

Our approach has been slightly different. For a long time, we have been interested in the characterization and biological relevance of the mutations found between c-ets-1 and its viral activated counterpart, the E26 v-ets oncogene (23). In fact, it is generally admitted that these mutations should be important for the oncogenic activation process and thereby should affect crucial regions of the proto-oncogene (24). In addition to its fusion to the myb oncogene in the E26 P135gag-myb-ets protein, v-ets differs from c-ets-1 by two amino acid substitutions and the replacement of the last 13 C-terminal amino acids present in c-ets-1 by 16 residues encoded by the opposite strand of the c-ets-1 C-terminus in v-ets (25,26). One of these point mutations, hereafter named mutation B, is located in the ETS DNA-binding domain (Fig. 1). Although it can be considered as chemically conservative, the isoleucine 445 in c-ets-1 is replaced by a valine in *v-ets*; this mutation affects a residue well conserved in various Ets related proteins with a few noteworthy exceptions such as GABP α or D-Elg and Spi-1 or SpiB with a methionine and glutamic acid, respectively. Furthermore, this isoleucine to valine mutation at residue 445 (I445V) is located two residues upstream of the unique point mutation found in a mutant of E26, E26 ts

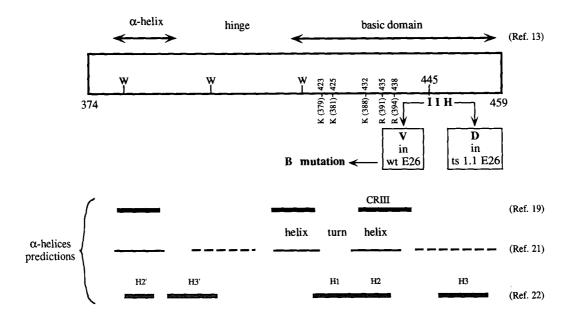


Figure 1. Structural features in the Ets-1 DNA binding domain. The Ets-1 DNA-binding domain (amino acids 374-459 in $p68^{c-ets-1}$) is represented as an open box. The three repeated tryptophan are represented. The amino acid sequence of the 445-447 region is highlighted with the mutations found in wt E26 (23) and in ts 1.1 E26 (27). Conserved regions and regions predicted to fold as an α -helix are indicated by arrows at the top and horizontal bars at the bottom of the figure, respectively. References of the original papers are indicated on the right. Localization of $p68^{c-ets-1}$ residues corresponding to essential lysine (K) and arginine (R) residues in the human Ets-1 protein (number in parentheses) (see Introduction and refs 19 and 21) is also shown.

1.1, that is temperative sensitive for erythroid cells transformation (27).

In this paper, we addressed the effect of the B mutation on the binding activities of various Ets-1 or Ets-2 proteins. We randomly mutagenized isoleucine 445 of p68^{c-ets-1} by PCR and thus demonstrated that mutation of this residue deeply affected the binding to EBS even in the context of a N-terminal truncated polypeptide of 109 amino acids encompassing the ETS domain. Our results shed new light on two important aspects of the Ets-1 proteins, namely the structure of its ETS domain and its oncogenic activation in the E26 virus.

MATERIALS AND METHODS

DNA manipulations

The pET p35ets-1 clone expressing the carboxy-terminal 311 amino acids of c-ets-1 has been previously described (28). To randomize the isoleucine 445, we performed PCR with the following oligonucleotides: a 5' (sense) oligonucleotide; 5'-TGGGAGTTCAAGCTTTCCGAT-3' corresponding to sequence around a unique HindIII site (underlined) in the p68c-ets-1 cDNA clone; a degenerate 3' (antisense) oligonucleotide containing an equimolar mixture of the four nucleotide precursors at codon 445 of c-ets-1; 5'-GCGCTTGCCGGCCGTCTTGT GGATNNNGTTCTTGTCGTAATA-3'. This oligonucleotide includes the 445 codon and a XmaIII site (underlined) which is the proximal restriction site. However, the pET expression vector contains a *Xma*III site in its back-bone. Thus, we first subcloned the HindIII-EcoRI fragment of the c-ets-1 cDNA clone (23) into the pUC vector yielding the pUC 3' ets-1 clone, which contain unique HindIII and XmaIII sites. The PCR product was digested by the HindIII and XmaIII restriction enzymes and cloned into the pUC 3' ets-1 clone digested by the same enzymes. After transfection in HB101 bacteria, all the obtained colonies were pooled and grown. Plasmid DNA prepared from this mixed population was digested by EcoRI and HindIII. The resulting 150 bp EcoRI-HindIII fragment was cloned into EcoRI-HindIII digested pET p35ets-1 clone. Then, DNA sequencing of plasmids obtained from different clones allows us to select 12 expression vectors carrying a single mutation at the 445 codon. They were named pET p35 I445X, where X represents the newly introduced

Constructs expressing wild-type or mutant ets-1 DNA-binding domains (residues 377-485) were obtained by PCR using as a template the DNA from the relevant pET p35 I445X clone and the following oligonucleotides: a 5' (sense); 5'-TTAA-CATATGGGA³⁷⁷CCCATCCAACTG-3' which creates a NdeI restriction site (underlined) and brings an initiation codon just upstream of c-ets-1 residue 377; a 3' (antisense): 5'-GGGGAATT CACTCATCAGCATCTGG, which creates an EcoRI site (underlined) just upstream of the natural termination codon of p68c-ets-1. Each PCR product was cut by the restriction enzymes NdeI and EcoRI and inserted into the EcoRI-NdeI digested pET5a expression vector to give pET DB I445X (see Fig. 3). To express mutant p68c-ets-1 in eukaryotic cells, the *HindIII-EcoRI* of the relevant pET p35 I445X clone was prepared and subcloned into the pSG5 p68c-ets-1 expression clone (36) partially digested by EcoRI and HindIII.

An Ile to Gly point mutation at the equivalent position in the chicken *c-ets-2* gene was introduced using the 3.1 kbp *c-ets-2* cDNA cloned into M13 and the oligonucleotide directed *in vitro* mutagenesis system (Amersham).

The oligonucleotide used corresponds to nucleotides 1306–1341 in the *c-ets-2* cDNA clone (44). Its sequence is (antisense orientation): 5'-GCGCTTCCCC GA C GTC TTG TGG AT GCC GTT CTT GTC3'. The newly introduced Gly codon (GCC since in antisense orientation) is underlined. We also create, without changing the encoded amino acid sequences, an *Aat*II restriction site (GAC GTC) which was used to screen for mutation prior to sequencing.

Finally, the *HpaI-BamHI* fragment from the mutated *c-ets-2* M13 clone was inserted into the *HpaI-BamHI* digested pSG5^{c-ets-2} expression clone.

For all the experiments described above, DNA sequencing was used to validate the construction.

Bacterial expression and Western blot

Various pET p35 I445X were expressed into the *Escherichia coli* strain, BL21(DE3) pLysS (29,45). Total protein extracts were prepared (28,46) and subjected to electrophoresis in SDS—PAGE and transferred to Immobilon-P membrane (Millipore). The membrane was treated with the rabbit polyclonal anti *ets*-A serum (30) first adsorbed against BL21 bacterial extracts. After washes in PBS containing 0.1% NP40, the membrane was incubated with 1.5 μ Ci of [125I] protein A (NEN) for 2 h, washed again and put in autoradiography to reveal Ets proteins.

In vitro expression and immunoprecipitation analyses

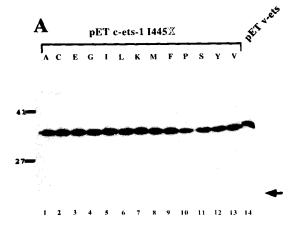
Rabbit reticulocyte lysates system (TNT system from Promega) were programmed with the relevant pET or pSG5 derived expression vector and T7 polymerase in the presence of [35 S]-methionine (40 μ Ci for each reaction) according to the manufacturer's instructions. Samples were then subjected to SDS-PAGE directly or after immunoprecipitation with specific antisera. In that case, they were incubated with anti *ets*-A or anti-DBD serum (Dhordain *et al.*, in preparation) and treated as previously described (30).

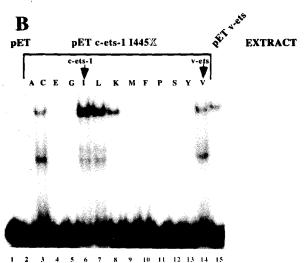
Gel mobility shift assays

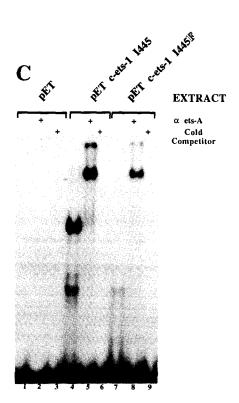
The EBS oligonucleotide used in DNA-binding assays [TCG-AGCCGGAAGTGACGTCGA] (11,31,32) was end-labeled with T4 polynucleotide kinase using $[\gamma^{-32}P]$ -ATP. Protein extracts were first incubated with 3 μ g of double-stranded poly(dI)poly(dC) (Pharmacia), 1 mM DTT for 15 min on ice in a final volume of 20 µl of SB buffer [20 mM Hepes pH 7.9; 50 mM NaCl, 0.1 mM EDTA; 20%(v/v) glycerol], then for 20 min on ice with an excess of ³²P-labeled double-stranded oligonucleotide. The DNA-protein complexes were then resolved on a 0.2×TBE/6% polyacrylamide gel pre-electrophoresed at room temperature for 60-90 min at 150 V. The gel was dried and autoradiographed. For pDB proteins, in the case of competition with non-labeled oligonucleotide, the proteins and the labeled probe were brought together at various time points and, after 20 min for each point, a 100-fold molar excess of cold probe was added to react 2-30 min with the labeled DNAprotein complexes before loading simultaneously on the gel.

Transient transfections, luciferase and CAT assays

NIH 3T3 and FEP cells were grown in D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) supplemented with 10% fetal calf serum. One microgram of either the reporter HTLV-1LTR-(6-2 57S + S) plasmid (HTLV-1 LTR) (37,47) or the reporter 3xPy B-tk-CAT (36) plasmid (TORU: TPA Oncogene Response Unit of the polyoma virus enhancer) was cotransfected using DOTAP







(Boehringer Mannheim) with 1 μ g of the *ets* expression plasmids and 1 μ g of the pSVLuc vector used as an internal control of transfection efficiency. The cells for CAT assays were harvested 48 h after transfection. Preparation of extracts and the enzyme assays were carried out as previously described (48).

RESULTS

DNA-binding properties of the various p35c-ets-1 I445X proteins

To determine the effects of the B mutation found between *v-ets* and c-ets-1, we have randomly mutagenized by PCR the corresponding isoleucine 445 in order to study the binding capacity of the resulting mutant Ets-1 proteins. To obtain these constructs, PCR reactions were performed with an oligonucleotide that encompasses the c-ets-1 sequence encoding the region of the B mutation and is totally randomized for the 445 codon. The pool of mutated fragments was then subcloned into a pET expression plasmid encoding a 35 kDa Ets-1 polypeptide. This polypeptide represents a c-ets-1 protein truncated for the first 174 amino-terminal residues and has been shown to bind a probe carrying a GGAA core sequence (28). A similar 35 kDa v-ets protein, p35v-ets, containing the A, B and C mutations, has also been described (28). p35c-ets-1, p35v-ets and 12 new 35 kDa proteins named p35 I445X (for 'isoleucine 445 substituted by amino acid X') in which isoleucine 445 was substituted by another amino acid were expressed in BL21(DE3) bacteria (29). Total bacterial proteins were extracted and subjected to gel electrophoresis to check for and to calibrate the expression of the expected p35 proteins by Western blot analyses with an ets-specific antiserum called 'anti-ets A' serum (28,30). This experiment allowed us to determine precisely the amount of Ets-1 polypeptide present in each bacterial extract (data not shown). Calibrated cell extracts were then subjected to the above-described procedure and accuracy of the calibration was verified by Western analysis with the same antibody (Fig. 2A). In addition to the expected 35 kDa protein, we noticed that another smaller protein

Figure 2. Sequence specific binding of the various I445X 35 kDa polypeptides to the EBS probe. (A) Calibration of the Ets-1 protein by Western blot analysis. Total proteins of the various pET c-ets-1 I445X and v-ets containing extracts were fractionated on SDS/PAGE gels, electrophoretically transferred on to nitrocellulose and submitted to immunoblot analysis using the anti-ets-A serum to determine the amount of Ets-1 specific polypeptide in each extract as previously described (data not shown) (28). Then, the same analysis was performed with calibrated amounts of total proteins. The pET v-ets clone expressing a 35 kDa polypeptide carrying the A, B and C mutations and displaying a lower mobility (lane 14) has been described (28). The amino acid replacing the isoleucine 445 in each clone is indicated above each lane using the single letter code. The arrow indicates the migration of a higher mobility band which is visible in most samples after long exposure (data not shown). This band presumably yields the higher mobility complex in the gel shift assay (see below). (B) Electromobility shift assays of the various 35 kDa I445X and v-ets protein. A 32P labeled EBS probe was incubated with equivalent amounts of total proteins from control pET extracts (lane 1) or calibrated amounts of p35 I445X and p35v-ets proteins as indicated above each lane. The I445 protein corresponding to c-ets-1 and the I445V protein corresponding to the substitution found in v-ets are highlighted by an arrowhead. (C) Competition experiments. A ^{32}P labeled EBS probe was incubated with equivalent amounts of total proteins from control pET extracts (lanes 1-3) or calibrated amounts of p35 I445 (lanes 4-6) and P35 I445 F (lanes 7-9). Competition was performed by adding either 2 µl of anti-ets-A serum (28) (lanes 2, 5 and 8) or a 200-fold molar excess of cold oligonucleotide (lanes 3, 6 and 9) as indicated by a + above these lanes.



of about 20 kDa can be observed in each lane on a longer exposure, with the notable exception of the p35^{v-ets} protein (see legend Fig. 2A; data not shown). This perhaps represents either a protein initiated on an internal AUG codon or a cleavage product, generated in the bacterial context. Sequence-specific DNA-binding of each p35 I445X protein to an 'optimized' Ets-1 binding site (EBS; 11,31,32) was analysed in gel mobility shift assays containing similar amounts of proteins, as defined by the Western blot. In order to reach an optimized binding, each binding reaction described in this work has been performed with buffer conditions re-examined, in comparison with those usually used in our laboratory. In particular, we have shown that, for a given protein, the addition of 5 mM Mg²⁺ always diminishes its specific-binding (33) and that a stronger binding was observed in the presence of 1 mM DTT (data not shown). Nevertheless, in all the conditions tested, we never observed a weaker binding of c-ets-1 proteins than the corresponding v-ets proteins (N.S., unpublished results). As previously shown (28), p35 I445 binds to the purine-rich motif in a sequence-specific manner since the DNA-protein complex can be further shifted following incubation with the ets-specific antiserum, anti-ets-A, and a 100-fold molar excess of cold probe competes for the binding of the probe to p35 I445 (Fig. 2C and data not shown). Turning now to the p35 I445X, excepted for the I445L which appears quite similar to I445 (Fig. 2B, lanes 6 and 7), they can be classified into three groups according to the residual binding activity they display. The I445C, I445K and I445V mutations fall into a first group exhibiting a residual ~30% DNA-binding activity of the wild-type c-ets-1 protein, p35 I445 (Fig. 2B, compare lane 6 with lanes 3, 8 and 14 respectively). The I445A, I445G, I445M, I445F, I445S and I445Y substitutions, represent a second group of mutations that show no significant DNAbinding activity. In fact, a very long exposure of the gel is necessary to detect a barely visible signal, characteristic in size of a 35 kDa protein-DNA complex (data not shown) as compared with no signal on the short exposure (Fig. 2B, lanes 2, 5, 9, 10, 12 and 13). Finally, the last group contains the I445E and I445P substitutions where no signal is observed regardless of the exposure time (Fig. 2B, lanes 4 and 11). For comparison, we also show that p35^{v-ets} that carries the three A, B and C (carboxy-terminal) mutations binds to the EBS probe but in a weaker manner than p35c-ets-1 (Fig. 2B, lane 15). Indeed, the binding affinity of the p35^{v-ets} protein is quite similar to the one displayed by the I445V protein carrying only the B mutation (Fig. 2B, compare lanes 14 and 15). A DNA-protein complex of higher mobility is observed in almost all cases where we observed a low mobility complex with the notable exception of the *v-ets* protein (Fig. 2B). This sequence-specific complex (Fig. 2C) presumably contains the smaller Ets-1 protein indicated in the Western blot analysis (Fig. 2A). Another notable exception is the I445F protein where a barely visible high mobility complex is seen in the absence of a low-mobility complex (Fig. 2B, lane 10 and 2C, lane 7). These observations prompted us to investigate the effect of the isoleucine substitution in other forms of c-ets-1 proteins, in particular in a more truncated form similar to the minimum ETS DNA-binding domain.

Effects of the same mutation introduced into an ETS-domain protein

The ETS family is characterized by a conserved domain of 85 amino acids: the ETS-domain, located in the carboxy-terminal part of Ets-1 proteins (10,11). In connection with that, a carboxy-

terminal chicken or murine Ets-1 polypeptide of 109 and 105 amino acids respectively, has been shown to be sufficient for the binding to EBS in gel mobility assays. Furthermore, such a polypeptide binds to DNA with a much higher binding affinity than the full-length protein (12,32,34). The observation of a higher mobility complex in the presence of a lower mobility complex (Fig. 2B, lanes 3, 6-8, and 14) or even in its absence as for the I445F protein (Fig. 2B, lane 10) suggested that the effect of some I445X mutations could be somehow compensated by the higher binding affinity of a truncated protein. To address this question, we introduced some of the isoleucine substitutions that induce the highest decrease of binding of p35 I445X, into pET plasmids expressing the 109 carboxy-terminal amino acids of chicken c-ets-1 to induce proteins named pDB I445X (Fig. 3A). In fact, thanks to its T7 responsive promoter, pET plasmids can direct the synthesis of proteins both in bacteria and in rabbit reticulocyte lysates. Thus, rabbit reticulocytes (Promega) were programmed with the pDB I445, I445E, I445G, I445P and I445V pET clones in presence of [35S]-methionine and immunoprecipitated with an ETS-domain specific antiserum named anti-DBD (Ph.D. et al., in preparation) (Fig. 3A). Briefly, this serum

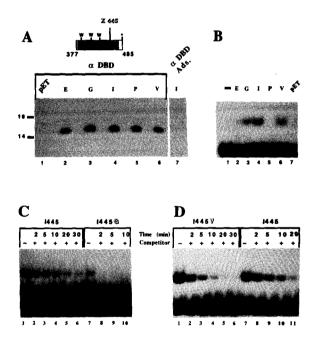


Figure 3. DNA-binding capacity of the pDB I445X proteins. (A) Immunoprecipitation analyses. Rabbit reticulocytes lysates programmed with the pET vector as a control (lane 1), pET plasmids expressing the DB I445X proteins (see the schematic drawing at the top of the figure) with the corresponding amino acid indicated above were immunoprecipitated with an anti-DNA-binding domain serum, α DBD (lanes 1-6). As a control the DB I445 programmed lysate was immunoprecipitated with the α DBD serum adsorbed against an excess of the immunogen used to immunize the rabbit (α DBD ads., lane 7). (B) Electrophoretic mobility shift. The EBS probe was incubated with no extract (lane 1) or with pDB I445X, carrying the above indicated substitution (lanes 2-6). As a further control the probe was also incubated with total proteins from control pET extracts (lane 7). (C) Dissociation rate of the I445 and I445G-EBS complexes. Calibrated amounts of pDB I445 and I445G proteins were incubated for 20 min on ice with ¹²P labeled and incubated with a 100-fold excess of cold competitor for the above indicated time. All the samples were time scheduled so that they can be loaded simultaneously on the gel. (D) Dissociation rate of the I445 and I445V-EBS complexes. Same experiment as above with the I445 and I445V proteins.

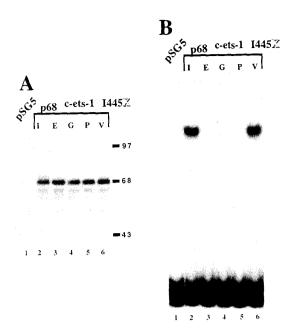


Figure 4. Synthesis of p68 I445X proteins *in vitro* and analysis of their DNA binding activity. (A) Expression in rabbit reticulocyte. Lysates were programmed with the pSG5 vector as a control (lane 1) or with the various pSG5 p68 I445X expressing vectors where X is glutamic acid (E; lane 3); glycine (G, lane 4); proline (P, lane 5) and valine (V, lane 6). The non-mutated p68c-ets-1 where X is isoleucine corresponds to lane 2. (B) DNA-binding activity of p68 I445X proteins. Calibrated amounts of proteins as defined by the above described experiment were incubated with the EBS probe and EMSA were performed as described in Materials and Methods. The nomenclature for the various p68 I445X proteins is exactly the same as in panel A.

directed against the ETS domain of the Erg proteins (35) crossreacts with its close relatives, the Fli-1, Ets-1 and Ets-2 proteins. Comparison of the DNA-binding capacity of each pDB I445X protein performed by gel mobility shift assay with calibrated amounts of proteins (Fig. 3B) was in good agreement with results obtained with the p35 I445X proteins. Similar classifications are obtained when each mutation is ranked according to its induced decrease in DNA-binding activity either in the p35 I445X or in the pDB I445X proteins. However, as already demonstrated for the truncated versus full-length Ets-1 proteins (12,32,34), each pDB I445X protein displays a higher binding affinity than the corresponding p35 I445X protein. This is particularly obvious for the pDB I445G, and to a lesser extent, pDB I445E proteins which bind to the EBS probe (Fig. 3B, lanes 2 and 3) in contrast to the p35 I445E and I445G proteins that do not bind it (Fig. 2B, lanes 4 and 5). A notable exception is the I445P mutation which abolishes the DNA-binding properties of the p35 I445P (Fig. 2B, lane 11) and of the 'high affinity' truncated protein, pDB I445P (Fig. 3B, lane 5).

A further indication of complex stability as a function of residue 445 was obtained by estimating the dissociation rate of complexes between the EBS oligonucleotide and various pDB Ets-1 polypeptides (Fig. 3C and D). The complex formed between pDB I445G and the EBS probe is much more rapidly competed with a 100-fold molar excess of cold probe than the complex formed between pDB I445 and the same probe. In this latter case, a residual labeled complex is still clearly visible after 30 min (Fig. 3C, lanes 1-6), whereas the complex formed between EBS and pDB I445G is totally dissociated after 2 min in the presence of

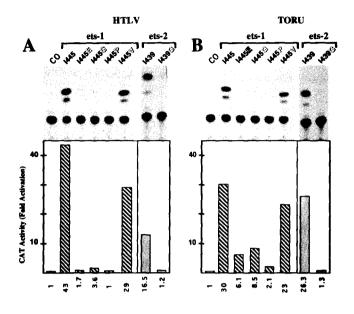


Figure 5. Transcriptional activation by p68c-ets-1, p58-64c-ets-2 and by point mutants derived thereof. Chicken embryo fibroblasts were transfected with the HTLV-1 LTR (6-2 57S+S) vector (37) in panel A or with the 3X Py-b-tk-CAT (TORU) vector (36) in panel B and with the pSG5 expression vector alone (Co); the p68c-ets-1 expression vector (I445), the above indicated I445X point mutants, the p58-64c-ets-2 expression vector (I439) and the I439G point mutant. Results of a typical experiment are presented. The histogram represents the average of two experiments.

competitor (Fig. 3C, lanes 7-10). A similar experiment performed with the pDB I445V shows that again its complex with the EBS probe is more rapidly competed than the complex formed by I445. However, in that case the difference between the two dissociation rates is smaller albeit significant (Fig. 3D). These experiments demonstrate that wild-type pDB I445 dissociates more slowly from the EBS probe than pDB I445V and at a greater extent than pDB I445G suggesting that these two proteins adopted a different conformation.

Correlation between binding and transactivating activities of mutated p68 I445X

We then analysed whether the effects of mutations also held true for full-length p68c-ets-1 proteins and if this effect on the DNAbinding properties reflected the ability of these proteins to activate transcription in transient transfection assays. We thus cloned into the pSG5 eukaryotic expression plasmid, p68c-ets-1 sequences, either with isoleucine 445 (wild type) or with I445X mutations that had been shown to decrease DNA-binding activity of p35 and pDB I445X peptides to EBS, i.e. the I445E, I445G and I445P substitutions, or with the substitution of isoleucine to valine corresponding to the B mutation in v-ets, the I445V. To analyse their effect on the DNA-binding activity, these mutated full-length p68 I445X proteins were expressed in rabbit reticulocyte lysates and subjected to SDS-PAGE (Fig. 4A). In perfect agreement with the above described results, p68c-ets-1 I445 and p68 I445V were able to bind to the EBS probe (Fig. 4B, lane 2 and 6), in contrast to p68 I445G (Fig. 4B, lane 4), for which a very weak signal was detected after long exposure (data not shown) and to p68 I445E and p68 I445P (Fig. 4B, lanes 3 and 5) which did not form any detectable complex even on a long exposure (data not

shown). The expression plasmids for the p68 I445X proteins were co-transfected, either in murine NIH 3T3 cells or in chicken embryo fibroblasts (CEF), together with a pSVLuc vector used as an internal control of transfection efficiency and with reporter plasmids carrying sequences derived either from the TPA Oncogene Response Unit of the polyoma virus enhancer (TORU) (36) or from the LTR of the HTLV-1 virus (HTLV-1 LTR) (37) in front of the CAT gene. Results demonstrated that the wildtype p68^{c-ets-1} I445 functioned as a transcriptional activator both of the HTLV-1 LTR in NIH 3T3 (sevenfold activation, data not shown) and in CEF (about 43-fold; Fig. 5A) and of the TORU in NIH 3T3 (fourfold; data not shown) and in CEF (30-fold, Fig. 5B). On the other hand, point mutations in p68c-ets-1 decreased slightly (p68 I445V) or dramatically (p68 I445G and particularly p68 I445E) or even abrogated (p68 I445P) the ability to transactivate via the same reporter plasmids (Fig. 5A and B). We also noticed the perfect correlation obtained between the in vitro DNA-binding activity and the in vivo transactivating experiments.

Effect of the mutation of this well-conserved amino acid in ck-Ets-2 protein

The isoleucine 445 of p68^{c-ets-1} is rather well-conserved into the ETS family, notably in ck-p58-64^{c-ets-2} proteins (11). As the amino acid change from Ile to Gly in p68c-ets-1 strongly decreases binding and transactivating properties, we wanted to determine the effect of the same mutation into the Ets-2 protein that shares close structural and functional similarities with Ets-1 protein (Albagli et al., submitted). For this purpose, Ile to Gly substitution was created in the ck-Ets-2 protein at the residue equivalent to isoleucine 445 in p68^{c-ets-1}, namely isoleucine 439, using the oligonucleotide-directed in vitro mutagenesis system (Amersham). Immunoprecipitation with the specific 'anti-ets A' serum performed as a control, revealed similar levels of expression of the wild-type and mutant proteins in transfected COS-1 cells (data not shown). As expected from the results obtained with the c-ets-1 protein, gel mobility shift assays demonstrated that p58-64^{c-ets-2} but not p58-64^{c-ets-2} I439G is able to bind the EBS probe (data not shown). Moreover, the wildtype p58-64^{c-ets-2} protein transactivates reporter plasmids carrying either TORU (26-fold activation) or HTLV-1 LTR (16-fold activation) in CEF, whereas the Ile to Gly substitution (I439G) abolishes the transactivating properties of the protein (Fig. 5A and B). These data demonstrate that this isoleucine residue plays an essential role in both Ets-1 and Ets-2 proteins.

DISCUSSION

In this paper, we demonstrated that the isoleucine 445 in the $p68^{c-ets-1}$ DNA binding domain is essential for the *in vitro* DNA-binding and as a consequence the *in vivo* transactivating properties of the *c-ets-1* and *c-ets-2* proteins. In fact, we observed a good correlation between *in vitro* DNA-binding to an EBS site and *in vivo* transactivating properties, indicating that the only function affected by I445X mutations is DNA-binding affinity. This residue is not included in one of the three regions of strong homology between known ETS domains, namely the N-terminal leucine rich region and the two regions which overlap with the two helices of the HTH motif (19-22). Nevertheless, isoleucine 445 is located seven residues downstream of the 3' border of this HTH motif. In fact, with the exception the more distantly related Spi-1 and Spi-b members, the HTH motif is followed by

a conserved 10 amino acid region characterized by a striking alternation of hydrophobic and charged residues among which five are consensus sequences for the ETS domain (8,11). These residues are three perfectly conserved hydrophobic tyrosine residues which according to the 'mpred' prediction method contribute to the 3' helix of the HTH motif (19); three variable although often charged residues; two hydrophobic residues including the well conserved I445; a variable residue and finally an invariant lysine residue. Mutagenesis analyses and structure predictions have stressed the role of the α helix in the CRIII region as the 'recognition helix', which would be docked in the DNA major groove (12,19). It is highly unlikely, although not totally ruled out, that the 10 amino acid region following the CRIII motif and including I445 would be also in direct contact with DNA. Rather, we propose, based on previously published observations and our results, that mutations in this region alter the structure of the ETS domain leading to a decreased DNA binding affinity. In particular, a four amino acid region centered around the I445 residue (444-447) appears crucial. Indeed, in their random mutagenesis of the human Ets-1 protein, Mavrothalassitis et al. (21) demonstrated that mutations affecting the DNA-binding affinity were scattered all along the domain. A notable exception was the region corresponding to residue 444-446 in p68^{c-ets-1} where a mutant affecting each of these three amino acids was isolated. Strikingly, the mutation affecting the I445-corresponding residue is a threonine which decreases the DNA-binding to 10-40% of its original activity. Taken together with our data, 14 point mutations encompassing most of the amino acid categories (i.e. acidic, hydrophobic) have thus been obtained for the I445 residue. The less detrimental mutations are the substitution of the I445 residue by amino acids with other aliphatic side chains, such as leucine or valine. It would be interesting to know if mutations of others conserved hydrophobic non-aromatic residues in this region would also affect the structure of the ETS domain and hence, its DNA binding affinity. Furthermore, the I446T substitution decreases the DNA-binding activity of the protein to 10% of that of the wild-type protein (21). This region, 444-447, can be considered as a 'hot spot' for mutations affecting the DNA-binding affinity presumably by inducing local conformational changes. Maybe the strongest argument in favor of this hypothesis is the point mutation affecting the residue 447. The screening for E26 mutants able to transform erythroid colonies at 37°C which could mature into erythrocytelike cells upon temperature shift for 2 days at 42°C, led to the isolation of the E26 ts 1.1 mutant (27). This mutant contains a single histidine to aspartic acid substitution in the DNA-binding domain affecting the residue equivalent to 447 in p68^{c-ets-1} (27). Recently, a ts 1.1 DNA-binding domain protein (amino acids 377-488) was shown to exhibit strong binding to a PEA3 probe at 22°C as compared with no detectable binding at 42°C (34,38). For comparison, similar *c-ets-1* or wt E26 DNA-binding domain proteins were not affected by such temperature shifts in the gel retardation assay incubation conditions. However, the inactivation of ts 1.1 v-ets DNA-binding at 42°C can be reversed if the binding reaction is back-shifted for at least 4 h at 22°C (38). These results strongly suggest that the 447 mutation induces a conformational change resulting in a loss of DNA-binding properties. Alternatively, this mutation could result into a change in DNA-binding specificity, although this hypothesis appears less likely. Furthermore, introduction of a similar point mutation into the ETS domain of Elk-1 renders the corresponding protein Elk D74 not only unable to interact efficiently to its cognate sequence (39) but, at elevated temperatures, also with a binary complex of the c-fos SRE and SRF (40).

In addition to its contribution to the general problem of interaction between ETS domains and DNA, isoleucine 445 raises an interesting question specific to *c-ets-I*, since it is mutated in the viral *v-ets* oncogene of the E26 virus. An emerging model for the oncogenic activation of the *c-ets-I* gene is to consider that *v-ets* is more promiscuous for its binding that *c-ets-I*. Indeed, the C-terminal change of *v-ets* allowed it not only to bind to sequences recognized by *c-ets-I* but also to bind to sequences not or weakly bound by *c-ets-I* (41). This implies that *v-ets* could induce transformation by transactivating promoters of genes with which *c-ets-I* could not interact. However, the participation in this transforming process of genes containing *c-ets-I* high affinity sites in their promoter cannot be totally ruled out.

The B mutation is important for the binding and transactivating properties of Ets-1 and Ets-2 proteins. Whereas numerous substitutions of the isoleucine 445 deeply impede the DNA-binding activity, the I445V B mutation found in v-ets is one among the few having the mildest effect since it preserves most of the ability to bind the EBS probe (Fig. 2). Perhaps, the B mutation could slightly decrease the binding of v-ets to optimized high affinity, as examplified by the EBS site (Fig. 2) whereas the C-terminal change would increase the binding to low affinity sites (41) thus cooperatively broadening the spectrum of v-ets recognized sequences. In fact, the crucial mutations that the v-erb-A DNA-binding domain has undergone render it more promiscuous than c-erb-A for its binding while reducing its affinity for the high affinity 'TRE' sequence (24,42).

However, turning back to ets, it must be stressed that our results as well as those concerning the C mutation (34,41,43), have been obtained with isolated Ets proteins and not in the context of the P135gag-myb-ets fusion protein. In fact, this protein, when expressed in reticulocytes lysates fails to recognize conventional Ets binding sites and does so only if it is preincubated with excess Myb binding sites (F.Lim, A.Marknell, N.Kraut, I.Sieweke and T.Graf, manuscript submitted). Clearly, the next challenge will be the characterization of Myb-Ets regulated genes important for immature erythroid cell (MEP) transformation since the promoter of such gene(s) should contain consensus Myb and Ets binding sites for the fusion protein, optimally arranged in terms of relative orientation and spacing. The analysis of the DNA-binding and transactivating properties of this promoter by various P135gag-myb-ets mutated proteins should clearly indicate the exact role of each mutation in the oncogenic activation of *c-ets-1*.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Drs J.Brady and A.Gégonne for the generous gift of the HLTV-1 reporter plasmid. We also thank Drs S.L.Hahn and B.Wasylyk and Dr T.Graf for communicating results prior to publication and for comments on this manuscript. The authors also thank C.Lagrou for his precious help in cell culture, Drs J.H.Chen and Y.de Launoit for critical reading of the manuscript, S.Ung for photographic work and N.Devassine for patient and excellent typing. This work is supported by funds from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC) and the Pasteur Institute of Lille.

REFERENCES

- Leprince, D., Gegonne, A., Coll, J., de Taisne, C., Schneeberger, A., Lagrou, C. and Stehelin, D. (1983). Nature, 306, 395-397.
- Nunn, M., Seeburg, P.H., Moscovici, C. and Duesberg, P.H. (1983). Nature, 306, 391-395.
- 3. Metz, T. and Graf, T. (1991). Genes Dev., 5, 369-380.
- 4. Metz, T. and Graf, T. (1991). Cell, 66, 95-105.
- Graf, T., McNagny, K., Brady, G. and Frampton, J. (1992). Cell, 70, 201-213.
- Lautenberger, J.A., Burdett, L.A., Gunnel, M.A., Qi, S., Watson, D.K., O'Brien, S.J. and Papas, T.S. (1992). Oncogene, 7, 1713-1719.
- Laudet, V., Niel, C., Duterque-Coquillaud, M., Leprince, D. and Stéhelin, D. (1993). Biochem. Biophys. Res. Commun., 190, 8-14.
- 8. Wasylyk, B., Hahn, S. and Giovane, A. (1993). Eur. J. Biochem., 211,
- 7-18.
 9. Janknecht, R. and Nordheim, A. (1993). Biochem. Biophys. Acta, 1155,
- 346-356.
 Karim, F.D., Urness, L.D., Thummel, C.S., Klemz, M.J., Mc Kercher, S.R., Celada, A., Van Beveren, C., Maki, R..A., Gunther, C.V., Nye, S.A. and Graves, B.J. (1990). *Genes Dev.*, 4, 1451-1453.
- 11. MacLeod, K., Leprince, D. and Stéhelin, D. (1992). TIBS, 17, 251-256.
- Nye, J.A., Petersen, J.M., Gunther, C.V., Jonsen, M.D. and Graves, B.J. (1992). Genes Dev., 6, 975-990.
- Wang, C-Y., Petryniak, B., Ho, I-C., Thompson, C.B. and Leiden, J.M. (1992). J. Exp. Med., 175, 1391–1399.
- 14. Urness, L.D. and Thummel, C.S. (1990). Cell, 63, 47-61.
- 15. Shin, M.K. and Koshland, M.E. (1993). Genes Dev., 7, 2006-2015.
- 16. Harrison, S.C. (1991). Nature, 353, 715-719.
- Liu, J., Sodeoka, M., Lane, W.S. and Verdine, G.S. (1994). Proc. Natl Acad. Sci. USA, 91, 908-912.
- 18. Anton, I.A. and Frampton, J. (1988). Nature, 336, 719.
- Bosselut, R., Levin, J., Adjadj, E. and Ghysdael, J. (1993). Nucleic Acids Res., 21, 5184-5191.
- Galson, D.L., Hensold, J.O., Bishop, T.R., Schalling, M., D'Andrea, A.D., Jones, C., Auron, P.E. and Housman, D.E. (1993). *Mol. Cell Biol.*, 13, 2929–2941.
- 21. Mavrothalassitis, G., Fisher, R.J., Smyth, F., Watson, D.K. and Papas, T.S. (1994). Oncogene, 9, 425-435.
- Laget, M.P., Callebault, I., de Launoit, Y., Stéhelin, D. and Mornon, J.P. (1993). Nucleic Acids Res., 25, 5987-5996.
- Leprince, D., Duterque-Coquillaud, M., Li, R.P., Henry, C., Flourens, A., Debuire, B. and Stehelin, D. (1988). J. Virol., 62, 3233-3241.
- 24. Lewin, B. (1991). Cell, 64, 303-312.
- 25. Lautenberger, J.A. and Papas, T.S. (1993). J. Virol., **67**, 610–612.
- Leprince, D., Crépieux, P., Laudet, V., Flourens, A. and Stéhelin, D. (1993). Virology, 194, 855–857.
- 27. Golay, J., Introna, M. and Graf, T. (1988). Cell, 55, 1147-1158.
- 28. Leprince, D., Crépieux, P. and Stehelin, D. (1992). Oncogene, 7, 9-17.
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. and Dubbendorf, J.W. (1990). Methods Enzymol., 185, 60-89.
- Ghysdael, J., Gégonne, A., Pognonec, P., Dernis, D., Leprince, D. and Stéhelin, D. (1986). *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 83, 1714–1718.
- Wasylyk, C., Gutman, A., Nicholson, R. and Wasylyk, B. (1991). *EMBO J.* 10, 1127-1134.
- 32. Wasylyk, C. and Wasylyk, B. (1992). Cell Growth Differ., 3, 617-625.
- 33. Wasylyk, C. and Wasylyk, B. (1993). Nucleic Acids Res., 21, 523-529.
- 34. Lim, F., Kraut, N., Frampton, J. and Graf, T. (1992). *EMBO J.*, 11, 643-652.
- Duterque-Coquillaud, M., Niel, C., Plaza, S. and Stéhelin, D. (1993). *Oncogene*, 8, 1865–1873.
- Wasylyk, B., Wasylyk, C., Flores, P., Bègue, A., Leprince, D. and Stéhelin, D. (1990). *Nature*, 346, 191–193.
- Gegonne, A., Punyammalee, B., Rabault, B., Bosselut, R., Seneca, S., Crabeel, M. and Ghysdael, J. (1992). New Biol., 4, 512-519.
- Kraut, N., Frampton, J., MacNagny, K. and Graf, T. (1994). Genes Dev., 8, 33-44.
- 39. Janknecht, R. and Nordheim, A. (1992). Nucleic Acids Res., 20, 3317-3324.
- Janknecht, R., Zinck, R., Enrst, W.H. and Nordheim, A. (1994) Oncogene,
 1273 1278.
- 41. Hahn, S.J.L. and Wasylyk, B. Oncogene (in press).
- Zenke, M., Munoz, A., Sap, A., Vennström, B. and Beug, H. (1991). Cell,
 1035 1049.
- Hagman, J. and Grosschedl, R. (1992). Proc. Natl Acad. Sci. USA, 89, 8889–8893.

- Boulukos, K.E., Pognonec, P., Begue, A., Galibert, F., Gesquiere, J.C., Stéhelin, D. and Ghysdael, J. (1988). EMBO J., 7, 697-705.
- 45. Gunther, C.V., Nye, J.A., Bryner, R.S. and Graves, B.J. (1990). *Genes Dev.*, 4, 667-679.
- Garcia, A., La Montagne, K., Reavis, D., Strober-Grässer, U. and Lipsick, J.S. (1991). Oncogene, 6, 265-273.
- Bosselut, R., Duvall, J.F., Gegonne, A., Bailly, M., Hemar, A., Brady, J. and Ghysdael, J. (1990). EMBO J., 9, 3137-3144.
- 48. Crépieux, P., Leprince, D., Flourens, A., Albagli, O., Ferreira, E. and Stéhelin D. (1993). *Gene Expression*, 3, 215-225.

Les principaux apports qui s'en dégagent peuvent être résumés comme suit.

Afin de déterminer s'il existait une contrainte structurale sur l'isoleucine en position 445 de la p68c-ets-1 (nous la nommerons I445) vis-à-vis de la fonction de la protéine, nous avons réalisé une mutagenèse aléatoire par PCR du codon correspondant (Figure 37). Les protéines mutantes p35 I445X (pour "isoleucine 445 substituée par l'acide aminé X") ont été obtenues par synthèse en système bactérien, à partir du vecteur d'expression pET dans lequel était clonée la séquence codante de la p35 portant le codon muté. Après vérification de l'expression et de la stabilité, et après calibration de la quantité des diverses protéines mutantes par "Western blot", leur capacité de liaison à la sonde EBS a été testée par la technique de retard sur gel (Figure 2 de l'article).

Mise à part la p35 I445L qui semble avoir une capacité de liaison à la séquence EBS semblable à celle de la protéine sauvage p35 I445, toutes les autres protéines mutantes montrent une diminution ou même une abolition de la capacité de liaison à EBS.

Il existe, dans certains extraits, des protéines de poids moléculaire plus faible qui correspondent vraisemblablement à des produits de clivage. Bien que ces produits soient quantitativement mineurs (et donc, très faiblement détectés en "western-blot") (Figure 2A de l'article), leur présence est révélée dans les expériences de retard sur gel, par leur affinité pour la sonde EBS (Figures 2B et 2C de l'article). En effet, avec certains extraits, on observe un complexe ADN-protéine de migration plus importante, qui peut donc contenir une protéine Ets-1 tronquée. Dans certains cas, l'intensité de ce complexe est proportionnellement plus importante que celui obtenu avec la protéine de pleine longueur. Cette observation est à corréler avec les expériences décrivant des polypeptides correspondant aux 109 ou 105 acides aminés carboxy-terminaux des protéines Ets-1 de poulet ou de souris. Ils ont été montrés capables de fixer l'ADN avec une meilleure affinité que la protéine entière. Nous avons donc voulu tester si, dans cette configuration, l'effet inhibiteur de certaines mutations I445X sur la liaison à l'ADN pouvait être compensé. Quelques mutations, et tout particulièrement certaines de celles présentant un effet inhibiteur important dans le contexte de la p35 (I445E, I445G et I445P) ont donc été introduites au sein d'une protéine qui représente le domaine ETS additionné des acides aminés carboxy-terminaux: pDB I445X. Dans ce contexte, l'effet de chacune de ces mutations conduit à une classification similaire à celle qui a été obtenue avec les p35 I445X, même si l'affinité de liaison est meilleure pour chaque pDB I445X (Figure 3 de l'article). Seule la pDB I445P montre une propriété de

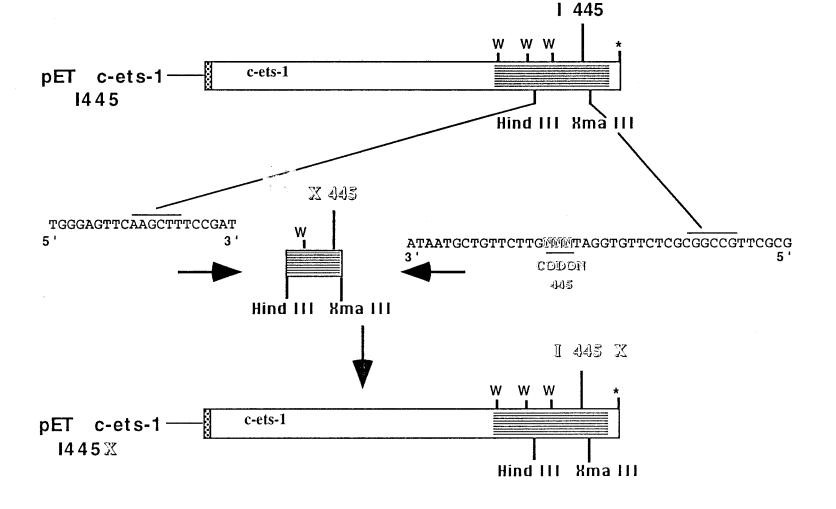


Figure 37 : Mutagenèse par PCR du résidu 445 de c-Ets-1 correspondant à la mutation B dans v-Ets

Nous avons utilisé un oligonucléotide totalement dégénéré pour le codon 445 (N)

Domaine ETS

liaison complètement abolie (Figure 3B, piste 5). Le différentiel de capacité entre la protéine pDB I445 et les pDB I445X est moins important que celui qui avait été observé avec les p35 I445X. Mais, par ailleurs, la dissociation du complexe pDB I445-ADN est moins rapide que celle des complexes pDB I445X-ADN (Figures 3C et 3D de l'article). Ceci suggère que les protéines mutantes adoptent des conformations distinctes.

L'effet de ces mutations sur les capacités de liaison (à EBS) et de transactivation (sur des séquences contenant un site Ets : TORU et HTVL-1 LTR) de la protéine entière p68c-ets-1 a ensuite été testé. Dans les systèmes utilisés, une bonne corrélation s'établit entre ces deux propriétés (Figures 4 et 5 de l'article).

Cet acide aminé est conservé dans presque tous les membres de la famille Ets, notamment dans les protéines de poulet p58-64^c-ets-2. De plus, les protéines Ets-1 et Ets-2 présentent des similitudes structurales et fonctionnelles. C'est pourquoi nous avons vérifié que la mutation du résidu isoleucine de Ets-2, correspondant à I445 de Ets-1, influence également la capacité de transactivation des protéines Ets-2 (Figure 5 de l'article).

Ainsi, ce résidu isoleucine joue un rôle essentiel dans les deux protéines, Ets-1 et Ets-2, vis-à-vis de leurs propriétés, d'où la notion de relation "structure-fonction".

2.2. Le codon ATC de l'isoleucine 445 aurait pu être muté en ... (Résultats en partie non publiés)

Pour se rapprocher de l'optique de départ qui ciblait l'étude de la mutation du codon ATC présent dans la séquence du gène c-cts-1 et, puisque un changement d'acide aminé peut être du à la modification d'un seul nucléotide sur les trois qui constituent le codon, nous avons étudié l'effet qui aurait pu être donné au domaine ETS de liaison à l'ADN de la protéine P135 Δ gag-myb-ets du virus E26 par les diverses possibilités de changement d'un des trois nucléotides de ce codon (Figure R5).

- 1^{er} nucléotide, l'isoleucine devient une valine (comme dans v-Ets)

 une phénylalanine

 ou une leucine
- 2ème nucléotide, l'isoleucine devient une sérine une asparagine

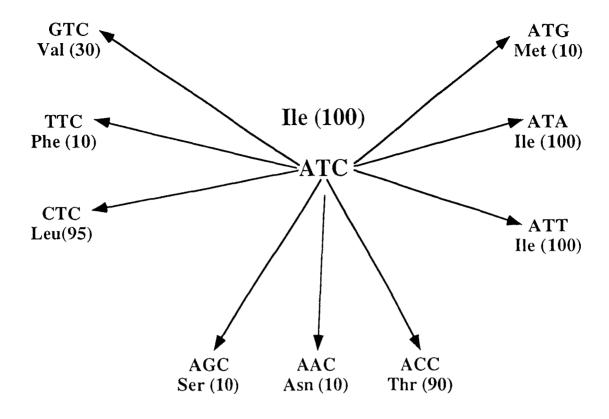


Figure R5 : Les possibilités de mutations à partir du codon ATC, si un seul nucléotide change.

Les chiffres représentent la capacité de liaison à la sonde EBS des diverses protéines p35 I445X mutées, en pourcentage, par rapport à la protéine non mutée (Ile)

ou une thréonine

- 3ème nucléotide, l'isoleucine devient une méthionine ou reste inchangée

Parmi ces mutations, les remplacements de l'isoleucine par l'asparagine ou la thréonine étaient les seuls que nous n'avons pas obtenus parmi les mutants décrits dans Soudant *et al.*, 1994. Puisqu'on ne connaissait pas les conséquences de telles mutations sur les propriétés de liaison à l'ADN de la protéine Ets-1, nous avons entrepris des mutagenèses dirigées par PCR afin d'obtenir spécifiquement ces deux possibilités de mutations ponctuelles. Une fois les mutations obtenues, les protéines synthétisées et la calibration par la technique de "Western blot" réalisée, la capacité de liaison à EBS de ces deux nouvelles protéines a été testée et comparée à celle de certaines protéines déjà connues (Ile et Lys) (Figure R6). La capacité de la p35 I445T (Piste 5) n'est que très légèrement diminuée, alors que celle de la p35 I445N (Piste 3) est presque réduite à néant comparée à la capacité de la p35 I445N (EBS est légèrement visualisé sur une longue exposition autoradiographique).

Ainsi, on peut dire que, quelque soit la mutation introduite au niveau de I445 par le virus E26 lors de sa genèse, la fonction de liaison à l'ADN du domaine ETS ainsi obtenu aurait toujours été diminuée par rapport à celle du domaine ETS de l'équivalent cellulaire (Figure R5). Ceci laisse penser que cet acide aminé a une influence sur la structure de la protéine et, par conséquent, sur sa fonction. Si on extrapole cela à la protéine v-Ets, pour laquelle on sait que c'est la mutation B qui est la principale responsable de la diminution importante de sa propriété de liaison à l'ADN, on peut dire que l'effet de la mutation ne pouvait aller que dans ce sens et qu'aucune possibilité d'augmentation de capacité de liaison n'était envisageable par mutation du résidu 445 de c-Ets-1.

Légende de la figure R6 :

R6A: les protéines des différents extraits protéiques pET c-ets-1 I445X sont séparées en SDS-PAGE, transférées sur nitrocellulose par électrophorèse, et soumises à une analyse immunologique avec le sérum anti-*ets*-A afin de déterminer la quantité de polypeptide Ets-1 spécifique dans chaque extrait.

L'acide aminé remplaçant l'isoleucine 445 dans chaque clone est indiqué au dessus de chaque ligne par le code à une lettre.

R6B: la sonde EBS marquée au ³²P est incubée avec des quantités équivalentes de chaque polypeptide. La ligne pET (vecteur "vide") sert de contrôle.

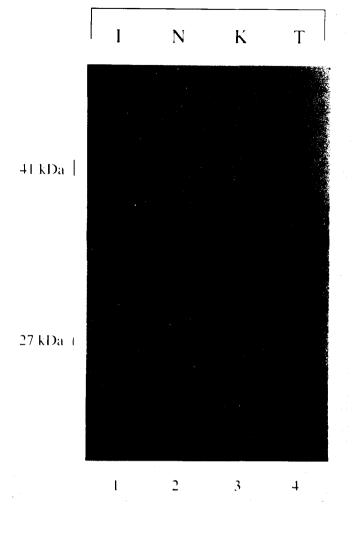


Figure R6A: calibration des protéines p35 I445X par la technique de "Western-blot"

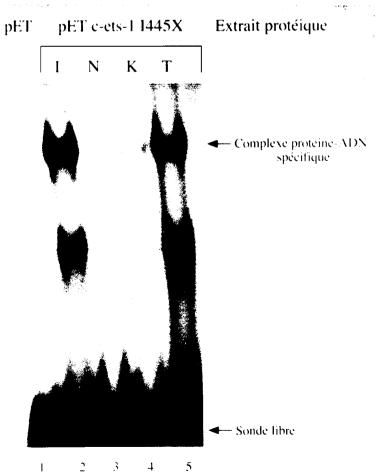


Figure R6B: retard sur gel de quelques protéines p35 I445X sur la sonde EBS

Sur une plus longue exposition autoradiographique, un faible signal est obtenu également avec la protéine p35 I445N

DISCUSSION ET RESULTATS EN COURS

1. La mutation B dans la protéine v-Ets

La toute première question que nous nous sommes posés repose sur l'effet de la mutation B présente dans la partie v-Ets de la protéine virale vis-à-vis de la fonction des protéines Ets.

Mais, comme nous l'avons vu dans les résultats, il fallait avant tout définir les conditions expérimentales qui semblaient être un facteur important dans les résultats obtenus. Notamment, l'ajout de Magnésium dans le tampon de réaction diminue, sans toutefois abolir, la capacité de liaison à l'ADN des protéines c-Ets-1 et v-Ets. D'autres auteurs ont également montré ceci (Wasylyk et Wasylyk, 1993). Ils ont déterminé que la partie responsable de cette inhibition est localisée en position amino-terminale par rapport au domaine ETS. La protéine v-Ets semble cependant être légèrement plus sensible à cet effet que la protéine c-Ets-1, ce qui pourrait suggérer que la partie carboxy-terminale, altérée dans v-Ets, intervient également dans ce phénomène, mais de façon moins importante. En réalité, Wasylyk et Wasylyk montrent une différence plus importante dans le comportement de ces deux protéines lorsqu'ils associent la BSA (sérum albumine bovine) au Mg²⁺. Leur interprétation repose sur l'hypothèse d'une conformation "ouverte" des protéines dont l'extrémité carboxy-terminale est altérée (comme dans v-Ets) ou tronquée (Figure 20). Cette conformation exposerait les chaînes latérales des acides aminés à des modifications engendrées par les composants des tampons de réaction.

Les agents oxydants (telle que la diamide) ou alkylants (tel que le NEM: Néthyl maléimide), dans cette conformation "ouverte", pourraient donc plus facilement atteindre les chaînes des acides aminés sur lesquels ils pourraient exercer leur effet négatif pour la liaison à l'ADN, notamment sur la cystéine 394. La réversion de la diminution de liaison, observée par l'effet oxydant, est obtenue par des agents réducteurs tels que le β-mercaptoéthanol ou le DTT (dithiothréitol) (Wasylyk et Wasylyk, 1993). Or, nous avons observé que l'ajout de DTT dans notre tampon de réaction augmentait légèrement le signal obtenu par la technique de retard sur gel. Cette augmentation peut être due à une plus grande quantité de complexes protéine-ADN formés ou à une meilleure stabilité de ceux-ci. En réalité, le DTT, à faible concentration (environ 1mM), protège les protéines des effets réducteurs ou oxydants causés par les agents du milieu de réaction ou les conditions de préparation des protéines, dans nos conditions expérimentales. Ces agents vont

réduire ou oxyder le DTT au lieu de détruire les ponts disulfures éventuels de la protéine ou atteindre les groupes sulphydryls libres, qui sont peut-être responsables d'interactions intramoléculaires ou de l'acquisition d'une conformation particulière de la protéine. A forte dose, par contre, le DTT est capable de casser les ponts disulfures, ce qui pourrait expliquer l'effet inhibiteur que nous avons observé pour des concentrations de DTT importantes.

Ce type de modulation de la liaison à l'ADN, ou même à l'ARN, par des mécanismes d'oxydo-réduction, a été décrit pour d'autres protéines telles que les facteurs de transcription Myb (Guehmann *et al.*, 1992) et Fos-Jun (Abate *et al.*, 1990) ou telle que la protéine NFKB (Toledano *et al.*, 1991) ou la protéine bactérienne OxyR (Storz *et al.*, 1990).

Ainsi, nous avons choisi de ne pas mettre de Mg²⁺ dans les expériences que nous avons réalisées, afin de nous placer dans les conditions optimales de fixation, que ce soit pour l'une ou l'autre des protéines. De plus, l'ajout de DTT (à une concentration de 1mM) protège les protéines des éventuels effets négatifs d'agents oxydants ou réducteurs, sur la capacité de liaison à l'ADN.

Les effets que nous venons de décrire semblent être influencés par la mutation C de l'extrémité carboxy-terminale, mais la mutation B joue également un rôle important. Même si la mutation C induit un changement de conformation de la protéine, d'où une sensibilité accrue aux agents du milieu, elle n'empêche pas la liaison à l'ADN mais la diminue sur certaines séquences cibles. Il semble également qu'elle puisse diminuer la sélectivité de la protéine v-Ets qui est alors capable de reconnaître des sites de forte affinité mais aussi des sites de faible affinité qui, eux, ne sont pas reconnus par c-Ets-1 (Hahn et Wasylyk, 1994). Par contre, le remplacement de l'isoleucine 445, cible de la mutation B, par divers acides aminés, induit toujours une diminution de la capacité de liaison à la séquence-cible et, par voie de conséquence, de la capacité de transactivation des protéines mutées, voire même une abolition dans certains cas.

Les structures bidimensionnelle et tridimensionnelle du domaine ETS des protéines Ets-1 et Fli-1 ont été décrites récemment (Donaldson et al., 1994 ; Liang et al., 1994a ; 1994b). Comme nous l'avons évoqué dans l'introduction, le domaine ETS est constitué de trois hélices α , formant un noyau hydrophobe, qui s'appuie sur "l'échafaudage" formé par les quatre brins d'un petit feuillet β antiparallèle. L'isoleucine 445 se localise juste après l'hélice de reconnaissance α 3 du motif HTH (\underline{h} elix- \underline{t} urn- \underline{h} elix) et fait donc partie du noyau hydrophobe du domaine ETS. Elle est également située juste en amont du brin β 3 du feuillet β (Figure 23). Comme nous

l'avions envisagé (voir discussion de Soudant *et al.*, 1994), elle n'est visiblement pas positionnée au niveau d'une zone qui interagit directement avec l'ADN mais plutôt entre deux zones qui semblent être "proches" de l'ADN (Figure 24).

A l'exception des protéines Spi-1 et Spi-b, membres les plus éloignés dans la famille, le motif HTH est suivi d'une région de 10 acides aminés caractérisée par une surprenante alternance de résidus hydrophobes et chargés. Ces résidus correspondent à trois résidus tyrosine conservés qui constituent l'extrémité de l'hélice $\alpha 3$; trois résidus variables mais souvent chargés; deux résidus hydrophobes dont l'isoleucine 445; un résidu variable; et, finalement, une lysine invariante. Des analyses de mutagenèse et les études de structure ont déterminé l'hélice $\alpha 3$ (aussi nommé motif CRIII) comme étant l'hélice de reconnaissance, alors que l'hélice $\alpha 2$ stabilise la position de $\alpha 3$. En plus de ces contacts de l'hélice $\alpha 3$ avec le grand sillon de l'ADN, la boucle $\alpha 2$ - $\alpha 3$ et la portion amino-terminale de $\alpha 1$, d'une part, et la boucle $\beta 3$ - $\beta 4$ d'autre part interagissent avec le petit sillon de l'ADN (Nye *et al.*, 1992; Bosselut *et al.*, 1993; Donaldson *et al.*, 1994; Liang *et al.*, 1994a; 1994b). La figure 24 tente de regrouper une partie des informations obtenues par mutagenèse et étude structurale.

L'isoleucine 445 fait partie d'une zone responsable de la dimérisation (en solution) du polypeptide correspondant au domaine ETS (Liang et al., 1994a). Lors de l'ajout d'ADN, la liaison entre le domaine ETS et l'ADN se fait cependant à l'état de monomère. Les expériences de mutagenèse aléatoire du domaine ETS de la protéine Ets-1 humaine, réalisées par Mavrothalassitis et al. (1994), démontrent que les mutations affectant l'affinité de liaison à l'ADN sont réparties sur tout le domaine. De plus, dans le domaine ETS des protéines c-Ets-1 identifiées chez les différentes espèces animales, on remarque une très bonne conservation de presque tous les acides aminés. Il existe sûrement une raison pour que la pression de sélection se fasse sur tous les acides aminés. On peut imaginer que c'est parce qu'ils sont tous plus ou moins importants à leur manière : les uns entrent en contact avec l'ADN, les autres dictent la conformation de la protéine. Il existe plus de divergence entre les différents membres de la famille qu'entre les versions d'une même protéine dans différentes espèces. Une explication pourrait être l'acquisition de fonctions quelque peu modifiées (sélectivité, affinité, spécificité) entre les différentes protéines alors que la fonction d'une protéine donnée doit être gardée au cours de l'évolution.

Cependant, une région de quatre acides aminés centrés autour de l'isoleucine 445 (444-447) paraît cruciale pour la liaison à l'ADN. Elle peut être considérée comme un "hot spot" pour les mutations affectant l'affinité de liaison à l'ADN,

probablement en induisant des changements locaux de conformation. En effet, une exception notable, dans les nombreuses mutations obtenues par Mavrothalassitis *et al.* (1994), correspond à la région 444-446 pour laquelle un mutant affectant chacun de ces trois acides aminés a été isolé. De plus, la mutation ponctuelle affectant le résidu 447 est responsable de la thermosensibilité d'une protéine ts1.1 Ets vis-à-vis de sa liaison à l'ADN. Cependant, l'inactivation de la liaison à 42°C peut être révertée si la réaction de liaison est replacée à 22°C (Kraut *et al.*, 1994). Ceci est tout à fait en faveur de l'induction d'un changement de conformation par la mutation.

L'isoleucine 445 semble jouer un rôle structural. Elle est certainement requise pour maintenir la conformation du domaine afin de conserver l'interface de liaison à l'ADN.

Si tel est le cas, nous pouvons essayer de proposer une explication de l'effet des substitutions obtenues dans notre travail. Il n'est pas surprenant que la valine, la leucine, la thréonine et peut-être la cystéine soient tolérées, de part leurs caractéristiques proches de celles de l'isoleucine (taille de la chaîne latérale ou polarité ou hydrophobicité). Pour la lysine, l'explication apparaît moins évidente, mais elle possède néanmoins une longue chaîne hydrophobe qui pourrait satisfaire aux contraintes "d'entassement" de ce résidu et permettre au groupe aminé chargé de contacter le solvant ou éventuellement l'ADN. Il semble également "normal" que le remplacement par l'acide glutamique (charge négative ensevelie), la glycine et l'alanine (sans chaîne latérale pour "l'entassement"), la proline (géométrie en arête), la phénylalanine et la tyrosine (noyau aromatique, d'où chaînes latérales trop importantes), et la sérine (polaire) diminuent la capacité de liaison à l'ADN de la protéine Ets. Il est probable que ces mutations déstabilisent le domaine ETS d'un point de vue thermodynamique. Nous avons montré que les protéines mutées sont correctement synthétisées. De plus, toutes ces protéines présentent une migration similaire en gel de polyacrylamide, ce qui suggère que leur conformation n'est pas altérée, par la présence de tel ou tel acide aminé, de façon significative et décelable dans ces conditions expérimentales. Rappelons à ce propos que le changement de l'extrémité carboxy-terminale se traduit, lui, par un changement de migration apparent dans les mêmes conditions expérimentales (Leprince et al., 1992 ; Soudant et al., 1994). Par conséquent, l'effet des mutations sur la liaison à l'ADN reflète probablement une perturbation structurale du motif HTH.

La protéine Ets-1, avec sa mutation B n'est pas le seul exemple pour lequel l'influence de mutations ponctuelles sur la conformation du domaine de liaison à l'ADN et, par conséquent, sur la capacité de liaison à l'ADN d'une protéine, a été

montré. En effet, des changements de conformation de la protéine p53 ont pu être mis en évidence grâce à l'utilisation d'anticorps monoclonaux capables de reconnaître le noyau du domaine de liaison à l'ADN de la protéine non mutée (de "type sauvage"), mais incapables d'atteindre l'épitope, normalement reconnu, dans des protéines mutées ponctuellement (en dehors de l'épitope) (Vojtesek *et al.*, 1995; Wolkowicz *et al.*, 1995). Les mutations ponctuelles identifiées dans les protéines mutées p53, dont la présence est corrélée à certaines tumeurs humaines, étendent leurs effets sur le "folding" du domaine de liaison à l'ADN.

Certaines mutations de cette protéine induisent un changement de spécificité de la séquence d'ADN reconnue, ou de l'affinité de la protéine mutante vis-à-vis de sites de plus ou moins forte affinité, soit en supprimant les contacts protéine-ADN importants, soit, indirectement, en altérant la conformation de la protéine (Niewolik et al., 1995). Certaines de ces mutations, qui abolissent complètement la liaison de la protéine p53 à l'ADN, affectent des acides aminés qui sont engagés dans les contacts directs avec l'ADN, comme cela a été montré par les études structurales. Une autre de ces mutations est localisée dans le "sandwich" du feuillet β, très proche de l'interface protéine-ADN, et semble modifier la conformation de la protéine. D'autres mutations, qui modifient également la conformation, sont localisées dans le feuillet β lui-même ou dans la boucle située entre le feuillet β et l'hélice H1 du motif de reconnaissance à l'ADN. Dans ces deux cas, elles sont disposées dans la proximité de l'interface protéine-ADN (Niewolik et al., 1995). Il est tentant de comparer ceci avec la mutation B du domaine de liaison à l'ADN de la protéine Ets. De plus, comme la mutation B qui a été isolée dans un contexte tumoral, ces mutations de la p53 ont été identifiées dans des tumeurs humaines.

Pour certaines protéines, il est connu que le fait de se lier à l'ADN induit un changement de structure. Ceci peut même être nécessaire pour que la protéine devienne capable de réguler la transcription. C'est le cas de la sous-unité p50 du complexe NFKB. Elle n'active la transcription de gènes-cibles que lorsqu'elle est fixée à certains motifs KB. C'est un moyen de spécificité d'action supplémentaire par rapport à la reconnaissance de sites (Fujita *et al.*, 1992). Le changement de conformation du domaine POU de la protéine Oct-1 après fixation à l'ADN permet quant à lui l'interaction protéine-protéine de Oct-1 avec la protéine Vmw65 de VP16 (Walker *et al.*, 1994).

Même si aucun changement de structure du domaine ETS de Fli-1, suite à la fixation à l'ADN, n'a pu être montré par les études de structure tridimensionnelle (Liang *et al.*, 1994b), il n'est pas impossible que la structure de la protéine entière soit

sujette à des modifications structurales. L'idée est d'ailleurs évoquée par Hahn et Wasylyk (1994) qui supposent que la protéine c-Ets-1 subit une modification de structure quand elle reconnaît un site de "forte affinité" afin de se trouver dans une conformation "ouverte".

Niewolik *et al.* (1995) émettent l'hypothèse que les protéines p53 mutées adoptent des conformations différentes de celle que possède la p53 "sauvage" lorsqu'elle se fixe à l'ADN, ou encore, qu'il existe une différence dans les nucléotides contactés par la protéine sauvage d'une part et les protéines mutantes d'autre part. Ceci expliquerait les différences d'affinité et de spécificité des protéines vis-à-vis des séquences-cibles.

Jusqu'à présent, l'effet de la mutation B n'a été testé que dans des systèmes *in vitro* ou de culture cellulaire (transfection transitoire). Cependant, il peut être intéressant de connaître son effet dans un contexte plus physiologique.

Deux systèmes biologiques nous ont paru intéressant à ce propos :

- l'introduction d'une mutation du résidu 445 dans une protéine Ets-2 et l'étude du phénotype provoqué, chez des souris transgéniques, par une telle construction.
- l'introduction d'une mutation du résidu 445 dans un mutant de E26 de type gag-myb-c-ets-1.

Comme nous l'avons décrit dans l'introduction, Sumarsono *et al.* (Présentation au congrès de "Frederick 1994") ont généré des lignées de souris transgéniques sur-exprimant un gène *ets-2* normal. Ils ont observé, chez ces souris, des anomalies similaires aux phénotypes des souris trisomiques pour le chromosome 16 (synténique pour le chromosome humain 21), et aux phénotypes des individus humains atteints de "Down Syndrome" (DS). La présence de trois copies du gène *ets-2*, localisé en 21q22 chez l'Homme, a été associée au phénotype DS occasionné par des trisomies 21 partielles (Sacchi *et al.*, 1986 ; 1988a ; 1988b ; Rosenthal *et al.*, 1987). Toutes ces observations suggèrent que la sur-expression de *ets-2* pourrait être responsable d'une partie des anomalies phénotypiques impliquées dans le DS.

Nous avons donc entamé une collaboration avec le groupe du Dr. Kola (Institut de la Reproduction et du Développement- Université Monash- Australie). Nous avons réalisé la mutagenèse du codon de l'isoleucine (correspondante à I445 de la p68c-ets-1) en codon "glycine", dans le gène ets-2 de souris ("oligonucléotide-directed in vitro mutagenesis system"/ Amersham). Ce gène ets-2, possédant ainsi une mutation ponctuelle dans une zone importante du domaine de liaison à

l'ADN, a été cloné dans le vecteur qui a permis à l'équipe de Kola d'entreprendre la réalisation de souris transgéniques. Les expériences de transgenèse sont actuellement en cours.

Ce type d'expérience va permettre d'obtenir des informations dans deux domaines.

Le premier sera l'importance de cet acide aminé, dans un contexte physiologique, sur la fonction du gène.

Par ailleurs, cette expérience de transgenèse permettra peut-être d'avancer dans la compréhension du mécanisme d'action mis en jeu lors de la sur-expression du gène *ets-*2 vis-à-vis des anomalies observées tant chez la souris que chez l'Homme.

L'effet de la sur-expression de *ets-2* pourrait passer par une transactivation anormale de gènes-cibles. Ceci pourrait être dû à la fixation d'une quantité plus importante de la protéine Ets-2 sur les séquences-cibles, habituellement reconnues, présentes dans les régions régulatrices de la transcription des gènes-cibles de Ets-2, ou même sur des séquences de faible affinité, habituellement "ignorées" par rapport aux séquences de haute affinité. De plus, *ets-2* va être exprimé de manière inadéquate dans toutes les cellules de ces souris puisqu'il est sous le contrôle d'un promoteur fort qui n'est pas tissu-spécifique. Ainsi, les cellules dans lesquelles Ets-2 ne s'exprime pas normalement, soit de par leur appartenance à un tissu donné, soit de par leur état de prolifération ou de différenciation, vont quand même sur-exprimer *ets-2*, qui régulera la transcription de ses gènes-cibles. Dans ce cas, la sur-expression du gène *ets-2* muté, codant une protéine qui possède une fonction de liaison à l'ADN presque totalement abolie, ne devrait pas engendrer d'anomalies chez les souris transgéniques.

Une autre hypothèse serait que l'effet de la sur-expression de *cts-2* passe par un effet de "squelching" de protéines capables d'interagir avec la protéine Ets-2. La quantité anormalement élevée de protéine Ets-2 dans les cellules impliquerait "l'emprisonnement" de protéines nucléaires habituellement responsables de la régulation de la transcription de leurs propres gènes-cibles. Ce mécanisme indirect serait alors tout à fait possible avec une protéine Ets-2 mutée pour un seul acide aminé, et les souris transgéniques auraient alors le même phénotype que celles qui sur-expriment la protéine Ets-2 non mutée. A moins que les interactions protéine-protéine se fassent au niveau du domaine de liaison à l'ADN et que la structure de la protéine, dans cette zone, soit modifiée de façon à empêcher ces interactions. Il faudrait, pour qu'aucune anomalie n'apparaisse, que toutes les interactions impliquant un phénomène de "squelching" lors de la sur-expression de *ets-2* se

fassent au niveau de ce domaine, ce qui est peu probable, d'autant plus qu'il existe, dans la protéine Ets-2, d'autres régions qui présentent le type de structures souvent impliquées dans des interactions intra- et intermoléculaires.

Il se peut également que les deux mécanismes proposés ici interviennent.

2. Propriétés oncogéniques de E26

Mis à part l'étude de la liaison à l'ADN de la protéine v-Ets, des équipes se sont penchées sur l'autre fonction de la protéine qui consiste en la capacité de régulation de la transcription. Il semble que v-Ets soit moins efficace que c-Ets-1 pour la transactivation *via* le motif PEA3 (un site Ets). Wasylyk et Wasylyk (1992) montrent que la cause de cette inefficacité repose sur la diminution de liaison à l'ADN de v-Ets par rapport à c-Ets-1. Lim *vt al.* (1992) suggèrent que la diminution de stabilité de v-Ets par rapport à c-Ets-1, dans les cellules, expliquerait la plus faible transactivation. Par contre, v-Ets et c-Ets-1 sont toutes les deux capables d'activer les promoteurs des gènes de stromélysine et collagénase (Wasylyk et Wasylyk, 1992). Cet effet est indépendant de la liaison de v-Ets à un site Ets mais semble plutôt être dépendant de la présence d'un site AP-1, sans que celui-ci soit reconnu par la protéine v-Ets. Il se peut que v-Ets induise l'activation des gènes endogènes *fos* et *jun* ou encore que v-Ets interagisse avec d'autres facteurs et stimule ainsi la transcription de gènes dont les produits vont affecter l'activité AP-1.

Il se peut que le mécanisme utilisé dans ce cas soit également en partie responsable de la transformation par l'oncoprotéine v-Ets suite à l'activation du complexe AP-1 de manière inadéquate.

Une autre hypothèse pour la capacité de transformation de la protéine v-Ets repose sur la démonstration d'une sélectivité de v-Ets, vis-à-vis des séquences-cibles, moins stricte par rapport à celle de la protéine cellulaire c-Ets-1 (Hahn et Wasylyk, 1994). v-Ets pourrait entrer en compétition avec c-Ets-1, ou même d'autres protéines de la famille Ets, pour la fixation sur certains sites présents dans des promoteurs. Il se peut que v-Ets transforme les cellules en conséquence de sa fixation à des séquences-cibles de faible affinité qui n'interagissent pas avec c-Ets-1 dans des conditions normales.

Mais, même si v-Ets est capable de transformer les cellules en culture, la fusion à v-Myb est indispensable pour induire des leucémies chez les animaux (Metz et Graf, 1991b). De même, d'autres membres de la famille ont des propriétés de transformation de diverses cellules et des propriétés oncogéniques. Ils présentent des caractéristiques qui suggèrent qu'ils agissent par différents mécanismes.

Beaucoup d'arguments provenant des analyses des activités transformantes du virus E26 indiquent que la protéine virale P135Δgag-myb-ets n'est pas seulement l'addition de domaines dont les fonctions sont déjà connues dans les protéines d'origine cellulaire. Visiblement, il y a création de fonctions supplémentaires qui interviennent vraisemblablement par des voies génétiques différentes dans les cellules infectées et transformées. C'est pourquoi, si l'étude des mutations virales est réalisée dans le contexte de la protéine virale, elle apportera certainement plus d'informations que dans le contexte de la protéine v-Ets isolée.

Le rôle de v-Ets dans la protéine de fusion a été étudié entre autres dans des cellules transformées par le virus E26 ts1.1 dont nous avons parlé précédemment, et dont la seule mutation par rapport au virus E26 réside dans la substitution d'une histidine en acide aspartique, dans le domaine de liaison à l'ADN, deux acides aminés en aval de la mutation B. Les résultats obtenus avec ce virus, ainsi que la démonstration du caractère thermosensible de la protéine ts1.1 Ets, indiquent que le domaine de liaison à l'ADN est impliqué dans le régulation des gènes nécessaires au maintien de l'arrêt de différenciation des cellules transformées par E26, probablement par liaison directe à des séquences régulatrices de gènes-cibles spécifiques.

Nous avons donc essayé de tester la capacité de liaison à l'ADN de la protéine P135 Δ gag-myb-ets sur certaines séquences. Nous savions, à l'époque, que la régulation de la transcription des gènes *mim-1* et *GATA-1* était perturbée suite à l'expression de la protéine virale dans les cellules en culture, et que des membres des familles Myb et Ets étaient capables de réguler leur expression par transactivation de leur promoteur. C'est pourquoi, nous avons choisi de réaliser des expériences de retard sur gel sur des sondes oligonucléotidiques représentant les séquences reconnues par des protéines Ets ou Myb dans ces promoteurs, ainsi que la séquence EBS que nous avions déjà utilisée dans nos expériences précédentes.

EBS: TCGAGCC<u>GGAA</u>GTGACGTCGA séquence optimisée (Wasylyk et Wasylyk, 1992)

mim-1 (A): TCGACACATTATAACGGTTTTTTAGC issue du promoteur du gène mim-1 (Ness et al., 1989)

"palindrome": CTTCGAGGAAGGGCACAGTGCCTTCCTTT issue du promoteur du gène *GATA-1* (Seth *et al.,* 1993)

Afin de tester l'effet des mutations virales de la partie v-Ets, notamment celle qui se trouve dans le domaine de liaison à l'ADN, sur l'éventuelle capacité de liaison de la protéine P135, nous avons réalisé la construction de vecteurs permettant l'expression de protéines P135 dans lesquelles les mutations ont été révertées. La protéine virale est notée P135 ABC puisqu'elle possède les trois mutations, alors que la protéine dans laquelle elles ont été révertées est nommée P135 OOO. Les intermédiaires sont notées P135 A ou O, B ou O, C ou O. Une dernière construction, P135 O G445 O, a été faite en insérant la mutation de l'isoleucine (445 de p68c-ets-1) en glycine, substitution qui abolit les capacités de liaison à l'ADN et de transactivation des protéines Ets-1 et Ets-2.

Cependant, aucun complexe n'a pu être observé entre les différentes protéines P135 produites en lysat de réticulocyte de lapin et les sondes citées. En fait, Lim et al. (présentation au congrès de "Frederick 1993") avaient montré que la protéine P135 ABC devenait capable de reconnaître un site de fixation Ets conventionnel seulement si elle était préalablement incubée avec un excès moléculaire de sites de liaison Myb. Cependant, ce type de résultat n'a pas encore été publié. Nous n'avons pas réussi à obtenir de complexe en utilisant leurs conditions expérimentales.

A partir des constructions que nous avions réalisées, nous avons également testé la capacité de transactivation des protéines P135 ABC/OOO et P135 OGO dans des expériences classiques de transfection transitoire avec des éléments de réponse clonés en amont de gènes "rapporteurs" ("CAT-assay" ou "Test Luciférase", selon le plasmide dans lequel était clonée la séquence testée) dans les cellules Hela. Là encore, nous nous sommes basés sur les connaissances de l'époque:

- le promoteur minimum (-240 pb) du gène *mim-1* cloné devant le gène de la luciférase nous a été gracieusement fourni par le Dr. A. Leutz (Ness *et al.*, 1989).
- le promoteur du gène *GATA-1* (pGATp1) cloné dans le vecteur pCAT basic nous a également été fourni, par le Dr. G. Felsenfeld (Aurigemma *et al.*, 1992).
- la construction pBLCAT333 contenant trois copies du motif EBS reconnu par la protéine Ets-1 du promoteur de *GATA-1* placées devant le promoteur Tk, suivi du gène CAT (<u>C</u>hloramphenicol <u>A</u>cetyl <u>T</u>ransferase) nous a été donnée par le Dr. A. Seth (Seth *et al.*, 1993).

Toutes les protéines testées sont capables de transactiver ces trois constructions. Cependant, aucun message clair ne peut être tiré en ce qui concerne l'effet de l'une ou l'autre des mutations sur la propriété de transactivation de ces différentes constructions.

Ceci peut s'expliquer par le fait que ces gènes-cibles n'interviennent sûrement pas de façon très importante dans la transformation par le virus E26. On ne connaît d'ailleurs pas le ou les site(s), ou les combinatoires de sites" Myb et/ou Ets qui permettent la régulation par la protéine virale P135, ni même ses gènes-cibles réels. Un candidat putatif, le gène rem-1 (pour "regulated by Ets in MEPs"), a été récemment isolé (Kraut et al., 1995). Son expression est directement liée à la fonctionnalité du domaine ETS de la P135Δgag-myb-ets. Le gène rem-1 code une protéine qui contient trois motifs "EF-hand", caractéristiques de la famille des protéines fixant le calcium. Les auteurs supposent que la protéine Rem-1 est un lien entre Ets et une voie de transduction de signaux extra-cellulaires, dépendante du calcium. Mais, en réalité, Rem-1 ne suffit pas à elle seule pour bloquer la différenciation comme le fait la protéine virale.

Il faudrait être en possession d'un gène spécifiquement activé par la protéine virale et directement responsable de la transformation, pour pouvoir faire une corrélation entre la capacité de transactivation des différentes P135 ABC/OOO et l'effet de chacune des mutations d'une part, et la capacité de transformation du virus d'autre part.

En attendant la caractérisation d'un tel promoteur et puisque nous ne pouvions pas avancer plus dans ce type d'approche, nous avons entrepris l'étude de l'effet de la mutation B sur le pouvoir transformant du virus, en collaboration avec l'équipe de T. Graf (EMBL, Heidelberg).

Puisque les premiers isolats viraux ont été perdus, on ne pourra jamais connaître avec certitude les étapes de formation du virus E26, d'autant plus qu'il y en a eu vraisemblablement plusieurs (Ivanov et al., 1962). Une chose est sure, c'est que la mutation C est apparue dès que le gène c-ets-1 a été transduit par le virus, que le gène v-myb soit déjà présent ou non. Ceci peut être affirmé aux vues de la jonction entre les gènes ets et env. Il y a en effet eu recombinaison au niveau de courtes séquences homologues entre le gène env du virus RAV-2 et le brin inverse complémentaire du gène c-ets-1. Or, des constructions virales dans lesquelles les mutations ont été progressivement supprimées ont permis de montrer que les virus E26 AOC et E26 OOC ne sont pas leucémogènes. Ces virus sont les candidats les plus plausibles résultant de la transduction de gag, c-myb et c-ets-1. Ils sont quand même capables de transformer des cellules myéloïdes en culture mais ne transforment pas les cellules érythroïdes (T. Graf, D. Stéhelin et D. Leprince, manuscrit en préparation). Ceci n'est toutefois pas un cas particulier puisque le virus exprimant les protéines v-Myb et v-Ets séparément, qu'avaient construit T.

Metz et T. Graf, est capable de transformer des cellules en culture mais n'est pas leucémogène. Il ne le devient que si survient un événement de fusion entre les deux gènes. Dans le cas de E26, c'est l'acquisition ultérieure de la mutation B dans un virus de type AOC ou OOC qui aurait donné naissance à un virus très transformant capable de tuer tous les animaux infectés en deux ou trois semaines: le virus E26, tel qu'il a pu être isolé en 1962, et cloné moléculairement en 1983. Un autre aspect de ce travail (T. Graf, D. Stéhelin et D. Leprince, manuscrit en préparation) a montré qu'un virus de type gag-myb-c-ets-1 (E26 OOO), où toutes les mutations ont été révertées, est leucémogène in vivo et, transforme des cellules érythroïdes in vitro. Cependant, contrairement aux progéniteurs "érythroïdes" immatures (MEPs) transformés par E26 ABC, les cellules érythroïdes transformées par E26 OOO sont plus matures et sont déjà engagées dans la voie de différenciation érythroïde. Ce virus E26 OOO est donc un système de choix pour étudier le rôle de l'isoleucine 445 dans la transformation érythroïde. Nous avons réalisé des constructions virales E26 OGO et E26 OPO: l'isoleucine, touchée par la mutation B dans v-Ets, est ici remplacée soit par un résidu glycine, soit par un résidu proline. Ces deux résidus sont responsables de la perte des propriétés de liaison à l'ADN et de transactivation des protéines Ets-1 isolées. La comparaison des pouvoirs transformant et leucémogène de ces virus par rapport aux virus E26 AOC, OOC, OOO et ABC nous permettra peut-être de déterminer l'effet et "l'intérêt" pour le virus d'avoir acquis cette mutation B, si on raisonne de manière finaliste. Les expériences sont actuellement réalisées dans le laboratoire de T. Graf.

Afin d'être aussi complet que possible, on peut également envisager d'autres hypothèses pour l'acquisition du pouvoir transformant. Il se peut que la capacité de transactivation de la protéine virale ne soit pas le seul moyen utilisé par le virus pour transformer les cellules et être leucémogène. Il peut également mettre en jeu un phénomène de "squelching" des protéines cellulaires, les empêchant ainsi de tenir leur rôle habituel. Une autre hypothèse repose sur l'observation de la séquence 3' du gène *v-ets*. Comme elle correspond à l'inverse complémentaire de la séquence 3' du gène *c-ets-1*, on peut imaginer que le transcrit viral s'hybride au transcrit *c-ets-1* endogène par l'intermédiaire de ces séquences. Les RNAses cellulaires dégraderaient cet hybride, empêchant ainsi la formation normale de protéines c-Ets-1 dans la cellule.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abate, C., Patel, L., RauscherIII, F. J. and Curran, T. (1990). Redox regulation of fos and jun DNA-binding activity in vitro. Science 249, 1157-1161.
- Adelmant, G., Quatannens, B., Lagrou, C., Wernert, N., Torpier, G., Saule, S., Stehelin, D. and Laudet, V. (1994). *In vivo* cooperation of two nuclear oncogenic proteins, P135gag-myb-ets and p61/63myc, leads to transformation and immortalization of chicken myelomonocytic cells. J. Virol. *68*, 2097-2107.
- Ahne, B. and Stratling, W. H. (1994). Characterization of a myeloid-specific enhancer of the chicken lysozyme gene major role for an *ets* transcription factor-binding site. J. Biol. Chem. *269*, 17794-17801.
- Albagli, O., Flourens, A., Crépieux, P., Stéhelin, D. and Leprince, D. (1992). Phylogeny of the p68^{c-ets-1} amino-terminal transactivating domain reveals some highly conserved structural features. Oncogene *7*, 1435-1439.
- Albagli, O., Soudant, N., Ferreira, E., Dhordain, P., Dewitte, F., Bègue, A., Flourens, A., Stéhelin, D. and Leprince, D. (1994). A model for gene evolution of the *ets-1 ets-2* transcription factors based on structural and functional homologies. Oncogene *9*, 3259-3271.
- Amouyel, P., Laudet, V., Martin, P., Li, R., Quatannens, B., Stéhelin, D. and Saule, S. (1989). Two nuclear oncogenic proteins, P135gag-myb-ets and p61/63myc, cooperate to induce transformation of chicken neuroretina cells. J.Virol. 63, 3382-3388.
- Andres, A. J. and Thummel, C. S. (1992). Hormones, puffs and flies: the molecular control of metamorphosis by ecdysone. Trends Genet. 8, 132-138.
- Anton, I. A. and Frampton, J. (1988). Tryptophans in Myb proteins. Nature 336, 719.
- Ascione, R., Thompson, D. M., Thomas, R., Panayiotakis, A., Ramsay, R., Tymms, M., Kola, I. and Seth, A. (1992). Influence of nucleotides flanking the -GAGA- core sequence on ETS1 and ETS2 DNA-binding activity and the mechanism of ETS1 autoregulation. Int. J. Oncol. 1, 631-637.
- Ashburner, M., Chihara, C., Meltzer, P. and Richards, G. (1974). Temporal control of puffing activity in polytene chromosomes. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 38, 655-662.
- Aurigemma, R. E., Blair, D. G. and Ruscetti, S. K. (1992). Transactivation of erythroid transcription factor GAGA-1 by a *myb-ets-*containing retrovirus. J.Virol. *66*, 3056-3061.

- Bailly, R. A., Bosselut, R., Zucman, J., Cormier, F., Delattre, O., Roussel, M., Thomas, G. and Ghysdael, J. (1994). DNA-binding and transcriptional activation properties of the EWS-FLI-1 fusion protein resulting from the t(11;22) translocation in Ewing sarcoma. Mol. Cell. Biol. 14, 3230-3241.
- Bear, S. E., Bellacosa, A., Lazo, P. A., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Hanson, C., Levan, G. and Tsichlis, P. N. (1989). Provirus insertion in Tpl-1, an Ets-1-related oncogene, is associated with tumor progression in Moloney murine leukemia virus-induced rat thymic lymphomas. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 86, 7495-7499.
- Bellacosa, A., Datta, K., Bear, S. E., Patriotis, C., Lazo, P. A., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. and Tsichlis, P. N. (1994). Effects of provirus integration in the Tpl-1/Ets-1 locus in Moloney murine leukemia virus-induced rat T cell lymphomas: levels of expression, polyadenylation, transcriptional initiation, and differential splicing of the Ets-1 mRNA. Mol. Cell. Biol. 68, 2320-2330.
- Ben-David, Y., Giddens, E. B. and Bernstein, A. (1990). Identification and mapping of a common proviral integration site Fli-1 in erythroleukemia cells induced by Friend murine leukemia virus. Proc.Natl.Acad. Sci. USA 87, 1332-1336.
- Ben-David, Y. and Bernstein, A. (1991). Friend virus-induced erythroleukemia and the multistage nature of cancer. Cell *66*, 831-834.
- Ben-David, Y., Giddens, E. B., Letwin, K. and Bernstein, A. (1991). Erythroleukemia induction by Friend murine leukemia virus: insertional activation of a new member of the ets gene family, Fli-1, closely linked to *c-ets-1*. Genes Dev. 5, 908-918.
- Bergeron, D., Poliquin, L., Kozak, C. A. and Rassart, E. (1991). Identification of a common viral integration region in Cas-Br-E murine leukemia virus-induced non-T, non-B cell lymphomas. J. Virol. 65, 7-15.
- Beug, H., Leutz, A., Kahn, P. and Graf, T. (1984). Ts mutant of E26 leukemia virus allow transformed myeloblasts, but not erythroblasts or fibroblasts, to differentiate at the nonpermissive temperature. Cell *39*, 579-588.
- Bhat, N. K., Komschlies, K. L., Fujiwara, S., Fisher, R. J., Mathieson, B. J., Gregorio, T. A., Young, H. A., Kasik, J. W., Ozato, K. and Papas, T. S. (1989). Expression of ets genes in mouse thymocyte subsets and T cells. J. Immunol. 142, 672-678.
- Bhat, N. K., Thompson, C. B., Lindsten, T., June, C. H., Fujiwara, S., Koizumi, S., Fisher, R. J. and Papas, T. S. (1990). Reciprocal expression of human ETS1 and ETS2 genes during T-cell activation: regulatory role for the proto-oncogene ETS1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3723-3727.
- Bhattachyara, G., Lee, L., Reddy, E. S. P. and Rao, V. N. (1993). Transcriptional activation domains of *elk-1*, D-*elk-1* and SAP-1 proteins. Oncogene *8*, 3459-3464.

- Bister, K., Nunn, M., Moscovici, C., Perbal, B., Baluda, M. A. and Duesberg, P. H. (1982). Acute leukemia viruses E26 and avian myeloblastosis virus have related transformation-specific RNA sequences, but different genetic structures, gene products and oncogenic properties. Proc. Natl. Acad. Sci USA 79, 3677-3681.
- Boise, L. H., Petryniak, B., Mao, X. H., June, C. H., Wang, C. Y., Lindsten, T., Bravo, R., Kovary, K., Leiden, J. M. and Thompsson, C. B. (1993). The NFAT-1 DNA binding complex in activated T-Cells contains *fra-1* and JunB. Mol. Cell. Biol. *13*, 1911-1919.
- Bolwig, G. M. and Hearing, P. (1991). Interaction of nuclear factor EF-1A with the polyomavirus enhancer region. J. Virol. 65, 1884-92.
- Bolwig, G. M., Bruder, J. T. and Hearing, P. (1992). Different binding site requirements for binding and activation for the bipartie enhancer factor EF-1A. Nucl. Acids. Res. 20, 6555-6564.
- Bosselut, R., Duvall, J. F., Gégonne, A., Bailly, M., Hemar, A., Brady, J. and Ghysdael, J. (1990). The product of the *c-cts-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*, 3137-3144.
- Bosselut, R., Levin, J., Adjadj, E. and Ghysdael, J. (1993). A single amino-acid substitution in the Ets domain alters core DNA binding specificity of Ets1 to that of the related transcription factors Elf1 and E74. Nucl. Acids. Res. 21, 5184-5191.
- Böttinger, E. P., Shelley, C. S., Farokhzad, O. C. and Arnaout, M. A. (1994). The human beta 2 integrin CD18 promoter consists of two inverted ets cis-Elements. Mol. Cell. Biol. 14, 2604-2615.
- Boulukos, K. E., Pognonec, P., Bègue, A., Galibert, F., Gesquière, J. C., Stéhelin, D. and Ghysdael, J. (1988). Identification in chickens of an evolutionary conserved cellular *ets-2* gene (*c-ets-2*) encoding nuclear proteins related to the products of the *c-ets* proto-oncogene. EMBO J. 7, 697-705.
- 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.
- Boulukos, K. E., Pognonec, P., Sariban, E., Bailly, M., Lagrou, C. and Ghysdael, J. (1990). Rapid and transient expression of Ets2 in mature macrophages following stimulation with cMGF, LPS, and PKC activators. Genes Dev. 4, 401-409.
- Bova, C. A., Olsen, J. C. and Swanstrom, R. (1988). The avian retrovirus env gene family: molecular analysis of host range and antigenic variants. J. Virol. 62, 75-83.
- 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. Natl. Acad. Sci. USA 81, 4265-4269.

- Bradford, A. P., Conrad, K. E., Wasylyk, C., Wasylyk, B. and Gutierrez-Hartmann A. (1995). Functional interaction of c-Ets-1 and GHF-1/Pit-1 mediates Ras activation of pituitary-specific gene expression: mapping of the essential c-Ets-1 domain. Mol. Cell. Biol. 15, 2849-2857.
- Brennan, R. G. (1993). The winged-helix DNA-binding motif: another helix-turn-helix takeoff. Cell *74*, 773-776.
- Brown, T. A. and McKnight, S. L. (1992). Specificities of protein-protein and protein-DNA interaction of GABPa and two newly defined ets-related proteins. Genes Dev. 6, 2502-2512.
- Bruder, J. T., Heidecker, G. and Rapp, U. R. (1992). Serum-, TPA-, and ras-induced expression from Ap-1/Ets-diven promoters requires Raf-1 kinase. Genes Dev. 6, 545-556.
- Brunner, D., Ducker, K., Oellers, N., Hafen, E., Scholz, H. and Klambt, C. (1994). The ETS domain protein Pointed-P2 is a target of MAP kinase in the sevenless signal transduction pathway. Nature *370*, 386-389.
- Buijs, A., Sherr, S., van Baal, S., van Bezouw, S., van der Plas, D., Van Kessel, A. G., Riegman, P., Deprez, R. L., Zwarthoff, E., Hagemeijer, A. and Grosveld, G. (1995). Translocation (12;22) (p13;q11) in myeloproliferative disorders results in fusion of the ETS-like TEL gene on 12q13 to the MN1 gene on 22q11. Oncogene 10, 1511-1519.
- Burley, S. K. (1994). Curr. Opin. Struct. Biol. 4, 3.
- Burtis, K. C., Thummel, C. S., Weldon Jones, C., Karim, F. D. and Hogness, D. S. (1990). The drosophila 74EF early puff contains E74, a complex ecdysone-inducible gene that encodes two ets-related proteins. Cell *61*, 85-99.
- Buttice, G., Quinones, S. and Kurkinen, M. (1991). The AP-1 site is required for basal expression but is not necessary for TPA-response of the human stromelysin gene. Nucl. Acids Res. 19, 3723-3731.
- Buttice, G. and Kurkinen, M. (1993). A polyomavirus enhancer A-Binding protein-3 site and ets-2 protein have a major role in the 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate response of the human stromelysin gene. J. Biol. Chem. 268, 7196-7204.
- Cardot, P., Pastier, D., Lacorte, J. M., Mangeney, M., Zannis, V. I. and Chambaz, J. (1994). Purification and characterization of nuclear factors binding to the negative regulatory element d of human apolipoprotein A-II promoter. a negative regulatory effect is reversed by GABP, an ets-related protein. Biochemistry 33, 12139-12148.
- Carvalho, M. and Derse, D. (1993). The PU.1/Spi-1 Proto-Oncogene is a transcriptional regulator of a lentivirus promoter. J. Virol. 67, 3885-3890.

- Chen, J. H. (1988). Complementary DNA clones of chicken proto-oncogene c-ets: sequence divergence from the viral oncogene *v-ets*. Onc. Res. 2, 371-384.
- Chen, Z. Q., Burdett, L. A., Seth, A. K., Lautenberger, J. A. and Papas, T. S. (1990). Requirement of *cts-2* expression for Xenopus oocyte maturation. Science 250, 1416-1418.
- Chen, T., Bunting, M., Karim, F. D. and Thummel, C. S. (1992). Isolation and characterization of five drosophila genes that encode an *ets*-related DNA binding domain. Dev. Biol. *151*, 176-191.
- Chen, J. H., Jeha, S. and Oka, T. (1993a). Negative Regulatory Elements in the Human ETS1 Gene Promoter. Oncogene 8, 133-139.
- Chen, J. H. and Wright, C. D. (1993b). Pea3, oct 1 and oct 2 positively regulate the human ets1 promoter. Oncogene 8, 3375-3383.
- Chumakov, A. M., Chen, D. L., Chumakova, E. A. and Koeffler, H. P. (1993). Localization of the *c-ets-2* transactivation domain. J.Virol. *67*, 2421-2425.
- Clark, N. M., Smith, M. J., Hilfinger, J. M. and Markovitz, D. M. (1993). Activation of the human T-cell leukemia virus type I enhancer is mediated by binding sites for *elf-1* and the pets factor. J.Virol. *67*, 5522-5528.
- Coffer, P., De Jonge, M., Mettouchi, A., Binetruy, B., Ghysdael, J. and Kruijet, W. (1994). JunB promoter regulation: *ras* mediated transactivation by c-Ets-1 and c-Ets-2. Oncogene *9*, 911-921.
- Coll, J., Righi, M., de Taisne, C., Dissous, C., Gégonne, A. and Stéhelin, D. (1983).
 Molecular cloning of the avian acute transforming retrovirus MH2 reveals a novel cell-derived sequence (*v-mil*) in addition to the *c-myc* oncogene. EMBO J. 2, 2189-2194.
- Conrad, K. E., Oberwetter, J. M., Vaillancourt, R., Johnson, G. L. and Gutierrez Hartman, A. (1994). Identification of the functional components of the *ras* signaling pathway regulating pituitary cell-specific gene expression. Mol. Cell. Biol. *14*, 1553-1565.
- Crépieux, P., Leprince, D., Flourens, A., Albagli, O., Ferreira, E. and Stéhelin, D. (1993). The two functionally distinct amino termini of chicken *c-ets-1* products arise from alternative promoter usage. Gene Expression *3*, 215-225.
- Crozat, A., Aman, P., Mandhal, N. and Ron, D. (1993). Fusion of CHOP to a novel RNA-binding protein in human myxoid liposarcoma. Nature *363*, 640-644.
- Curran, T. and Franza, J. R. (1988). Fos and jun: the AP-1 connection. Cell 55, 395-397.
- Dalton, S. and Treisman, R. (1992). Characterization of SAP-1, a protein recruited by serum response factor to the c-fos serum response element. Cell *68*, 597-612.

- Delattre, O., Zucman, J., Plougastel, B., Desmaze, C., Melot, T., Peter, M., Kovar, H., Joubert, I., Dejong, P., Rouleau, G., Aurias, A. and Thomas, G. (1992). Gene Fusion with an ETS DNA-Binding Domain Caused by Chromosome Translocation in Human Tumours. Nature *359*, 162-165.
- Desbiens, X., Queva, C., Jaffredo, T., Stéhelin, 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.
- Dhordain, P., Dewitte, F., Desbiens, X., Stehelin, D. and Duterquecoquillaud, M. (1995). Mesodermal expression of the chicken *erg* gene associated with precartilaginous condensation and cartilage differentiation. Mech. Develop. *50*, 17-28.
- Dickson, B. (1995). Nuclear factors in sevenless signalling. TIG 11, 106-111.
- Dittmer, J., Gegonne, A., Gitlin, S. D., Ghysdael, J. and Brady, J. N. (1994). Regulation of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) gene expression sp1 binds through an inverted CACCC motif and regulates promoter activity in cooperation with ets1. J. Biol. Chem. 269, 21428-21434.
- 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.
- Donaldson, L. W., Petersen, J. M., Graves, B. J. and Mcintosh, L. P. (1994). Secondary structure of the ETS domain places murine *ets-1* in the superfamily of winged helix-turn-helix DNA-binding proteins. Biochemistry *33*, 13509-13516.
- Dudek, H., Tantravahi, R. V., Rao, V. N., Reddy, E. S. P. and Reddy, E. P. (1992). Myb and ets proteins cooperate in transcriptional activation of the *mim-1* promoter. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *89*, 1291-1295.
- Durban, E. M. and Boettiger, D. (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 Stéhelin, D. (1988). Cloning and expression of the chicken p54^{c-ets} cDNAs: the first p54^{c-ets} coding exon is located into the 40,0 kbp genomic domain unrelated to *v-ets*. Onc. Res. 2, 335-344.
- Duterque-Coquillaud, M., Niel, C., Plaza, S. and Stéhelin, D. (1993). New human erg isoforms generated by alternative splicing are transcriptional activators. Oncogene 8, 1865-1873.

- Engelke, U. and Lipsick, J. S. (1994). Transformation of myelomonocytic cells by the avian myeloblastosis virus is determined by the *v-myb* oncogene, not by the unique long terminal repeats of the virus. J. Virol. *68*, 2752-2755.
- Ernst, P., Hahm, K. and Smale, S. T. (1993). Both Lyf-1 and an Ets protein interact with a critical promoter element in the murine terminal transferase gene. Mol. Cell. Biol. 13, 2982-2992.
- Feinman, R., Qiu, W. Q., Pearse, R. N., Nikolajczyk, B. S., Sen, R., Sheffery, M. and Ravetch, J. V. (1994). PU.1 and an HLH family member contribute to the myeloid-specific transcription of the fc gamma RIIIA promoter. EMBO J. 13, 3852-3860.
- Fisher, C. L., Ghysdael, J. and Cambier, J. C. (1991). Ligation of membrane Ig leads to calcium-mediated phosphorylation of the proto-oncogene product, Ets-1. J.Immunol. 146, 1743-1749.
- Fisher, R. J., Mavrothalassitis, A., Kondoh, A. and Papas, T. S. (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 Papas, T. S. (1992). Human ETS1 oncoprotein: purification, isoforms, -SH modification and DNA sequence-specific binding. J.Biol.Chem. 267, 17957-17965.
- Fisher, R. J., Fivash, M., Casasfinet, J., Erickson, J. W., Kondoh, A., Bladen, S. V., Fisher, C., Watson, D. K. and Papas, T. S. (1994). Real-time DNA binding measurements of the ets1 recombinant oncoproteins reveal significant kinetic differences between the p42 and p51 isoforms. Protein Sci. 3, 257-266.
- Fleishman, L. F., Pilaro, A. M., Murakami, K., Kondoh, A., Fisher, R. J. and Papas,
 T. S. (1993). c-ets-1 protein is hyperphosphorylated during mitosis. Oncogene 8,
 771-780.
- Fleischman, L. F., Holtzclaw, L., Russell, J. T., Mavrothalassitis, G. and Fisher, R. J. (1995). *ets-1* in astrocytes: expression and transmitter-evoked phosphorylation. Mol. Cell. Biol. *15*, 925-931.
- Fletcher, J. C., Burtis, K. C., Hogness, D. S. and Thummel C. S. (1995). The *drosophila E74* gene is required for metamorphosis and plays a role in the polytene chromosome puffing response to ecdysone. Development *121*, 1455-1465.
- Fletcher, J. C. and Thummel, C. S. (1995). The *drosophila E74* gene is required for the proper stage- and tissue-specific transcription of ecdysone-regulated genes at the onset of metamorphosis. Development 121, 1411-1421.
- Frampton, J., Kouzarides, T., Döderlein, G., Graf, T. and Weston, K. (1993). Influence of the v-myb transactivation domain on the oncoprotein's transformation specificity. EMBO J. 12, 1333-1341.

- Frykberg, L., Metz, T., Brady, G., Introna, M., Beug, H., Vennstrom, 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. Onc. Res. *3*, 313-322.
- Fujita, T., Nolan, G. P., Ghosh, S. and Baltimore, D. (1992). Independent modes of transcriptional activation by the p50 and p65 subunits of NF-kB. Genes & Dev. 6, 775-787.
- Fujiwara, S., Fisher, R. J., Seth, A., Bhat, N. K., Showalter, S. D., Zweig, M. and Papas, T. S. (1988a). Characterization and localization of the products of the human homologs of the *v-cts* oncogene. Oncogene *2*, 99-103.
- Fujiwara, S., Fisher, R. J., Bhat, N. K., Moreno Diaz de la Espina, S. and Papas, T. S. (1988b). A short-lived nuclear phosphoprotein encoded by the human *ets-2* proto-oncogene is stabilized by activation of protein knase C. Mol. Cell. Biol. *8*, 4700-4706.
- Fujiwara, S., Koizumi, S., Fisher, R. J., Bhat, N. K. and Papas, T. S. (1990). Phosphorylation of the ETS-2 protein: regulation by the T-cell antigen receptor-CD3 complex. Mol. Cell. Biol. 10, 1249-1253.
- Galang, C. K., Der, C. J. and Hauser, C. A. (1994). Oncogenic *ras* can induce transcriptional activation through a variety of promoter elements, including tandem c-Ets-2 binding sites. Oncogene *9*, 2913-2921.
- Galson, D. L., Hensold, J. O., Bishop, T. R., Schalling, M., D'Andrea, A. D., Jones, C., Auron, P. E. and Housman, D. E. (1993). Mouse b-globin DNA-binding protein B1 is identical to a proto-oncogene, the transcription factor Spi-1/PU.1 and is restricted in expression to hematopoietic cells and the testis. Mol. Cell. Biol. 13, 2929-2941.
- Gandrillon, O., Jurdic, P., Benchaibi, M., Xiao, J.-H., Ghysdael, J. and Samarut, J. (1987). Expression of the v-erbA oncogene in chicken embryo fibroblasts stimulate their proliferation *in vitro* and enhances tumor growth *in vivo*. Cell 49, 687-697.
- Garrido, C., Leprince, D., Lipsick, J. S., Stéhelin, D., Gospodarowicz, D. and Saule, S. (1992). Definition of functional domains in P135gag-myb-ets and p48v-myb proteins required to maintain the response of neuroretina cells to basic fibroblast growth factor. J.Virol. 66, 160-166.
- Gearhart, J. D., Davisson, M. T. and Oster-Granite, M. L. (1986). Brain Res. Bull. 16, 789-801.
- Gégonne, A., Leprince, D., Duterque-Coquillaud, M., Vandenbunder, B., Flourens, A., Ghysdael, J., Debuire, B. and Stéhelin, D. (1987a). Multiple domains for the chicken cellular sequences homologous to the *v-vts* 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 Ghysdael, J. (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.
- Gégonne, A., Punyammalee, B., Rabault, B., Bosselut, R., Seneca, S., Crabeel, M. and Ghysdael, J. (1992). Analysis of the DNA binding and transcriptional activation properties of the Ets1 oncoprotein. New Biol. 4, 512-519.
- Gégonne, A., Bosselut, R., Bailly, R. A. and Ghysdael, J. (1993). Synergistic activation of the HTLV1 LTR Ets-responsive region by transcription factors Ets1 and Sp1. EMBO J. 12, 1169-1178.
- Ghysdael, J., Gégonne, A., Pognonec, P., Boulukos, K., Leprince, D., Dernis, D., Lagrou, C. and Stéhelin, D. (1986). Identification in chicken macrophages of a set of proteins related to but distinct from the chicken cellular c-ets-encoded protein p54c-ets. EMBO J. 5, 2251-2256.
- Giese, K., Kingsley, C., Kirshner, J. R. and Grosschedl, R. (1995). Assembly and function of a $TCR\alpha$ enhancer complex is dependent on LEF-1 induced DNA bending and multiple protein-protein interactions. Genes Dev. 9, 995-1008.
- Gille, H., Sharrocks, A. D. and Shaw, P. (1992). Phosphorylation of p62^{TCF} by MAP kinase stimulates ternary complex formation at *c-fos* promoter. Nature 358, 414-417.
- Gille, H., Kortenjann, M., Thomae, O., Moomaw, C., Slaughter, C., Cobb, M. H. and Shaw, P. E. (1995). ERK phosphorylation potentiates *elk-1*-mediated ternary complex formation and transactivation. EMBO J. *14*, 951-962.
- Giovane, A., Pintzas, A., Maira, S. M., Sobieszczuk, P. and Wasylyk, B. (1994). Net, a new *ets* transcription factor that is activated by ras. Gene Dev. *8*, 1502-1513.
- Giovannini, M., Biegel, J. A., Serra, M., Wang, J. Y., Wei, Y. H., Nycum, L., Emanuel, B. S. and Evans, G. A. (1994). EWS-erg and EWS-Fli1 fusion transcripts in ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumors with variant translocations. J. Clin. Invest. 94, 489-496.
- Gitlin, S. D., Bosselut, R., Gegonne, A., Ghysdael, J. and Brady, J. N. (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.
- Gitlin, S. D., Dittmer, J., Shin, R. C. and Brady, J. N. (1993). Transcriptional activation of the human T-Lymphotropic virus Type-I long terminal repeat by functional interaction of tax(1) and *ets1*. J. Virol. *67*, 7307-7316.
- 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.

- Golub, T. R., Barker, G. F., Lovett, M. and Gilliland, D. G. (1994). Fusion of PDGF receptor b to a novel *ets*-like gene, tel, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation. Cell *77*, 307-316.
- Goto, M., Tamura, T., Mikoshiba, K., Masamune, Y. and Nakanishi, Y. (1991). Transcription inhibition of the somatic-type phosphoglycerate kinase 1 gene *in vitro* by a testis-specific factor that recognizes a sequence similar to the binding site for Ets oncoproteins. Nucl. Acids Res. 19, 3959-3963.
- Graf, T., Oker-Blom, N., Todorov, T. G. and Beug, H. (1979). Transforming capacities and defectiveness of avian leukemia virus OK10 and E26. Virology 99, 431-436.
- 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.
- Grévin, D., Chen, J. H., Raes, M. B., Stehelin, D., Vandenbunder, B. and Desbiens, X. (1993). Involvement of the Proto-Oncogene C-ETS 1 and the urokinase plasminogen activator during mouse implantation and placentation. Int. J. Dev. Biol. 37, 519-529.
- Guehmann, S., Vorbrueggen, G., Kalkbrenner, F. and Moelling, K. (1992). Reduction of a conserved Cys is essential for Myb DNA-binding. Nucl. Acids Res. 20, 2279-2286.
- 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.
- Gunther, C. V. and Graves, B. J. (1994). Identification of ETS domain proteins in murine t lymphocytes that interact with the moloney murine leukemia virus enhancer. Mol. Cell. Biol. 14, 7569-7580.
- Gutman, A. and Wasylyk, B. (1990). The collagenase gene promoter contains a TPA and oncogene-responsive unit encompassing the PEA3 and AP-1 binding sites. EMBO J. 9, 2241-2246.
- Gutman, A. and Wasylyk, B. (1991). Nuclear targets for transcription regulation by oncogenes. Trends Genet. 7, 49-54.
- Hagemeier, C., Bannister, A. J., Cook, A. and Kouzarides, T. (1993). The activation domain of transcription factor PU.1 binds the retinoblastoma (RB) protein and the transcription factor TFIID *in vitro*: RB shows sequence similarity to TFIID and TFIIB. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *90*, 1580-1584.
- Hagman, J. and Grosscheld, R. (1992). An inhibitory carboxyl-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. and Wasylyk, B. (1994). The oncoprotein v-Ets is less selective in DNA binding than c-Ets-1 due to the c-terminal sequence change. Oncogene 9, 2499-2512.
- Harrison, C. J., Bohm, A. A. and Nelson, H. C. M. (1994). Crystal structure of the DNA binding domain of the heat shock transcription factor. Science 263, 224-227.
- Henkel, G. and Brown, M. A. (1994). PU.1 and GATA: components of a mast cell-specific interleukin 4 intronic enhancer. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 7737-7741.
- Hermans, M. H. A., Hartsuiker, H. and Opstelten, D. (1989). An *in situ* study of B-lymphopoiesis in rat bone marrow: topographical arrangement of terminal nucleotidyl transferase-positive cells and pre-B cells. J. Immunol. *142*, 67-73.
- Higashino, F., Yoshida, K., Fujinaga, Y., Kamio, K. and Fujinaga, K. (1993). Isolation of a cDNA encoding the adenovirus E1A enhancer binding protein a new human member of the ets oncogene family. Nucl. Acids Res. 21, 547-553.
- Hill, C. S., Marais, R., John, S., Wynne, J., Dalton, S. and Treisman, R. (1993). Functional analysis of a growth factor-responsive transcription factor complex. Cell 73, 395-406.
- Hino, M., Tojo, A., Misawa, Y., Morri, H., Takaku, F. and Shibuya, M. (1991). Unregulated expression of the erythroproiten receptor gene caused by insertion of spleen focus-forming virus long terminal repeat in a murine erythroleukemia cell line. Mol. Cell. Biol. 11, 5527-5533.
- Hipskind, R. A., Rao, V. N., Muelle, C. G. F., Reddy, E. S. P. and Nordheim, A. (1991). Ets-related protein *clk-1* is homologous to the *c-fos* regulatory factor p62^{TCF}. Nature 354, 531-534.
- Ho, I. C., Bhat, N. K., Gottschalk, L. R., Lindsen, T., Thompson, C. B., Papas, T. S. and Leiden, J. M. (1990). Sequence-specific binding of humn Ets-1 to the T cell receptor a gene enhancer. Science 250, 814-818.
- Ichikawa, H., Shimizu, K., Hayashi, Y. and Ohki, M. (1994). An RNA-binding protein gene, TLS/FUS, is fused to ERG in human myeloid leukemia with t(16;21) chromosomal translocation. Canc. Res. 54, 1-4.
- 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.
- Ivanov, X., Mladenov, Z., Nedyalkov, S. and Todorov, T. G. (1962). Experimental investigations into avian leukosis. I. Transmission experiments of certain diseases of the avian leukosis complex, found in Bulgaria. Bulgarian Acad. Sci. Bull. Inst. Pathol. Comp. Animaux Domestiques 9, 5-36.

- Janknecht, R. and Nordheim, A. (1992). Elk-1 protein domains required for direct and SRF-assisted DNA-binding. Nucl. Acids. Res. 20, 3317-3324.
- Janknecht, R., Ernst, W. H., Pingoud, V. and Nordheim, A. (1993). Activation of ternary complex formation *Elk-1* by MAP kinases. EMBO J. 12, 5097-5104.
- Janknecht, R., Zinck, R., Ernst, W. H. and Nordheim, A. (1994). Functional dissection of the transcription factor *elk-1*. Oncogene *9*, 1273-1278.
- Janknecht, R., Ernst, W. H. and Nordheim, A. (1995a). SAP1a is a nuclear target of signaling cascades involving ERKs. Oncogene 10, 1209-1216.
- Janknecht, R., Cahill, M. A. and Nordheim, A. (1995b). Signal integration at the *c-fos* promoter. Carcinogenesis *16*, 443-450.
- Jansen, H. W., Rückert, B., Lurz, R. and Biser, K. (1983). Two unrelated cell-derived sequences in the genome of avian leukemia and carcinoma inducing retrovius MH2. EMBO J. 2, 1969-1975.
- Jeon, I. S., Davis, J. N., Braun, B. S., Sublett, J. E., Roussel, M. F., Denny, C. T. and Shapiro, D. N. (1995). A variant ewing's sarcoma translocation (7;22) fuses the EWS gene to the ETS gene ETV1. Oncogene 10, 1229-1234.
- John, S., Reeves, R. B., Lin, J. X., Child, R., Leiden, J. M., Thompson, C. B. and Leonard, W. J. (1995). Regulation of cell-type-specific interleukin-2 receptor alphachain gene expression: potential role of physical interactions between *elf-1*, HMG-I(Y), and NF-kappa b family proteins. Mol. Cell. Biol. *15*, 1786-1796.
- Jolliff, K., Li, Y. and Johnson, L. F. (1991). Multiple protein DNA interactions in the TATAA-less mouse thymidylate synthase promoter. Nucl. Acids. Res. 19, 2267.
- 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.
- Jurdic, P., Benchaibi, M., Gandrillon, O. and Samarut, J. (1987). Transforming and mitogenic effects of avian leukemia virus E26 on chicken hematopietic cells and fibroblasts, respectively, correlate with level of expression of the provirus. J.Virol. 61, 3058-3065.
- Kahn, N. C., Flordellis, C. S., Caron, C. F., Duesberg, P. H. and Papas, T. S. (1983). Avian carcinoma virus MH2 contains a transformation-specific sequence, mht and shares the myc sequence with MC29, CMII and OK10 viruses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 6566-6570.
- Kajimoto, Y., Shirai, Y., Mukai, H., Kuno, T. and Tanaka, C. (1993). Molecular cloning of two additional members of the neural visinin-like Ca²⁺-binding protein gene family. J. Neurochem. *61*, 1091-1096.

- 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. and Graves, B. J. (1990). The ETS-domain: a new DNA-binding motif that recognizes a purinerich core DNA sequence. Genes Dev. 4, 1451-1453.
- Karim, F. D. and Thummel, C. S. (1991). Ecdysone coordinates the timing and amounts of E74A and E74B transcription in drosophila. Genes Dev. 5, 1067-1079.
- Klaes, A., Menne, T., Stollewerk, A., Scholz, H. and Klämbt, C. (1994). The Ets transcription factors encoded by the drosophila gene pointed direct glial cell differentiation in the embryonic CNS. Cell *78*, 149-160.
- Klambt, C. (1993). The drosophila gene pointed encodes two ETS-like proteins which are involved in the development of the midline glial cells. Development 117, 163-176.
- Klempnauer, K. H., Gonda, T. J. and Bishop, J. M. (1982). Nucleotide sequence of the retroviral leukemia gene *v-myb* and its cellular progenitor *c-myb*: the architecture of a transduced oncogene. Cell *31*, 453-463.
- Klempnauer, K. M., Symonds, G., Evans, 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.
- 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.
- Klemsz, M. J., McKercher, S. R., Celada, A., Van, B., C. and Maki, R. A. (1990). The macrophage and B cell-specific transcription factor PU.1 is related to the ets oncogene. Cell *61*, 113-124.
- Klemsz, M., Hroma, R., Raskind, W., Bruno, E. and Hoffman, R. (1994). PE-1, a novel ETS oncogene family member, localizes to chromosome 1q21-23. Genomics 20, 291-294.
- Koizumi, S., Fisher, R. J., Fujiwara, S., Jorcyk, C., Bhat, N. K., Seth, A. and Papas, T. S. (1990). Isoforms of the human *ets-1* protein: generation by alternative splicing and differential phosphorylation. Oncogene *5*, 675-81.
- Kola, I., Brookes, S., Green, A. R., Garber, R., Tymms, M., Papas, T. S. and Seth, A. (1993). The *cts1* transcription factor is widely expressed during murine embryo development and is associated with mesodermal cells involved in morphogenetic processes such as organ formation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *90*, 7588-7592.
- Kominato, Y., Galson, D. L., Waterman, W. R., Webb, A. C. and Auron, P. E. (1995). Monocyte expression of the human prointerleukin 1 beta gene (IL1B) is dependent on promoter sequences which bind the hematopoietic transcription factor Spi-1/PU.1. Mol. Cell. Biol. 15, 58-68.

- Kraut, N., Frampton, J., Mcnagny, K. M. and Graf, T. (1994). A functional ets DNA-Binding domain is required to maintain multipotency of hematopoietic progenitors transformed by Myb-Ets. Genes Dev. 8, 33-44.
- Kraut, N., Frampton, J. and Graf, T. (1995). Rem-1, a putative direct target gene of the Myb-Ets fusion oncoprotein in haematopoietic progenitors, is a member of the recoverin family. Oncogene 10, 1027-1036.
- Lacombe, C., Chretien, S., Lemarchandel, V., Mayeux, P., Romeo, P.-H., Gisselbrecht, S. and Cartron, J.-P. (1991). Spleen focus-forming virus long terminal repeat insertional activation of the murine erythroprotein gene in th T3Cl-2 friend leukemia cell line. J. Biol. Chem. 166, 6952-6956.
- Laget, M. P., Callebaut, I., De Launoit, Y., Stéhelin, D. and Mornon, J. P. (1993). Predicted common structural features of DNA-binding domains from Ets, Myb and HMG transcription factors. Nucl. Acids. Res. 21, 5987-5996.
- Lai, Z. C. and Rubin, G. M. (1992). Negative control of photoreceptor development in drosophila by the product of the yan gene, an ETS domain protein. Cell 70, 609-620.
- Lamarco, K., Thompson, C. C., Byers, B. P., Walton, E. M. and McKnight, S. L. (1991). Identification of Ets- and Notch-related subunits in GA binding protein. Science 253, 789-792.
- Langer, S. J., Bortner, D. M., Roussel, M. F., Sherr, C. J. and Ostrowski, M. C. (1992). Mitogenic signaling by colony-stimulating factor 1 and ras is suppressed by the *ets-2* DNA-binding domain and restored by myc overexpression. Mol. Cell. Biol. 12, 5355-5362.
- Laudet, V., Niel, C., Duterque-Coquillaud, M., Leprince, D. and Stéhelin, D. (1993). Evolution of the ets gene family. Biochem. Biophys. Res. Com. 190, 8-14.
- Lautenberger, J. A., Burdett, L. A., Gunnell, M. A., Qi, S., Watson, D. K., O'Brien, S. J. and Papas, T. S. (1992). Genomic dispersal of the *ets* gene family during metazoan evolution. Oncogene *7*, 1713-1719.
- Lautenberger, J. A. and Papas, T. S. (1993). Inversion of a chicken *ets-1* proto-oncogene segment in avian leukemia virus E26. J.Virol. *67*, 610-612.
- Leiden, J. M., Wang, C. Y., Petryniak, B., Markovitz, D. M., Nabel, G. J. and Thompson, C. B. (1992). A Novel Ets-Related Transcription Factor, *Elf-1*, Binds to Human Immunodeficiency Virus Type-2 Regulatory Elements That Are Required for Inducible trans Activation in T-Cells. J. Virol. 66, 5890-5897.
- Lekanne-Deprez, R., Riegman, P. H. J., Groen, N. A., Warringa, U. L., van Biezen, N. A., Molijn, A. C., Bootsma, D., de Jong, P. J., Menon, A. G., Kley, N. A., Seizinger, B. R. and Zwarthoff, E. C. (1995). Cloning and characterization of MN1, a gene from chromosome 22q11, which is disrupted by a balanced translocation in a meningioma. Oncogene 10, 1521-1528.

- Lelièvre-Chotteau, A., Laudet, V., Flourens, A., Bègue, A., Leprince, D. and Fontaine, F. (1994). Identification of two ets related genes in a marine worm, the polychaete annelid nereis diversicolor. FEBS Letters 354, 62-66.
- Lemarchandel, V., Ghysdael, J., Mignotte, V., Rahuel, C. and Romeo, P. H. (1993). GATA and Ets cis-acting sequences mediate megakaryocyte-specific expression. Mol. Cell. Biol. 13, 668-676.
- Leprince, D., Gégonne, A., Coll, J., de Taisne, C., Schneeberger, C., Lagrou, C. and Stéhelin, D. (1983). A putative second cell-derived oncogene of the avian leukaemia retrovirus E26. Nature 306, 395-397.
- 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., Gesquière, J. C. and Stéhelin, D. (1990). The chicken cellular progenitor of the *v-ets* oncogene, p68^{c-ets-1}, is a nuclear DNA-binding protein not expressed in lymphoid cells of the spleen. Onc. Res. *5*, 255-265.
- Leprince, D., Crépieux, P. and Stéhelin, D. (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 Stéhelin, D. (1993). A new mechanism of oncogenic activation: E26 retroviral v-ets oncogene has inverted the C-terminal end of the transcription factor c-ets-1. Virology 194, 855-857.
- Lessnick, S. L., Braun, B. S., Denny, C. T. and May, W. A. (1995). Multiple domains mediate transformation by the ewing's sarcoma EWS/FLI-1 fusion gene. Oncogene 10, 423-431.
- Lewin, B. (1991). Oncogenic conversion by regulatory changes in transcription factors. Cell *64*, 303-312.
- Li, R. P., Duterque-Coquillaud, M., Lagrou, C., Debuire, B., Graf, T., Stéhelin, D. and Leprince, D. (1989). A single amino-acid substitution in the DNA-binding domain of the *myb* oncogene confers a thermolabile phenotype to E26-transformed myeloid cells. Onc. Res. 5, 137-141.
- Liang, H., Olejniczak, E. T., Mao, X., Nettesheim, D. G., Yu, L., Thompson, C. B. and Fesik, S. W. (1994a). The secondary structure of the *ets* domain of human Fli-1 resembles that of the helix-turn-helix DNA-binding motif of the Escherichia coli catabolite gene activator protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *91*, 11655-11659.
- Liang, H., Mao, X., Olejniczak, E. T. and Nettesheim, D. G. (1994b). Solution structure of the ets domain of Fli-1 when bound to DNA. Nature Structural Biol. 1, 871.

- Lim, F., Kraut, N., Frampton, J. and Graf, T. (1992). DNA binding by *c-ets-1*, but not *v-ets* is repressed by an intramolecular mechanism. EMBO J. 11, 643-652.
- Lopez, M., Oettgen, P., Akbarali, Y., Dendorfer, U. and Libermann, T. A. (1994). ERP, a new member of the ets transcription factor/oncoprotien family: cloning characterization, and differential expression during B-lymphocyte development. Mol. Cell. Biol. 14, 3292-3309.
- Lux.S.E., John, M. and Bennett, V. (1990). Analysis of cDNA for human erythrocyte ankyrin indicates a repeated structure with homology to tissue-differentiation and cell-cycle control proteins. Nature 344, 36-42.
- Macleod, K., Leprince, D. and Stéhelin, D. (1992). The *ets* Gene Family. Trends Biochem. Sci. 17, 251-256.
- Majerus, M. A., Bibollet-Ruche, F., Telliez, J. B., Wasylyk, B. and Bailleul, B. (1992). Serum, AP-1 and Ets-1 stimulate the human ets-1 promoter. Nucl. Acids. Res. 20, 2699-2703.
- Mao, X. H., Miesfeldt, S., Yang, H. D., Leiden, J. M. and Thompson, C. B. (1994). The FLI-1 and chimeric EWS-FLI-1 oncoproteins display similar DNA binding specificities. J. Biol. Chem. 269, 18216-18222.
- Marais, R., Wynne, J. and Treisman, R. (1993). The SRF accessory protein elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain. Cell 73, 381-393.
- Mavrothalassitis, G. J., Watson, D. K. and Papas, T. S. (1990a). Molecular and functional characterization of the promoter of ETS2, the human *c-ets-2* gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *87*, 1047-1051.
- Mavrothalassitis, G. J., Watson, D. K., and Papas, T. S. (1990b). The human ETS-2 gene promoter: molecular dissection and nuclease hypersensitivity. Oncogene 5, 1337-1342.
- Mavrothalassitis, G. J. and Papas, T. S. (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 Diff. 2, 215-224.
- Mavrothalassitis, G., Fisher, R. J., Smyth, F., Watson, D. K. and Papas, T. S. (1994).
 Structural interferences of the ETS1 DNA-binding domain determined by mutational analysis. Oncogene 9, 425-435.
- May, W. A., Gishizky, M. L., Lessnick, S. L., Lunsford, L. B., Lewis, B. C., Delattre, O., Zucman, J., Thomas, G. and Denny, C. T. (1993). Ewing sarcoma 11-22 translocation produces a chimeric transcription factor that requires the DNA-Binding domain encoded by FLI1 for transformation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 5752-5756.

- McCaffrey, P. G., Luo, C., Kerppola, T. K., Jain, J., Badalian, T. M., Ho, A. M., Burgeon, E., Lane, W. S., Lambert, J. N., Curran, T., Verdine, G. L., Rao, A. and Hogan, P. G. (1993). Isolation of the cyclosporin-sensitive T cell transcription factor NFATp. Science 262, 750-754.
- McCracken, S., Leung, S., Bosselut, R., Ghysdael, J. and Miyamoto, N. G. (1994). Myb and ets related transcription factors are required for activity of the human *lck* type I promoter. Oncogene *9*, 3609-3615.
- McNagny, K., Grieser, S. and Graf, T. (1992). Cell surface proteins expressed by transformed multipotent/erythroid progenitors and eosinophils detected by novel monoclonal antibodies. Leukemia *6*, 975-984.
- 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.
- Metz, T. and Graf, T. (1992). The nuclear oncogenes *v-erbA* and *v-ets* cooperate in the induction of avian erythroleukemia. Oncogene 7, 597-605.
- Meyer, D., Wolff, C. M., Stiegler, P., Senan, F., Befort, N., Befort, J. J. and Remy, P. (1993). XI-Fli, the xenopus homologue of the *fli-1* gene, is expressed during embryogenesis in a restricted pattern evocative of neural crest cell distribution. Mech. Develop. 44, 109-121.
- Mignotte, V., Lemarchandel, V. and Roméo, P.-H. (1995). GATA et ets : deux familles de déterminants majeurs de la différenciation hématopoïétique. Hématologie 1, 19-30.
- Misawa, Y. (1992). Amplification and rearrangement of melF/mouse CD43 (leukosialin) gene encoding a highly glycosylated membrane protein gp120 in friend erythroleukemia cells. Oncogene 7, 919-926.
- Monte, D., Baert, J. L., Defossez, P. A., De Launoit, Y. and Stéhelin, D. (1994). Molecular cloning and characterization of human ERM, a new member of the ETS family closely related to mouse PEA3 and ER81 transcription factors. Oncogene *9*, 1397-1406.
- Moreau-Gachelin, F., Tavitian, A. and Tambourin, P. (1988). Spi-1 is a putative oncogene in virally induced murine erythroleukemia. Nature 331, 277-280.
- Moreau-Gachelin, F., Ray, D., Mattei, M. G., Tambourin, P. and Tavitian, A. (1989). The putative oncogene Spi-1: murine chromosomal localization and transcriptional activation in murine acute erythroleukemias. Oncogene 4, 1449-1456.
- Moreau-Gachelin, F. (1994). Spi-1/PU.1: an oncogene of the *ets* family. Biochim. Biophys. Acta 1198, 149-163.

- 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 Moscovici, M. G. (1981). Myeloid and erythroid neoplasic responses to avian defective leukemia viruses in chicken and in quail. Virology 113, 765-768.
- Moscovici, M. G., Jurdic, P., Samarut, J., Gazzolo, L., Mura, C. V. and Moscovici, C. (1983). Characterization of the hematopoietic target cells for the avian leukemia virus E26. Virology 129, 65-78.
- Moulton, K. S., Semple, K., Wu, H. and Glass, C. K. (1994). Cell-specific expression of the macrophage scavenger receptor gene is dependent on PU.1 and a composite AP-1 ets motif. Mol. Cell. Biol. 14, 4408-4418.
- Murakami, K., Mavrothalassitis, G., Bhat, N. K., Fisher, R. J. and Papas, T. S. (1993). Human ERG-2 is a phosphorylated DNA-binding protein, a distinct member of the ets family. Oncogene *8*, 1559-1566.
- Nerlov, C., Rorth, P., Blasi, F. and Johnsen, M. (1991). Essential AP-1 and PEA3 binding elements in the human urokinase enhancer display cell type-specific activity. Oncogene *6*, 1583-1592.
- Nerlov, C., De Cesare, D., Pergola, F., Caraccliolo, A., Blasi, F., Johnsen, M. and Verde, P. (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. EMBO J. 11, 4573-4582.
- 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.
- Ness, S. A., Kowenz-Leutz, E., Casini, T., Graf, T. and Leutz, A. (1993). Combinatorial activators of myeloid genes in heterologous cell types. Genes Dev. 7,749-759.
- Nibbs, R. J. B., Itoh, K., Ostertag, W. and Harrison, P. R. (1993). Differentiation arrest and stromal Cell-Independent growth of murine erythroleukemia cells are associated with elevated expression of ets-Related genes but not with mutation of p53. Mol. Cell. Biol. 13, 5582-5592.
- Niewolik, D., Vojtesek, B. and Kovarik, J. (1995). p53 derived from human tumour cell lines and containing distinct point mutations can be activated to bind its consensus target sequence. Oncogene 10, 881-890.
- Nothias, J.-Y., Weinmann, R., Blangy, D. and Melin, F. (1993). Analysis of transcription factors binding to the duplicated PEA1 and PEA3 sites that are required for polyomavirus mutant expression in PCC4 embryonic carcinoma cells. J. Virol. 67, 3036-3047.

- 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., Weiher, H., Bullock, P. and Duesberg, P. (1984). Avian erythroblastosis virus E26: nucleotide sequence of the tripartie onc gene and of the LTR, and analysis of the cellular prototype of the viral *ets* sequence. Virology *139*, 330-339.
- Nunn, M. F. and Hunter, T. (1989). The *ets* sequence is required for induction of erythroblastosis in chickens by avian retrovirus E26. J. Virol. *63*, 398-402.
- 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 Development 6, 975-990.
- O'Neill, E. M., Rebay, I., Tjian, R. and Rubin, G. M. (1994). The activities of two Etsrelated transcription factors required for drosophila eye development are modulated by the Ras/MAPK pathway. Cell 78, 137-147.
- Ohno, T., Rao, V. N. and Reddy, E. S. P. (1993). EWS/Fli-1 chimeric protein is a transcriptional activator. Cancer Res. *53*, 5859-5863.
- Ohno, T., Ouchida, M., Lee, L., Gatalica, Z., Rao, V. N. and Reddy, E. S. P. (1994). The EWS gene, involved in ewing family of tumors, malignant melanoma of soft parts and desmoplastic small round cell tumors, codes for an RNA binding protein with novel regulatory domains. Oncogene *9*, 3087-3097.
- Oka, T., Rairkar, A. and Chen, J. H. (1991). Structural and functional analysis of the regulatory sequences of the *cts-1* gene. Oncogene *6*, 2077-2083.
- Pahl, H. L., Scheibe, R. J., Zhang, D. E., Chen, H. M., Galson, D. L., Maki, R. A. and Tenen, D. G. (1993). The proto-oncogene PU.1 regulates expression of the myeloid-specific CD11b promoter. J. Biol. Chem. 268, 5014-5020.
- Pankov, R., Neznanov, N., Umezawa, A. and Oshima, R. G. (1994). AP-1, ETS, and transcriptional silencers regulate retinoic acid-dependent induction of keratin 18 in embryonic cells. Mol. Cell. Biol. 14, 7744-7757.
- Papadopoulos, P., Ridge, S. A., Boucher, C. A., Stocking, C. and Wiedemann, L. M. (1995). The novel activation of ABL by fusion to an *ets*-related gene, TEL. Cancer Res. *55*, 34-38.
- Pardanaud, L. and Dieterlenlievre, F. (1993). Expression of C-ETS1 in early chick embryo mesoderm relationship to the hemangioblastic lineage. Cell. Adhes. Commun. 1, 151-160.
- Paul, R., Schuetze, S., Kozak, S. L., Kozak, C. A. and Kabat, D. (1991). The Sfpi-1 proviral integration site of Friend erythroleukemia encodes the ets-related transcription factor PU.1. J. Virol. 65, 464-467.

- Plaza, S., Grévin, D., Macleod, K., Stéhelin, D. and Saule, S. (1994). Pax-QNR/pax-6, a paired- and homeo-box containing protein, recognizes *ets-*binding sites and can alter the transactivating properties of ets transcription factors. Gene Expression *4*, 43-52.
- Pognonec, P., Boulukos, K. E., Gesquière, J. C., Stéhelin, D. and Ghysdael, J. (1988).
 Mitogenic stimulation of thymocytes results in the calcium-dependent phosphorylation of c-ets-1 proteins. EMBO J. 7, 977-983.
- Pognonec, P., Boulukos, K. E. and Ghysdael, J. (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 Ghysdael, J. (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.
- Pongubala, J. M. R., Nagulapalli, S., Klemsz, M. J., Mckercher, S. R., Maki, R. A. and Atchison, M. L. (1992). PU.1 recruits a second nuclear factor to a site important for immunoglobulin k 3' enhancer activity. Mol. Cell. Biol. 12, 368-378.
- Pongubala, J. M. R., Vanbeveren, C., Nagulapalli, S., Klemsz, M. J., Mckercher, S. R., Maki, R. A. and Atchison, M. L. (1993). Effect of pu.1 phosphorylation on interaction with NF-Em5 and transcriptional activation. Science 259, 1622-1625.
- Prasad, D. D. K., Ouchida, M., Lee, L., Rao, V. N. and Reddy, E. S. P. (1994). TLS/FUS fusion domain of TLS/FUS-erg chimeric protein resulting from the t(16;21) chromosomal translocation in human myeloid leukemia functions as a transcriptional activation domain. Oncogene *9*, 3717-3729.
- Pribyl, L. J., Watson, D. K., McWilliams, M. J., Ascione, R. and Papas, T. S. (1987). Characterization of the ets-2 gene in drosophila melanogaster. In Advances in Gene Technology: The Molecular Biology of Development. Cambridge, Cambridge Univ. Press. 93.
- Pribyl, L. J., Watson, D. K., McWilliams, M. J., Ascione, R. and Papas, T. S. (1988). The Drosophila *ets-*2 gene: molecular structure, chromosomal localization, and developmental expression. Dev. Biol. *127*, 45-53.
- Pribyl, L. J., Watson, D. K., Schulz, R. A. and Papas, T. S. (1991). D-elg, a member of the Drosophila *ets* gene family: sequence, expression and evolutionary comparison. Oncogene *6*, 1175-1183.
- Price, M. A., Rogers, A. E. and Treisman, R. (1995). Comparative analysis of the ternary complex factors Elk-1, Sap-1a and Sap-2 (Erp/Net). EMBO J. 14, 2589-2601.

- Queva, C., Leprince, D., Stehelin, D. and Vandenbunder, B. (1993). p54c-ets-1 and p68c-ets-1, the two transcription factors encoded by the c-ets-1 locus, are differentially expressed during the development of the chick embryo. Oncogene 8, 2511-2520.
- Rabault, B. and Ghysdael, J. (1994). Calcium-induced phosphorylation of ETS1 inhibits its specific DNA binding activity. J. Biol. Chem. 269, 28143-28151.
- Rabbitts, T. H., Forster, A., Larson, R. and Nathan, P. (1993). Fusion of the dominant negative transcription regulator CHOP with a novel gene FUS by translocation t(12;16) in malignant liposarcoma. Nat. Genet. 4, 175-180.
- 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.
- Ramakrishnan, V., Finch, J. T., Graziano, V., Lee, P. L. and Sweet, R. M. (1993). Crystal structure of globular domain of histone H5 and its implications for nucleosome binding. Nature 362, 219-223.
- Rao, V. N., Papas, T. S. and Reddy, E. S. (1987). *erg*, a human *ets*-related gene on chromosome 21: alternative splicing, polyadenylation, and translation. Science 237, 635-639.
- Rao, V. N., Huebner, K., Isobe, M., AR-Rushdi, A., Croce, C. M. and Reddy, E. S. (1989). elk, tissue-specific ets-related genes on chromosomes X and 14 near translocation breakpoints. Science 244, 66-70.
- Rao, V. N. and Reddy, E. S. P. (1992a). 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.
- Rao, V. N. and Reddy, E. S. P. (1992b). elk-1 Domains Responsible for Autonomous DNA Binding, SRE-SRF Interaction and Negative Regulation of DNA Binding. Oncogene 7, 2335-2340.
- Rao, V. N. and Reddy, E. S. P. (1993). Delk-1, a variant of *elk-1*, fails to interact with the serum response factor and binds to DNA with modulated specificity. Canc. Res. 53, 215-220.
- Rao, V. N., Ohno, T., Prasad, D. D. K., Bhattacharya, G. and Reddy, E. S. P. (1993). Analysis of the DNA-Binding and transcriptional activation functions of human fli-1 protein. Oncogene *8*, 2167-2173.
- Ravel-Chapuis, P., Leprince, D., Pain, B., Li, R., Domenget, C., Stehelin, D., Samarut, J. and Jurdic, P. (1991). *v-myb* and *v-ets* cooperate for the mitogenic stimulation of primary fibroblasts by avian E26 retrovirus. J. Virol. 65, 3928-3931.

- Reddy, E. S. and Rao, V. N. (1988). Structure, expression and alternative splicing of the human *c-ets-1* proto-oncogene. Onc. Res. *3*, 239-246.
- Reddy, E. S. and Rao, V. N. (1990). Localization and modulation of the DNA-binding activity of the human *c-ets-1* protooncogene. Cancer Res. *50*, 5013-5016.
- Reddy, M. A., Langer, S. J., Colman, M. S. and Ostrowski, M. C. (1992). An enhencer element responsive to *rus* and fms signaling pathways is composed of two distinct nuclear factor binding sites. Mol. Endocrinol. *6*, 1051-1060.
- Reddy, M. A., Yang, B. S., Yue, X., Barnett, C. J. K., Ross, I. L., Sweet, M. J., Hume, D. A. and Ostrowski, M. C. (1994). Opposing actions of *c-ets/PU.1* and *c-myb* protooncogene products in regulating the macrophage-specific promoters of the human and mouse colony-stimulating factor-1 receptor (*c-fms*) genes. J. Exp. Med. 180, 2309-2319.
- Rivera, R. R., Stuiver, M. H., Steenberger, R. and Murre, C. (1993). Ets proteins : new factors that regulate immunoglobulin heavy-chain gene expression. Mol. Cell. Biol. 13, 7163-7169.
- Robertson, L. M., Kerppola, T. K., Vendrell, M., Luk, D., Smeyne, R. J., Bocchiaro, C., Morgan, J. I. and Curran, T. (1995). Regulation of *c-fos* expression in transgenic mice requires multiple interdependent transcription control elements. Neuron 14, 241-252.
- Rogers, S., Wells, R. and Rechsteine, M. (1986). Amino acids sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. Science 234, 364-368.
- Romano-Spica, V., Suzuki, H., Georgiou, P., Chen, S. L., Ascione, R., Papas, T. S. and Bhat, N. (1994). Expression of ets family genes in hematopoietic cells. Int. J. Oncol. 4, 521-531.
- Rorth, P., Nerlov, C., Blasi, F. and Johnsen, M. (1990). Transcription factor PEA3 participates in the induction of urokinase plasminogen activator transcription in murine keratinocytes stimulated with epidermal growth factor or phorbol-ester. Nucl. Acids Res. 18, 5009-5017.
- Rosenthal, D. (1987). Oncology and Immunology of Down Syndrome. New York,
- Ross, I. L., Dunn, T. L., Yue, X., Roy, S., Barnett, C. J. L. and Hume, D. A. (1994). Comparison of the expression and function of the transcription factor PU.1 (SPI-1 proto-oncogene) between murine macrophages and B lymphocytes. Oncogene *9*, 121-132.
- Roussel, M., Saule, S., Lagrou, C., Rommens, C., Beug, H., Graf, T. and Stéhelin, D. (1979). Three new types of viral oncogenes of cellular origin specific for hematopoietic cell transformation. Nature 281, 452-455.

- Roussel, M. F., Davis, J. N., Cleveland, J. L., Ghysdael, J. and Hiebert, S. W. (1994). Dual control of *myc* expression through a single DNA binding site targeted by *ets* family proteins and E2F-1. Oncogene *9*, 405-415.
- Ruscetti, S., Aurigemma, R., Yuan, C. C., Sawyer, S. and Blair, D. G. (1992). Induction of Erythropoietin Responsiveness in Murine Hematopoietic Cells by the gag-myb-ets-Containing ME26 Virus. J. Virol 66, 20-26.
- Sacchi, N., Watson, D. K., Guertis van Kessel, A. D., Hagemeijer, A., Kersey, J., Drabkin, H. D., Patterson, D. and Papas, T. S. (1986). *Hu-ets-1* and *Hu-ets-2* genes are transposed in acute leukemias with (4;11) and (8;21) translocations. Science 231, 379-382.
- Sacchi, N., Gusella, J. G., Perroni, L., Bricarelli, F. D. and Papas, T. S. (1988a). Lack of evidence for association of meiotic nondisjunction wih particular DNA haplotypes on chromosome 21. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 4794-4798.
- Sacchi, N., Nalbantoglu, J., Sergovich, F. R. and Papas, T. S. (1988b). Human ETS2 gene on chromosome 21 is not rearranged in Alzheimer disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 7675-7679.
- Salmon, P., Giovane, A., Wasylyk, B. and Klatzmann, D. (1993). Characterization
 of the human CD4 gene promoter transcription from the CD4 gene core promoter
 is Tissue-Specific and is activated by ets proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90,
 7739-7743.
- Sato, H., Takino, T., Okada, Y., Cao, J., Shinagawa, A., Yamamoto, E. and Seiki, M. (1994). A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. Nature *370*, 61-65.
- Saule, S., Roussel, M., Lagrou, C. and Stéhelin, D. (1981). Characterization of the oncogene (*crb*) of avian erythroblastosis virus and be cellular progenitor. J. Virol. 38, 409-419.
- Sawyers, C. L. and Denny, C. T. (1994). Chronic myelomonocytic leukemia Tel-A-Kinase what ETS all about. Cell 77, 171-173.
- 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.
- Scholz, H., Deatrick, J., Klaes, A. and Klambt, C. (1993). Genetic dissection of pointed, a drosophila gene encoding 2 ETS-Related proteins. Genetics 135, 455-468.
- Schuetze, S., Paul, R., Gliniak, B. C. and Kabat, D. (1992). Role of the PU.1 transcription factor in controlling differentiation of Friend erythroleukemia cells. Mol. Cell. Biol. 12, 2967-2975.
- Schuetze, S., Stenberg, P. E. and Kabat, D. (1993). The Ets-Related transcription factor PU.1 immortalizes erythroblasts. Mol. Cell. Biol. 13, 5670-5678.

- Schultz, S. C., Shields, G. C. and Steitz, T. A. (1991). Crystal structure of a CAP-DNA complex: the DNA is bent by 90°. Science 25, 1001-1007.
- Schulz, R. A., The, S. M., Hogue, D. A., Galewsky, S. and Guo, Q. (1993a). Ets Oncogene-Related gene *elg* functions in drosophila oogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *90*, 10076-10080.
- Schulz, R. A., Hogue, D. A. and The, S. M. (1993b). Characterization of lethal alleles of D-Elg, an ETS Proto-Oncogene related gene with multiple functions in drosophila development. Oncogene *8*, 3369-3374.
- Scott, E. W., Simon, M. C., Anastasi, J. and Singh, H. (1994). Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. Science 265, 1573-1577.
- Seneca, S., Punyammalee, B., Bailly, M., Ghysdael, J. and Crabeel, M. (1991). Ets1, when fused to the GAL4 DNA binding domain, efficiently enhances galactose promotor dependent gene expression in yeast. Oncogene 6, 357-360.
- Seth, A., Watson, D. K., Blair, D. G. and Papas, T. S. (1989). *c-ets-2* protooncogene has mitogenic and oncogenic activity. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A *86*, 7833-7837.
- Seth, A. and Papas, T. S. (1990). The *c-ets-1* proto-oncogene has oncogenic activity and is positively autoregulated. Oncogene 5, 1761-1767.
- Seth, A., Ascione, R., Fisher, R. J., Mavrothalassitis, G. J., Bhat, N. K. and Papas, T. S. (1992). The *ets* gene family. Cell. Growth Diff. *3*, 327-334.
- Seth, A., Robinson, L., Thompson, D. M., Watson, D. K. and Papas, T. S. (1993). Transactivation of GATA-1 promoter with ETS1, ETS2 and ERGB/Hu-FLI-1 proteins stabilization of the ets1 protein binding on GATA-1 promoter sequences by monoclonal antibody. Oncogene *8*, 1783-1790.
- Shaw, P. E., Schröter, H. and Nordheim, A. (1989). The ability of a ternary complex to form over the serum response element correlates with serum inducibility of the human c-fos promoter. Cell *56*, 563-572.
- Shelley, C. S., Farokhzad, O. C. and Arnaout, M. A. (1993). Identification of cell-specific and developmentally regulated nuclear factors that direct myeloid and lymphoid expression of the CD11 a gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *90*, 5364-5368.
- Shimizu, K., Ichikawa, H., Tojo, A., Kaneko, Y., Maseki, N., Hayashi, Y., Ohira, M., Asano, S. and Ohki, M. (1993). An *ets*-Related gene, ERG, is rearranged in human myeloid leukemia with t(16;21) chromosomal translocation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *90*, 10280-10284.
- Shin, M. K. and Koshland, M. E. (1993). Ets-related protein PU.1 regulates expression of the immunoglobulin J-chain gene through a novel Ets-binding element. Genes Dev. 7, 2006-2015.

- Shore, P. and Sharrocks, A. D. (1994). The transcription factors Elk-1 and serum response factor interact by direct protein-protein contacts mediated by a short region of Elk-1. Mol. Cell. Biol. 14, 3283-3291.
- Shore, P., Bisset, L., Lakey, J., Waltho, J. P., Virden, R. and Sharrocks, A. D. (1995). Characterization of the *elk-1* ETS DNA-binding domain. J. Biol. Chem. *270*, 5805-5811.
- Siddique, H. R., Rao, V. N., Lee, L. and Reddy, E. S. P. (1993). Characterization of the DNA binding and transcriptional activation domains of the erg protein. Oncogene 8, 1751-1755.
- 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.
- Sorensen, P. H. B., Lessnick, S. L., Lopezterrada, D., Liu, X. F., Triche, T. J. and Denny, C. T. (1994). A second Ewing's sarcoma translocation t(11;22) fuses the *Ews* gene to another Ets family transcription factor, ERG. Nature Genet. *6*, 146-151.
- Sorensen, P. H. B., Shimada, H., Liu, X. F., Lim, J. F., Thomas, G. and Triche, T. J. (1995). Biphenotypic sarcomas with myogenic and neural differentiation express the ewing's sarcoma EWS/FLI1 fusion gene. Cancer Res. *55*, 1385-1392.
- Stemple, D. L. and Anderson, D. J. (1992). Isolation of a stem cell for neurons and glia from the mammalian neural crest. Cell 71, 973-985.
- Stiegler, P., Wolff, C. M., Baltzinger, M., Hirtzlin, J., Senan, F., Meyer, D., Ghysdael, J., Stehelin, D., Befort, N. and Remy, P. (1990). Characterization of Xenopus laevis cDNA clones of the *c-cts-1* proto-oncogene. Nucl. Acids Res. 18, 5298.
- Stiegler, P., Wolff, C. M., Meyer, D., Senan, F., Durliat, M., Hourdey, J., Befort, N. and Remy, P. (1993). The *c-ets-1* proto-oncogenes in Xenopus Laevis: expression during oogenesis and embryogenesis. Mech. Develop. *41*, 163-174.
- Storz, G., Tartaglia, L. A. and Ames, B. N. (1990). Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation. Science 248, 189-194.
- Suzuki, H., Romano-Spica, V., Papas, T. S. and Bhat, N. K. (1995). Ets-1 suppresses tumorigenicity of human colon cancer cells. Proc. Natl. Acad. Sci. *92*, 4442-4446.
- Swain, A. and Coffin, W. (1992). Mechanism of transduction by retroviruses. Science 255, 841-844.
- Tei, H., Nihonmatsu, I., Yokokura, T., Ueda, R., Sano, Y., Okuda, T., Sato, K., Hirata, K., Fujita, S. C. and Yamamoto, D. (1992). pokkuri, a Drosophila Gene Encoding an E-26-Specific (Ets) Domain Protein, Prevents Overproduction of the R7 Photoreceptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 6856-6860.

- 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). cisacting sequences required for inducible interleukin-2 enhancer function bind a novel Ets-related protein, Elf-1. Mol. Cell. Biol. 12, 1043-1053.
- Thompson, C. C., Brown, T. A. and McKnight, S. L. (1991). Convergence of Etsand notch-related structural motifs in a heteromeric DNA binding complex [see comments]. Science 253, 762-768.
- Thompson, C. C. and McKnight, S. L. (1992). Anatomy of an enhancer. Trends Genet. 8, 232-236.
- Thummel, C. S., Burtis, K. C. and Hogness, D. S. (1990). Spatial and temporal patterns of E74 transcription during drosophila development. Cell *61*, 101-111.
- Toledano, M. B. and Leonard, W. J. (1991). Modulation of transcription factor NF-kB binding activity by oxidation-reduction *in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 4328-4332.
- Treisman, R., Marais, R. and Wynne, J. (1992). Spatial Flexibility in Ternary Complexes Between SRF and Its Accessory Proteins. EMBO J. 11, 4631-4640.
- Trimble, M. S., Xin, J. H., Guy, C. T., Muller, W. J. and Hassell, J. A. (1993). PEA3 is overexpressed in mouse metastatic mammary adenocarcinomas. Oncogene 8, 3037-3042.
- Tsichlis, P. N., Shepherd, B. M. and Bear, S. E. (1989). Activation of the Mlvi-1/mis1/pvt-1 locus in Moloney murine leukemi virus-induced T-cell lymphomas. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *86*, 5487-5491.
- Urness, L. D. and Thummel, C. S. (1990). Molecular interactions within the ecdysone regulatory hierarchy: DNA binding properties of the Drosophila ecdysone-inducible E74A protein. Cell 63, 47-61.
- Vandenbunder, B., Pardanaud, L., Jaffredo, T., Mirabel, M. A. and Stehelin, 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 107, 265-274.
- Virbasius, J. V. and Scarpulla, R. C. (1991). Transcriptional activation through ETS domain binding sites in the cytochrome c oxidase subunit IV gene. Mol. Cell. Biol. 11, 5631-5638.
- Vojtesek, B., Dolezalova, H., Lauerova, L., Svitakova, M., Havlis, P., Kovarik, J., Midgley, C. A. and Lan, D. P. (1995). Conformational changes in p53 analysed using new antibodies to the core DNA binding domain of the protein. Oncogene 10, 389-393.
- Vuister, G. W., Kim, S.-J., Wu, C. and Bax, A. (1994). NMR evidence for similarities between the DNA-binding regions of drosophia melanogaster heat shock factor and the helix-turn-helix and HNF-3/forkhead families of transcription factors. Biochemistry 33, 10-16.

- Walker, S., Hayes, S. and O'Hare, P. (1994). Site-specific conformational alteration of the Oct-1 POU domain-DNA complex as the basis for differential recognition by Vmw65 (VP16). Cell 79, 841-852.
- Wang, C. Y., Petryniak, B., Ho, I. C., Thompson, C. B. and Leiden, J. M. (1992). Evolutionarily conserved Ets family members display distinct DNA binding specificities. J. Exp. Med. 175, 1391-1399.
- Wang, C. Y., Petryniak, B., Thompson, C. B., Kaelin, W. G. and Leiden, J. M. (1993). Regulation of the Ets-Related transcription factor *elf-1* by binding to the retinoblastoma protein. Science 260, 1330-1335.
- Wang, Y., Kayman, S. C., Li, J. P. and Pinter, A. (1993). Erythropoietin receptor (EpoR)-dependent mitogenicity of spleen focus-forming virus correlates with vial pathogenicity and processing of env protein but no with formation of gp52-EpoR complexes in the endoplasmic reticulum. J. Virol. 67, 1322-1327.
- Wasylyk, C., Flores, P., Gutman, A. and Wasylyk, B. (1989). PEA3 is a nuclear target for transcription activation by non-nuclear oncogenes. EMBO J. 8, 3371-3378.
- Wasylyk, B., Wasylyk, C., Flores, P., Begue, A., Leprince, D. and Stehelin, 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.
- 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. Gene Dev. 6, 965-974.
- Wasylyk, C. and Wasylyk, B. (1992). Oncogenic Conversion Alters the Transcriptional Properties of ets. Cell Growth Dif. 3, 617-625.
- Wasylyk, C. and Wasylyk, B. (1993). Oncogenic conversion of Ets affects redox regulation *in vivo* and *in vitro*. Nucl. Acids. Res. 21, 523-529.
- Wasylyk, C., Maira, S. M., Sobieszczuk, P. and Wasylyk, B. (1994). Reversion of ras transformed cells by ets transdominant mutants. Oncogene *9*, 3665-3673.
- Watanabe, H., Sawada, J., Yano, K., Yamaguchi, K., Goto, M. and Handa, H. (1993). cDNA cloning of transcription factor E4TF1 subunits with ets and notch motifs. Mol. Cell. Biol. 13, 1385-1391.
- Watson, D. K., McWilliams-Smith, M. J., Nunn, M. F., Duesberg, P. H., O'Brien, S. J. and Papas, T. S. (1985). The ets sequence from the transforming gene of avian erythroblastosis virus, E26, has unique domains on human chromosomes 11 and 21: both loci are transcriptionally active. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 7294-7298.

- Watson, D. K., McWilliams-Smith, M. J., Kozak, C., Reeves, R., Gearhart, J., Nunn, M. F., Nash, W., Fowle, J. I., Duesberg, P., Papas, T. S. and O'Brien, S. J. (1986). Conserved chromosomal positions of dual domains of the *ets* protooncogene in cats, mice, and humans. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A *83*, 1792-1796.
- Watson, D. K., McWilliams, M. J. and Papas, T. S. (1988a). Molecular organization of the chicken *ets* locus. Virology *164*, 99-105.
- Watson, D. K., McWilliams, M. J., Lapis, P., Lautenberger, J. A., Schweinfest, C. W. and Papas, T. S. (1988b). Mammalian ets-1 and ets-2 genes encode highly conserved proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 7862-7866.
- Watson, D. K., Mavrothalassitis, G. J., Jorcyk, C. L., Smyth, F. E. and Papas, T. S. (1990). Molecular organization and differential polyadenylation sites of the human ETS2 gene. Oncogene *5*, 1521-1527.
- Welte, T., Garimorth, K., Philipp, S., Jennewein, P., Huck, C., Cato, A. C. B. and Doppler, W. (1994). Involvement of ets-related proteins in hormone-independent mammary cell-specific gene expression. Eur. J. Biochem. 223, 997-1006.
- Wen, S. C., Ku, D. H., Deluca, A., Claudio, P. P., Giordano, A. and Calabretta, B. (1995). Ets-2 regulates cdc2 kinase activity in mammalian cells: coordinated expression of cdc2 and cyclin a. Exp. Cell. Res. 217, 8-14.
- Wernert, N., Raes, M. B., Lassalle, P., Dehouck, M. P., Gosselin, B., Vandenbunder, B. and Stehelin, D. (1992). *c-ets1* proto-oncogene is a transcription factor expressed in endothelial cells during tumor vascularization and other forms of angiogenesis in humans. Am. J. Pathol. *140*, 119-127.
- Wernert, N., Gilles, F., Fafeur, V., Bouali, F., Raes, M. B., Pyke, C., Dupressoir, T., Seitz, G., Vandenbunder, B. and Stehelin, D. (1994). Stromal expression of c-Ets1 transcription factor correlates with tumor invasion. Cancer Res. 54, 2003-888.

- Wessels, J. W., Fibbe, W. E., van der Keur, D., Landegent, J. E., van der Plas, D. C., den Ottolander, G. J., Roozendaal, K. J. and Beverstock, G. D. (1993). t(5;12)(q31;p12): a clinical entity with features of both myeloid leukemia and chronic myelomonocytic leukemia. Cancer Genet. Cytogenet. 65, 7-11.
- Weston, K. and Bishop, J. M. (1989). Transcriptional activation by the *v-myb* oncogene and its cellular progenitor, *c-myb*. Cell *58*, 85-93.
- Wharton, K. A., Johansen, M., Xu, T. and Artavanis-Tsakonas, S. (1985). Nucleotide sequence from the neurogenic locus notch implies a gene product that shares homology with proteins containing EGF-like repeats. Cell *43*, 567-581.
- Wilson, K. P., Shewchuk, L. M., Brennan, R. G., Otsuka, A. J. and Matthews, B. W. (1992). Escherichia coli biotin holoenzyme synthetase/bio repressor crystal structure delineates the biotin- and DNA-binding domains. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 9257-9261.

- Wolff, C. M., Stiegler, P., Baltzinger, M., Meyer, D., Ghysdael, J., Stehelin, D., Befort, N. and Remy, P. (1990). Isolation of two different *c-ets-2* proto-oncogenes in Xenopus laevis. Nucl. Acids Res. *18*, 4603-4604.
- Wolkowicz, R., Elkind, N. B., Ronen, D. and Rotter, V. (1995). The DNA binding activity of wild type p53 is modulated by blocking its various antigenic epitopes. Oncogene 10, 1167-1174.
- Wotton, D., Ghysdael, J., Wang, S., Speck, N. A. and Owen, M. J. (1994). Cooperative binding of Ets-1 and Core Binding Factor to DNA. Mol. Cell. Biol. 14, 840-850.
- Wu, H., Moulton, K., Horval, A., Parik, S. and Glass, C. K. (1994). Combinatorial interactions between AP-1 and ets domain proteins contribute to the developmental regulation of the macrophage scavenger receptor gene. Mol. Cell. Biol. 14, 2129-2139.
- Wu, Y. and Duesberg, P. (1994). Avian erythroblastosis virus E26 only one (Myb) of two Cell-Derived coding regions is necessary for oncogenicity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *91*, 4039-4043.
- Wurster, A. L., Siu, G., Leiden, J. M. and Hedrick, S. M. (1994). Elf-1 binds to a critical element in a second CD4 enhancer. Mol. Cell. Biol. 14, 6452-6463.
- Xin, J. H., Cowie, A., Lachance, P. and Hassell, J. A. (1992). Molecular cloning and characterization of PEA3, a new member of the Ets oncogene family that is differentially expressed in mouse embryonic cells. Genes Dev. 6, 481-496.
- Yoo, W., Martin, M. E. and Folk, W. R. (1991). PEA1 and PEA3 enhancer elements are primary components of the polyomavirus late transcription initiator element. J. Virol. 65, 5391-5400.
- Yuan, C. C., Kan, N., Dunn, K. J., Papas, T. S. and Blair, D. G. (1989) traperties of a murine retroviral recombinant of avian acute leukemia virus £25. a murine fibroblast assay for *v-ets* function. J.Virol 63, 205-215.
- Zhang, D. E., Hetherington, C. J., Chen, H. M. and Tenen, D. G. (1994). The macrophage transcription factor PU.1 directs Tissue-Specific expression of the macrophage Colony-Stimulating factor receptor. Mol. Cell. Biol. 14, 373-381.
- Zhang, J. and Temin, H. (1993a). Rate and mechanism of nonhomologous recombination during a single cycle of retroviral replication. Science 259, 234-238.
- Zhang, J. and Temin, H. (1993b). 3' junctions of oncogene-virus sequences and the mechanisms for formation of highly oncogenic retroviruses. J.Virol. 67, 1747-1751.
- Zhang, L. Q., Lemarchandel, V., Romeo, P. H., Bendavid, Y., Greer, P. and Bernstein, A. (1993). The fli-1 Proto-Oncogene, involved in erythroleukemia and ewings sarcoma, encodes a transcriptional activator with DNA-Binding specificities distinct from other ets family members. Oncogene 8, 1621-1630.

- Zon, L. I., Moreau, J. F., Koo, J. W., Mathey-Prevot, B. and D'Andrea, A. D. (1992). The erythropoietin receptor transmembrane region is necessary for activation by the Friend spleen focus-forming virus gp55 glycoprotein. Mol. Cell. Biol. 12, 2949-2957.
- Zucman, J., Delattre, O., Desmaze, C., Epstein, A. L., Stenman, G., Speleman, F., Fletcher, C. and Thomas, C. (1993a). EWS and ATF-1 gene fusion induced by t(12;22) translocatio in malignant melanoma of soft parts. Nature Genet. 4, 341-345.
- Zucman, J., Melot, T., Desmaze, C., Ghysdael, J., Plougastel, B., Peter, M., Zucker, J. M., Triche, T. J., Sheer, D., Turccarel, C., Ambros, P., Combaret, V., Lenoir, G., Aurias, A., Thomas, G., et al. (1993b). Combinatorial generation of variable fusion proteins in the ewing family of tumours. EMBO J. 12, 4481-4487.

