

50376
1998
319

**UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES
DE LILLE**

N° d'ordre

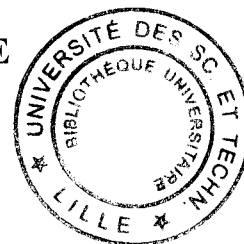
THESE

Présentée pour l'obtention du grade de:

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES
ET TECHNOLOGIES DE LILLE
EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

Par

Marie-Hélène CORDONNIER-DAVID



**ETUDE DU DOMAINE DE LIAISON A L'ADN
DE LA PROTEINE c-ABL HUMAINE.**

Soutenue le 2 Juin 1998 devant la Commission d'Examen:

Président:	Professeur J. P. BOHIN
Rapporteurs:	Docteur E. KÄS Docteur A. SERGEANT
Examineurs:	Docteur C. BAILLY Docteur J. COLL Docteur J.C. D'HALLUIN

Je remercie vivement Messieurs les Pr J.-P. Bohin, Dr A. Sergeant, Dr E. Käs, Dr C. Bailly et Dr J. Coll d'avoir accepté de juger ce travail.

Ce travail a été effectué au laboratoire d'Oncohématologie Moléculaire, Unité 124 INSERM, dirigé par le Dr M.-H. Loucheux-Lefebvre puis par le Dr J.-P. Kerckaert, je les remercie de m'avoir accueillie dans le laboratoire.

Je tiens à remercier le Dr J.-C. D'Halluin de m'avoir dirigée tout au long de cette étude. Je le remercie pour sa confiance.

J'exprime mes plus vifs remerciements au Dr C. Bailly pour ses précieux conseils, sa disponibilité de tous les instants et sa spontanéité. Sa mise à disposition de nombreux matériels et ses conseils ont beaucoup contribué l'avancement de cette étude.

Je remercie également Malika Hamdane et Isabelle Huvent pour leur soutien et leur amitié durant ces années de travail en groupe et bien après, ainsi que Christelle Nisolle, Anne-Françoise Dillies et Isabelle Wartelle pour leur sympathie.

Mes remerciements vont également à tout le personnel de l'U124 INSERM et de l'IRCL pour leur bonne humeur et leur sympathie et à M.-C. Duvieuxbourg pour son travail photographique.

Cette étude a bénéficié d'une bourse de la part de l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille, du Conseil Régional Nord-Pas de Calais et de l'Association de Recherches contre le Cancer sans lesquels ce travail n'aurait pas eu lieu.

Un grand merci également à mon frère, Hubert Cordonnier, pour son programme de recherche de séquence cible.

Ce mémoire est l'occasion pour moi de témoigner toute mon affection à mes parents, à Franck, à mes frères et soeurs ainsi qu'à toute ma famille et mes amis.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	13
GENERALITES	18
I. LA PROTÉINE C-ABL	19
<i>A. Organisation et transcription du gène c-abl</i>	19
<i>B. Les différents domaines fonctionnels de c-Abl</i>	19
1. Les domaines homologues de c-Src	20
a. Le domaine catalytique SH1	20
b. Le domaine SH2	20
c. Le domaine SH3	22
d. L'extrémité N-terminale	24
2. Les domaines spécifiques de c-Abl	24
a. Le site de localisation nucléaire	24
b. Sites d'interaction protéine-protéine	24
c. Le domaine de liaison à l'actine	25
d. Le domaine de liaison à l'ADN	25
e. Les sites de phosphorylation	26
<i>C. Modes d'activation oncogénique de la protéine Abl</i>	27
1. La protéine v-Abl	27
2. La protéine Bcr-Abl	28
3. Autres protéines hybrides	32
<i>D. Rôle physiologique de la protéine c-Abl</i>	33
II. LES PROTÉINES HMG	37
<i>A. Les protéines de la famille HMG-1/-2</i>	37
1. Structure	37
2. Mode d'interaction à l'ADN	39
3. Fonctions des protéines de la famille HMG-1/-2	41
<i>B. La famille HMG-I(Y)</i>	43
1. Structure du domaine de liaison à l'ADN et mode d'interaction à l'ADN	43
2. Fonctions cellulaires	45

C. <i>La famille HMG-14/-17</i>	46
1. Structure	46
2. Interaction avec l'ADN et la chromatine	46
III. LA PROTÉINE C-MYB	48
A. <i>Organisation et transcription du gène c-myb</i>	48
B. <i>Activation oncogénique de c-myb</i>	49
C. <i>Rôle physiologique de c-Myb</i>	50
D. <i>Les différents domaines fonctionnels de la protéine c-Myb</i>	51
1. Le domaine de liaison à l'ADN de c-Myb	51
a. Structure du domaine de liaison à l'ADN	51
b. Séquence cible de fixation	55
c. Les gènes cibles de la protéine Myb	56
2. Le domaine transactivateur de Myb	58
3. La région C-terminale	59
a. Le domaine de régulation négative de la protéine c-Myb	59
b. Le domaine de dimérisation de c-Myb	60
c. Site de translocation nucléaire	61
4. Phosphorylation de c-Myb	61
E. <i>Coopération entre c-Myb et NF-M</i>	62
F. <i>Les protéines de la famille Myb</i>	67
RESULTATS-DISCUSSION	70
I. ETUDE DU DOMAINE DE LIAISON À L'ADN DE LA PROTÉINE C-ABL HUMAINE	71
A. <i>Détermination de la séquence cible de fixation de la protéine c-Abl</i>	71
1. Délimitation du domaine de liaison à l'ADN de c-Abl	71
2. Production et purification du domaine de liaison à l'ADN	74
3. Détermination de la séquence d'ADN cible de la protéine c-Abl	77
4. Etude de l'interaction ADN-protéine par retard en gel	79
5. Empreinte à la DNase I	83
6. c-Abl interagit par le petit sillon de l'ADN	83
B. <i>c-Abl reconnaît des structures tordues de l'ADN</i>	86
1. Structure de type <i>four-way junction DNA</i>	87

2. Interaction avec des structures contenant une boucle	89
3. Etude sur d'autres types de structures tordues de l'ADN	94
4. Etude par dénaturation thermique.	95
5. Analyse de la fixation de protéines sur les oligonucléotides linéaires et tordus fixés sur des billes.	96
6. Mise en évidence de l'interaction directe par <i>South-Western blotting</i> .	97
<i>C. c-Abl ne tord pas son site de fixation séquence-spécifique</i>	99
1. Test de permutation circulaire	99
2. Test de circularisation de l'ADN	101
3. Expérience de relaxation de l'ADN par la topoisomérase I	103
4. Le domaine de liaison à l'ADN de c-Abl déstabilise la double hélice d'ADN.	105
<i>D. Fixation sur le fragment d'ADN TyrT normal ou modifié</i>	108
<i>E. Influence de la protéine GST-NX-HIS sur la fixation de la protéine HMG-D sur l'ADN.</i>	113
1. Etude par retard en gel.	113
2. Etude par la technique de circularisation de l'ADN.	116
II. COOPÉRATION ENTRE LES PROTÉINES C-MYB ET NF-M POUR LA RÉGULATION DE L'ENHANCER DU VIRUS HBV.	120
<i>A. L'élément EP du Virus de l'Hépatite B</i>	120
<i>B. Vérification de l'expression de l'ARNm de c-myb dans une lignée hépatique</i>	125
<i>C. Le domaine de liaison à l'ADN de c-Myb interagit avec l'élément EP</i>	127
<i>D. Reconnaissance d'un seul des deux sites consensus</i>	129
<i>E. Reconnaissance par la protéine c-Myb des éléments EP-like</i>	131
<i>F. Etude de l'interaction entre la protéine c-Myb et l'élément EP par CAT assays</i>	134
<i>G. Coopération entre les facteurs c-Myb et NF-M pour la régulation de l'enhancer HBV137</i>	
CONCLUSIONS-PERSPECTIVES	141
MATERIEL ET METHODES	149
I. CLONAGE, PURIFICATION ET ANALYSE DE L'ADN PLASMIDIQUE	150
<i>A. Séparation de l'ADN en électrophorèse</i>	150
1. Préparation d'ADN en gel d'agarose	150
a. Electrophorèse en gel d'agarose	150

b. Purification des fragments séparés en gel d'agarose	150
2. Préparation d'ADN en gel de polyacrylamide	151
a. Electrophorèse en gel de polyacrylamide non dénaturant	151
b. Purification des fragments d'ADN séparés en gel de polyacrylamide	151
<i>B. Clonage moléculaire</i>	<i>152</i>
1. Vecteurs de clonage	152
a. Vecteurs commercialisés	152
b. Vecteurs dérivés	153
2. Culture bactérienne	155
a. Souches bactériennes utilisées	155
b. Milieux de culture	156
3. Digestion enzymatique des fragments et ligature de l'ADN	156
4. Mutagenèse dirigée	157
a. Obtention de la matrice d'ADN simple brin	157
b. Réaction de mutagenèse	158
5. La transformation bactérienne	158
6. Identification des clones recombinants	159
a. Minipréparation de plasmides par la méthode WIZARD (Promega)	159
b. Séquençage de l'ADN recombinant	159
c. Production de stocks de plasmides	160
II. PRODUCTION DE PROTÉINES RECOMBINANTES	161
<i>A. Protéines produites en système bactérien</i>	<i>161</i>
1. Production de protéines de fusion	161
2. Purification par affinité au glutathion	161
3. Purification par affinité pour le nickel	162
<i>B. Protéines exprimées en lysat de réticulocytes</i>	<i>163</i>
III. ETUDES EN CELLULES EUCARYOTES	163
<i>A. Culture de cellules</i>	<i>163</i>
1. Cellules adhérentes	163
2. Cellules en suspension	164
<i>B. Techniques de transfection</i>	<i>164</i>
1. Lipofection	164

2. Electroporation	164
<i>C. Dosage de l'activité CAT</i>	165
<i>D. Obtention d'extraits protéiques nucléaires</i>	166
<i>E. Extraction des ARN cellulaires totaux</i>	166
IV. DÉTECTION DES ARN PAR RT-PCR	167
<i>A. Rétrotranscription des ARN</i>	167
<i>B. Amplification par PCR (polymerase chain reaction)</i>	167
V. TECHNIQUES IMMUNOLOGIQUES	168
<i>A. Electrophorèse de protéines en gel de polyacrylamide</i>	168
<i>B. Western Blot</i>	169
VI. ETUDES DES INTERACTIONS ADN-PROTÉINE	169
<i>A. Préparation des sondes radioactives</i>	169
1. Fragments d'ADN issus de plasmides	169
2. Marquage des oligonucléotides synthétiques	172
3. Marquage des ARN	172
<i>B. Interaction de protéines à la DNA-cellulose</i>	173
<i>C. Détermination de séquences cibles par CASTing</i>	173
<i>D. Retard en gel</i>	175
<i>E. Empreinte à la DNase I</i>	175
<i>F. Interaction de protéines avec des oligonucléotides fixés sur des colonnes</i>	176
<i>G. South-Western blot</i>	177
<i>H. Test de permutation circulaire</i>	178
<i>I. Expériences de circularisation de l'ADN</i>	179
<i>J. Test de relaxation de l'ADN</i>	180
<i>K. Test de fusion de l'ADN</i>	180
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	181

INDEX DES FIGURES ET DES TABLEAUX

GENERALITES

Figure G1 : Représentation des domaines fonctionnels de la protéine c-Abl humaine.	21
Figure G2 : La translocation t(9 ;22) : les gènes impliqués et les protéines qui en découlent.	29
Figure G3 : La protéine c-Abl au cours du cycle cellulaire.	35
Figure G4 : Séquence du domaine de liaison à l'ADN des protéines de la famille HMG1/2.	38
Figure G5 : Les domaines de liaison à l'ADN des protéines de la famille HMG1/2 et HMG-I(Y).	44
Figure G6 : Les protéines de la famille HMG-14/-17.	47
Figure G7 : Structure de la protéine c-Myb.	54
Figure G8 : Structure de la protéine NF-M (C/EBP β).	64

RESULTATS-DISCUSSION

Figure R1 : Délimitation du domaine de liaison à l'ADN de c-Abl humain.	72
Figure R2 : Prédiction de la structure secondaire potentielle du domaine NX de liaison à l'ADN de c-Abl.	76
Tableau I : Détermination du consensus de fixation par <i>CASTing</i> .	78
Figure R3 : Etude de la fixation de la protéine GST-NX-HIS à différentes séquences isolés par <i>CASTing</i> .	80
Figure R4 : Empreinte à la DNase I.	82
Figure R5 : Interaction par le petit sillon.	84
Figure R6 : Structure des différentes bases nucléotidiques utilisées.	85
Figure R7 : Retard en gel avec les sondes à quatre brins.	88
Figure R8 : Compétitions entre les sondes 4Wb, BBL et DUP-56mer.	90 et 91
Figure R9 : Retard en gel avec sonde ADN simple brin.	93
Tableau II : Variation du point de fusion(ΔT_m) des oligonucléotides par la protéine GST-NX-HIS	95
Figure R10 : Etude de l'interaction par <i>South-Western blot</i> .	98
Figure R11 : Test de permutation circulaire.	100
Figure R12 : Expérience de circularisation de l'ADN.	102

Figure R13 : Test de relaxation de l'ADN induite par la topoisomérase I.	104
Figure R14 : Mesure de la dénaturation de l'ADN induite par la protéine GST-NX-HIS.	106
Figure R15 : Interaction des protéines de fusion avec les sondes TyrT normales ou modifiées.	109
Figure R16 : Interaction de quantités croissantes de protéine GST-NX-HIS avec les sondes TyrT normales ou modifiées.	110
Figure R17 : Compétition à la nétopisine.	112
Figure R18 : Influence de la protéine GST-NX-HIS sur l'interaction de la protéine HMG-D100 à la sonde DUP-56mer.	114
Figure R19 : Influence de la protéine GST-NX-HIS sur l'interaction de la protéine HMG-D100 aux sondes TyrT normales ou modifiées.	115
Figure R20 : Mise en évidence de la circularisation de l'ADN par la protéine HMG-D100.	117
Figure R21 : Test de circularisation de l'ADN en présence à la fois des protéines GST-NX-HIS et HMG-D100.	118
Figure R22 : Le virus HBV et la localisation de l'élément EP.	121
Figure R23 : Localisation des éléments EP et EP-like.	124
Figure R24 : Détection des ARNm de <i>c-myb</i> .	126
Figure R25 : Etude par retard en gel de l'interaction entre le peptide R2R3 et la séquence EP.	128
Figure R26 : Empreinte à la DNase I.	130
Figure R27 : Etude par retard en gel de l'interaction avec les éléments EP muté ou EP-like.	132
Figure R28 : Empreinte à la DNase I sur l'élément EP-like du gène <i>XRCC1</i> .	133
Figure R29 : Etude par CAT <i>assays</i> .	135
Figure R30 : Etude de la coopération entre c-Myb et NF-M pour la régulation de l' <i>enhancer</i> du virus HBV.	138

MATERIEL ET METHODES

Figure M1 : Représentation schématique des vecteurs reporter et d'expression utilisés en CAT <i>assays</i> .	154
Figure M2 : Séquence et structure des différents oligonucléotides synthétiques utilisés par retard en gel dans l'étude du domaine de liaison à l'ADN de c-Abl.	170
Figure M3 : Séquence de différents oligonucléotides utilisés.	171

LEXIQUE

Cellules

- K562 : Lignée hématopoïétique issue d'un patient en crise blastique de Leucémie Myéloïde Chronique.
- HepG2 : Lignée issue d'un hépatocarcinome primaire.
- COS7 : Lignée cellulaire de rein de singe transformée par l'antigène T du virus simien 40 (SV40).
- HeLa : Lignée cellulaire issue d'un carcinome du col de l'utérus.

Gènes

- cat* : gène procaryotique codant la *chloramphenicol acetyl transferase*.
- gag* : gène rétroviral codant la protéine de capsid du virus.
- pol* : gène rétroviral codant la polymérase du virus.

Réactifs

- BBΦ: bleu de bromophénol.
- BrEt : bromure d'ethidium.
- BSA : sérum albumine bovine.
- CsCl : chlorure de césium.
- DEPC : diéthyl pyrocarbonate.
- DTT : dithiothréitol.
- EDTA : acide éthylène-dinitro-tétra acétique.
- HEPES : acide N-2-hydroxyéthylpypérazine-N'-éthanesulfonique.
- LB : milieu Luria-Bertoni.
- IPTG : isopropyl-β-D-galactopyranoside.
- NP40 : nonidet P40.
- PEG : polyéthylène glycol.
- PMSF : fluorure de phénylméthylsulfonyle.
- SDS : dodécyl sulfate de sodium.
- TEMED : N, N, N', N'-tetraméthyl éthylène diamine.
- Tris : Tris (hydroxyméthyl)-aminométhane.

Unités

μF :	microfarad.
μL :	microlitre.
μg :	microgramme.
b :	base.
Ci :	Curie.
CPM :	coups par minute.
DO :	densité optique.
g :	gramme.
g/L :	gramme par litre.
h :	heure.
kb :	kilobase.
kDa :	kilodalton.
Kpb :	kilo paires de bases.
mA :	milliampère.
mL :	millilitre.
mn :	minute.
ng :	nanogramme.
nt :	nucléotide.
pb :	paire de bases.
V :	volt.
W :	watt.

Divers

aa :	acide aminé.
ADN (DNA) :	acide désoxyribonucléique.
ADNc :	ADN complémentaire.
ARN :	acide ribonucléique.
ARNm :	ARN messenger.
ATP :	adénosine triphosphate.
DNase :	désoxyribonucléase.

dNTP :	désoxynucléotides triphosphates.
GDP :	guanosine diphosphate.
GST :	glutathion S transférase.
GTP :	guanosine triphosphate.
LAL :	leucémie aiguë lymphoblastique.
LMC :	leucémie myéloïde chronique.
PCR :	réaction de polymérisation en chaîne (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
Ph :	chromosome Philadelphie.
RNase :	ribonucléase.
SVF :	sérum de veau foetal.
UV :	ultra violet.

INTRODUCTION

La protéine c-Abl est une protéine de la famille de c-Src impliquée dans de nombreux processus cellulaires tels que la transduction du signal, la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose la transcription et les mécanismes de réparation de l'ADN. Ces différentes fonctions nécessitent la présence d'un domaine tyrosine kinase fonctionnel et, pour certaines d'entre elles, celle du large domaine C-terminal de la protéine contenant le domaine de liaison à l'ADN. Ainsi, c-Abl serait la seule protéine tyrosine kinase à agir à la fois dans les étapes de transduction du signal au niveau du cytoplasme et dans les étapes de transcription et de réparation de l'ADN au niveau du noyau. La détermination du mode de liaison à l'ADN pourrait participer à la compréhension du rôle de la protéine c-Abl dans ces processus biologiques.

L'activité oncogénique de c-Abl est corrélée à une augmentation de son activité tyrosine kinase et à une inhibition de la fonction de liaison à l'ADN portée par la partie C-terminale de la protéine. Ainsi, les protéines oncogéniques p210^{Bcr-Abl} et p190^{Bcr-Abl}, impliquées respectivement dans la Leucémie Myéloïde Chronique (LMC) et la Leucémie Lymphoblastique Aiguë (LAL), sont caractérisées par une augmentation de l'activité tyrosine kinase et la perte de l'activité de liaison à l'ADN de la partie Abl des protéines hybrides.

Au début de ce travail, deux études avaient mis en évidence l'existence d'une activité de liaison à l'ADN au sein de la protéine c-Abl. La première (Kipréos *et al.*, 1992) présentait la délimitation de ce domaine au sein de la partie C-terminale de la protéine c-Abl murine alors que la seconde (Dikstein *et al.*, 1992) suggérait que la protéine c-Abl humaine interagisse avec une séquence nucléotidique spécifique appelée élément EP présent dans l'*enhancer* du virus de l'hépatite B (HBV).

Nous avons donc entrepris de délimiter le domaine de liaison à l'ADN de la protéine c-Abl humaine et de vérifier son interaction directe avec l'élément EP. Différentes expériences de retard en gel et de *south-western blot* ne nous ayant pas permis de corrélérer les résultats de l'équipe de Dikstein *et al.* (1992), nous avons alors entrepris, d'une part, de déterminer qu'elle était la séquence cible du domaine de liaison à l'ADN de la protéine c-Abl humaine et, d'autre part, d'identifier la ou les protéines interagissant réellement avec l'élément EP de l'*enhancer* du virus HBV. Dans cet objectif, nous avons montré que l'*enhancer* du virus HBV était reconnu par la protéine c-Myb et que cette dernière activait la transcription en coopération avec le facteur de transcription NF-M (encore appelé C/EBP β).

En parallèle, nous avons déterminé la séquence cible du domaine de liaison à l'ADN de la protéine c-Abl humaine par *CASTing* (*Cyclic Amplification of Sequence Targeting*) comme contenant un motif AAC, semblable à celui reconnu par les protéines de la famille HMG-like (*High Mobility Group-like proteins*). Dans le même temps, Miao et Wang (1996) ont montré par la même technique que la protéine c-Abl murine reconnaissait des séquences riches en paires de base A ou T indépendamment de toute succession particulière de paires de bases. Ils ont de plus montré que le domaine de liaison à l'ADN de la protéine c-Abl murine interagissait avec des oligonucléotides contenant une large boucle interne non appariée et était constitué de trois domaines homologues aux HMG-box des protéines de la famille HMG-1/-2.

Nous avons alors concentré notre étude sur la capacité de la protéine c-Abl humaine à reconnaître des séquences tordues de l'ADN et comparé la fonction de son domaine de liaison à l'ADN à celui des protéines de la super-famille des HMG.

Les résultats présentés ont fait l'objet des publications et communications suivantes :

Publications :

DAVID-CORDONNIER M.-H., HAMDANE M., BAILLY C. & D'HALLUIN J.-C.

Determination of the human c-Abl consensus binding site.

FEBS Letters, 1998, Vol. 424, p 177-182.

DAVID-CORDONNIER M.-H., HAMDANE M., BAILLY C. & D'HALLUIN J.-C.

The DNA-binding domain of the human c-Abl tyrosine kinase preferentially binds to DNA sequences containing an AAC motif and to distorted DNA structures.

Biochemistry, 1998, 137, sous presse.

DAVID-CORDONNIER M.-H., HAMDANE M. & D'HALLUIN J.-C.

c-Myb proto-oncogene binds to the EP element and regulates transcription from Hepatitis B Virus enhancer in synergy with NF-M.

Soumis.

Communications orales :

CORDONNIER M.-H., HAMDANE M. & D'HALLUIN J.-C.

Le proto-oncogène c-Myb fixe la séquence EP de l'enhancer du virus de l'hépatite B et le régule en synergie avec le facteur de transcription NF-M dans les lignées hématopoïétiques et hépatiques.

Société Française d'Hématologie, 8-10 Février 1996, Paris.

Publié dans Hematology and Cell Therapy, 1996, Vol. 38.

Communications par affiches :

CORDONNIER M.-H., HAMDANE M. & D'HALLUIN J.-C.

c-Myb and NF-M transcription factors synergize transcription from the HBV enhancer.

XII^e Meeting on Oncogenes, Juin 1996, Frederick, USA.

CORDONNIER M.-H., HAMDANE M. & D'HALLUIN J.-C.

c-Myb DNA-binding domain binds to the EP element to regulate the HBV enhancer.

XI^e Meeting on Oncogenes, Juin 1995, Frederick, USA.

Autres travaux :

HAMDANE M., DAVID-CORDONNIER M.-H. & D'HALLUIN J.-C.

Activation of p65^{NF-κB} by p210^{BCR-ABL}. Study in a myeloid cell line.

Oncogene, 1997, Vol. 15, p 2267-2275.

HAMDANE M., CORDONNIER M.-H. & D'HALLUIN J.-C.

Activation du facteur de transcription NF-κB par p210^{BCR-ABL}.

Société Française d'Hématologie, 8-10 Février 1996, Paris.

Publié dans Hematology and Cell Therapy, 1996, Vol. 38.

GENERALITES

I. La protéine c-Abl

A. Organisation et transcription du gène c-abl

Localisé sur le chromosome 9 en position q34, le gène *c-abl* humain s'étend sur plus de 230 kb et contient au moins 11 exons dont les deux premiers (1b et 1a) sont alternatifs (Ben-Neriah *et al.*, 1986) et séparés par un très long intron de 200 kb (Bernards *et al.*, 1987). Les deux promoteurs ne contiennent ni TATA-*box* ni CAAT-*box*, à la manière des promoteurs des gènes *housekeeping* mais sont très riches en paires de bases GC et contiennent plusieurs sites de fixation pour la protéine Sp1 (Shtivelman *et al.*, 1986). Ils permettent la production de deux ARNm à demi-vie courte de 6 et 7 kb environ qui codent deux protéines de 145 kDa différant par leur extrémité N-terminale 1a ou 1b (Fainstein *et al.*, 1989). Ces deux ARNm sont exprimés dans tous les types cellulaires étudiés : la forme 1b est exprimée à un taux constant alors que la forme 1a a une expression plus faible et tissu-spécifique (Caracciolo *et al.*, 1989 ; Van Etten *et al.*, 1989). Chez la souris, le gène *c-abl* contient quatre premiers exons alternatifs qui coderont les formes I, II, III et IV de la protéine c-Abl murine. La protéine murine de type I est l'équivalent de la forme 1a humaine alors que la protéine Abl de type IV correspond à la forme 1b chez l'homme (Ben-Neriah *et al.*, 1986).

B. Les différents domaines fonctionnels de c-Abl

La protéine c-Abl appartient à la super-famille des protéines tyrosine kinase non récepteur dont le chef de file est la protéine c-Src (pour revue voir Bolen, 1993). C-Abl contient différents domaines fonctionnels homologues à ceux de la protéine c-Src : ce sont les domaines « *Src Homology* » SH1, SH2 et SH3. La forme 1b de c-Abl possède également, comme la protéine c-Src, un site de myristylation en N-terminal. La protéine c-Abl diffère toutefois de manière significative de la protéine c-Src, d'une part, par la présence d'une large partie C-terminale contenant des domaines d'interaction protéine-protéine, d'interaction spécifique à l'actine, de localisation nucléaire et de liaison à l'ADN, et d'autre part, par l'absence d'un résidu tyrosine correspondant au résidu Tyr-527 de c-Src capable d'interagir

avec son domaine SH2 de manière à inhiber l'activité tyrosine kinase du domaine SH1 (Figure G1).

1. Les domaines homologues de c-Src

Ces trois domaines d'homologie à c-Src sont les domaines SH2 et SH3 d'interaction protéine-protéine capables de réguler l'activité tyrosine kinase du domaine SH1.

a. Le domaine catalytique SH1

Le domaine tyrosine kinase de la protéine c-Abl s'étend sur 260 AA dans la partie N-terminale de la protéine. Il contient une séquence consensus de fixation à l'ATP et un motif de transfert de groupement phosphate (Allen *et al.*, 1992). C-Abl phosphoryle ainsi différents substrats dont une protéine de 41 kDa (Freed and Hunter, 1992), la sous-unité RBP2 du complexe ARN polymérase II (Baskaran *et al.*, 1993), la protéine CBL (Andoniou *et al.*, 1994), les protéines adaptatrices CRK et CRKL (Ren *et al.*, 1994 ; Nichols *et al.*, 1994 ; de Jong *et al.*, 1997), la protéine SHC (Matzugiuchi *et al.*, 1994) ainsi que les protéines de régulation Abi-1 et Abi-2 (Pendergast, 1996). Le site ATP-binding sert également à l'interaction avec la poche C de la protéine p105^{RB} (Welch and Wang, 1993, 1995a, 1995b). La protéine c-Abl s'autophosphoryle également sur un résidu tyrosine présent dans le domaine catalytique. La phosphorylation de ce site est associée à l'activité constitutive du domaine tyrosine kinase (Pendergast *et al.*, 1993).

b. Le domaine SH2

Les domaines SH2 et SH3 permettent la régulation de l'activité tyrosine kinase du domaine SH1 via les interactions protéine-protéine indispensables aux étapes de transduction du signal médiée par la phosphorylation des substrats (pour revue : Cohen *et al.*, 1995 et Moran *et al.*, 1990).

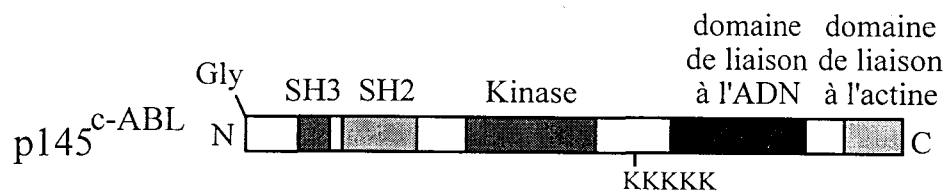


Figure G1 : Représentation des domaines fonctionnels de la protéine c-Abl humaine.

SH : *src* homology ; KKKKK : site polylysine responsable de la localisation nucléaire de la protéine ; Gly : site de myristylation sur la glycine ; N : extrémité N-terminale ; C : extrémité C-terminale.

Le domaine SH2 est constitué d'une centaine d'acides aminés et interagit par un motif FLVRES avec des résidus tyrosine phosphorylés inclus dans une séquence d'acides aminés spécifiques de chaque domaine SH2 (Mayer *et al.*, 1992 ; Songyang *et al.*, 1993, 1995). Le site d'interaction du domaine SH2 forme une poche riche en acides aminés chargés positivement qui vont interagir avec les charges négatives du groupement phosphoryle et du cycle de la tyrosine. La spécificité de l'interaction fait intervenir des contacts additionnels avec les acides aminés encadrant le résidu tyrosine phosphorylé (Cohen *et al.*, 1995).

La fonction du domaine SH2 est de réguler positivement l'activité tyrosine kinase de c-Abl et de permettre la localisation des substrats spécifiques de la protéine c-Abl à proximité du domaine tyrosine kinase qui les phosphorylera. Ainsi, le domaine SH2 de c-Abl reconnaît un résidu tyrosine phosphorylé de la protéine c-CBL, protéine interagissant également avec les protéines adaptatrices CRK et CRKL et impliquée dans la cascade de transduction du signal de la voie de la Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI3K) (Sattler *et al.*, 1996 ; Bhat *et al.*, 1997).

Le domaine SH2 de c-Abl interagit également avec des motifs SH2-*binding* présents dans la partie Bcr de la protéine hybride Bcr-Abl (Muller *et al.*, 1991 ; Pendergast *et al.*, 1991). Ces motifs SH2-*binding* ne contiennent pas de résidu tyrosine phosphorylé. Cette interaction particulière permet le repliement de la partie Bcr sur la partie Abl de la protéine Bcr-Abl de manière à couvrir le domaine SH3, rendu ainsi inaccessible aux facteurs de régulation négative, et d'obtenir une activité tyrosine kinase constitutive (Figure G2).

c. Le domaine SH3

Composé d'environ 60 acides aminés, le domaine SH3 a, quant à lui, un rôle de régulateur négatif de l'activité tyrosine kinase grâce à sa capacité d'interagir avec des protéines spécifiques (Pawson and Gish, 1992). La délétion ou la mutation du domaine SH3 entraînent une augmentation de l'activité tyrosine kinase de c-Abl et aboutissent à la transformation cellulaire (Franz *et al.*, 1989 ; Daley *et al.*, 1990). Il a également un rôle possible dans la localisation de la protéine au niveau de la membrane et des structures du cytosquelette (Mayer and Baltimore, 1994). Il est constitué de plusieurs feuillets β antiparallèles agencés en une structure globulaire riche à sa surface en acides aminés hydrophobes (Gosser *et al.*, 1995) et interagit avec un motif riche en proline de type PxxP au

sein d'un contexte spécifique d'une dizaine d'acides aminés (Ren *et al.*, 1993 ; Rickles *et al.*, 1994). Les résidus proline interagissent avec les résidus aromatiques du domaine SH3 de c-Abl. Les acides aminés chargés entourant les prolines stabilisent l'interaction et en augmentent la spécificité.

Ainsi, le domaine SH3 interagit avec différentes protéines telles que les protéines 3BP1 et 3BP2 (Cicchetti *et al.*, 1992 ; Ren *et al.*, 1993, 1994). La protéine 3BP1 agit comme protéine activant la GTPase spécifique de la protéine Rac et peut être impliquée dans la cascade de transduction du signal par la voie des petites protéines G (Cicchetti *et al.*, 1995) alors que la protéine 3BP2 agirait comme une protéine adaptatrice. La protéine *MAPKinase-Activated Protein* (MAPKAP) Kinase 2 possède également des séquences riches en proline capables d'interagir avec le domaine SH3 de c-Abl (Plath *et al.*, 1994).

Le domaine SH3 permet aussi l'interaction de c-Abl avec des protéines qu'elle phosphoryle sur des résidus tyrosine telles que les protéines Abi-1 et Abi-2 (*Abelson inhibitor*) (Shi *et al.*, 1995 ; Dai and Pendergast, 1995). Ces protéines contiennent des séquences riches en résidus proline, un domaine SH3, un domaine de type *homeobox*, une séquence PEST et un domaine acide riche en proline homologue à certains domaines transactivateurs. Plusieurs résidus tyrosine de Abi-1 et Abi-2 peuvent être les cibles de phosphorylation des protéines c-Abl, c-Src et c-Fes (Songyang *et al.*, 1995). De plus, la protéine Abi-2 interagit, grâce à son domaine SH3, avec un site riche en proline de la partie C-terminale de la protéine c-Abl. L'expression d'un mutant de délétion du domaine de Abi-2 interagissant avec le SH3 de c-Abl induit l'activation de la fonction tyrosine kinase de c-Abl et de sa capacité transformante (Dai et Pendergast, 1995). De même, la surexpression de Abi-1 supprime l'activité transformante de v-Abl (Shi *et al.*, 1995). Ces résultats suggèrent que Abi-1 et Abi-2 agissent comme antagonistes de l'activité de c-Abl et fonctionnent comme des protéines de type « supprimeurs de tumeur » d'après Pendergast (1996).

Enfin, la protéine AAP1 (*Abl-Associated Protein 1*) possède également des résidus proline interagissant avec le domaine SH3 de c-Abl mais pas avec celui de Bcr-Abl (Zhu et Shore, 1996). Cette association empêche l'activité tyrosine kinase de c-Abl suggérant que la protéine AAP1 agisse comme *trans*-inhibiteur de l'activité tyrosine kinase de c-Abl.

Le domaine SH3 permet aussi l'interaction avec la protéine tyrosine phosphatase SHPTP1 et la protéine Pag en réponse aux agents attaquant l'ADN (Wen and Van Etten,

1997) de même qu'avec la protéine ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) pour l'arrêt en phase G1 du cycle cellulaire (Shafman *et al.*, 1997 ; Baskaran *et al.*, 1997).

d. L'extrémité N-terminale

L'extrémité N-terminale de c-Abl varie selon l'exon alternatif 1a ou 1b traduit. La protéine ayant le produit de l'exon 1b (45 AA) débute par une glycine qui peut être myristylée et s'accrocher ainsi à la membrane plasmique comme la protéine c-Src, alors que la protéine ayant le produit de l'exon 1a (16 AA) ne peut être myristylée et aura une localisation différente de la protéine de type 1b et donc phosphorylera des substrats de localisation différentes (Jackson and Baltimore, 1989).

2. Les domaines spécifiques de c-Abl

a. Le site de localisation nucléaire

Situé entre le domaine tyrosine kinase et le domaine de liaison à l'ADN, le site majeure de localisation nucléaire est constitué d'une séquence pentalysine permettant à la protéine normale c-Abl d'être transloquée en grande quantité dans le noyau (Van Etten *et al.*, 1989). Ce domaine n'est pas fonctionnel dans les formes oncogéniques Bcr-Abl. Deux autres motifs basiques dans la partie C-terminale de c-Abl ont un rôle dans la localisation nucléaire de la protéine, chacun de ces sites de localisation nucléaire agissant de manière indépendante (Wen *et al.*, 1996). Par ailleurs, il a été récemment montré que la protéine c-Abl est transloquée du cytoplasme vers le noyau en réponse au signal d'adhésion médiée par les intégrines (Lewis *et al.*, 1996).

b. Sites d'interaction protéine-protéine

En plus des domaines d'interaction SH2 et SH3, différents sites de fixation pour des protéines impliquées dans la transduction du signal sont présents dans la large partie C-terminale de c-Abl. Il s'agit des protéines NCK, GRB2, CRK et CRKL (Feller *et al.*, 1994 ; Ren *et al.*, 1994). Ces protéines interagissent par leur domaine SH3 avec des séquences riches

en proline situées dans la partie C-terminale de la protéine c-Abl. Cependant, si les protéines CRK et CRKL sont des substrats de la kinase c-Abl, les protéines adaptatrices GRB2 et NCK ne sont pas phosphorylées par c-Abl.

Le domaine C-terminal de c-Abl contient aussi des sites de reconnaissance pour le domaine SH3 de la protéine ALP1 (*Amphiphysin-Like Protein 1*), protéine probablement impliquée dans la régulation de l'organisation du cytosquelette (Kaldec and Pendergast, 1997).

c. Le domaine de liaison à l'actine

Ce domaine, situé à l'extrémité C-terminale, est indispensable à la fonction biologique normale de c-Abl en permettant sa localisation à proximité des protéines ayant une action sur le cytosquelette dont certaines pourraient être des substrats de c-Abl. Cette fonction est fortement activée dans le cas des protéines oncogéniques p190^{Bcr-Abl} et p210^{Bcr-Abl} (McWhirter and Wang, 1991 ; McWhirter *et al.*, 1993).

d. Le domaine de liaison à l'ADN

Délimité chez la souris par Kipréos et Wang (1990) à une centaine d'acides aminés, le domaine de liaison à l'ADN de c-Abl n'a pas d'homologie avec d'autres domaines d'interaction à l'ADN connus mais est situé dans une région très riche en proline (18%) et en acides aminés basiques. Cette capacité de fixer l'ADN est spécifique à la protéine normale c-Abl mais n'existe pas dans les formes oncogéniques. Au cours du cycle cellulaire, cette fonction est abolie par phosphorylation différentielle de certains résidus sérine et thréonine par la cdc2 kinase (Kipréos and Wang, 1990). Les sites Ser558 et Ser883 sont phosphorylés pendant tout le cycle cellulaire alors que les résidus Thr556 et Ser852 ne sont phosphorylés que pendant la mitose et empêchent la protéine c-Abl d'interagir avec l'ADN tout au long de la mitose alors qu'elle le peut pendant l'interphase (Figure G3) (Kipréos and Wang, 1992). Ce mode de régulation de la fixation à l'ADN par la cdc2 kinase existe aussi pour d'autres protéines comme les protéines c-Myb et HMG-1 ainsi que l'histone H1 (pour revue : Wang, 1992). La délétion du domaine riche en proline chevauchant le domaine de liaison à l'ADN aboutit à une augmentation du pouvoir transformant de c-Abl (Goga *et al.*, 1993). De plus, des souris homozygotes pour la délétion du domaine de liaison à l'ADN meurent à la naissance

principalement de déficits du système immunitaire avec déplétion des progéniteurs des cellules B et, à une moindre mesure, des cellules T (Schwarzberg *et al.*, 1991). Ces deux observations suggèrent que le domaine de liaison à l'ADN est indispensable à la fonction biologique normale de c-Abl.

La cible nucléaire de c-Abl a tout d'abord été identifiée, par les techniques de *cross-linking* aux UV et *south-western blot*, comme étant une séquence palindromique de 6 pb répétées de manière inverse et séparées par 3 pb, séquence présente notamment dans l'*enhancer* du virus de l'hépatite B et appelée élément EP (cf Résultats-Discussion IIA) (Dikstein *et al.*, 1992). L'interaction ne ferait intervenir qu'une faible proportion (de l'ordre de 3%) des protéines c-Abl phosphorylées sur des résidus tyrosine et présentes dans le noyau (Dikstein *et al.*, 1996). Cependant, le domaine de liaison à l'ADN de c-Abl ne semble pas avoir un rôle direct dans la régulation de l'élément EP ni de celle de l'élément EP-like présent dans le promoteur du gène *c-myc*. En effet, Arcinas et collaborateurs (1994) ont montré que l'activation de l'expression du gène *c-myc* par c-Abl (Wong *et al.*, 1995a) ne dépendait pas de la présence de l'élément EP-like ni du domaine de liaison à l'ADN de c-Abl mais de la présence du domaine tyrosine kinase de c-Abl.

Plus récemment, Miao et Wang (1996) ont suggéré que le domaine de liaison à l'ADN de c-Abl soit constitué de trois domaines consécutifs de type HMG-*box* qui coopéreraient pour permettre la fixation de la protéine c-Abl murine sur des séquences cibles riches en paires de base A ou T. Ils ont également montré que le domaine minimal de liaison à l'ADN de c-Abl murin, décrit préalablement par Kipréos et Wang (1992), interagit avec une séquence contenant une boucle interne formée par le non-appariement d'une succession de bases T avec une succession de bases C sur le brin complémentaire. Cette fixation d'un ADN ayant une structure tordue ainsi que la reconnaissance d'une séquence riche en paires de base A ou T sont des caractéristiques communes aux protéines de type HMG, c'est pourquoi les auteurs proposent que la protéine c-Abl appartienne à la super-famille des protéines HMG.

e. Les sites de phosphorylation

En plus des sites d'autophosphorylation sur des résidus tyrosine et des phosphorylations par la cdc2 kinase régulant son activité de liaison à l'ADN pendant la

mitose, la protéine c-Abl est également phosphorylée par la PKC (Pendergast *et al.*, 1987) mais le rôle de cette phosphorylation reste inconnue.

C. Modes d'activation oncogénique de la protéine Abl

La plupart des découvertes sur la fonction biologique de c-Abl découlent des études réalisées sur les protéines oncogéniques dérivées de c-Abl. Les plus étudiées sont la protéine virale v-Abl murine et la protéine humaine hybride Bcr-Abl.

1. La protéine v-Abl

L'oncogène viral v-Abl a d'abord été découvert dans le Virus Abelson de la Leucémie Murine (AMuLV) qui induit chez la souris des lymphomes de cellules pré-B (Reddy *et al.*, 1983). Le gène *abl* est délété des parties codant pour l'extrémité N-terminale et le domaine SH3 de la protéine pour être fusionné aux séquences du gène *gag* viral. Le produit de fusion code pour une protéine de 160 kDa. L'oncogène v-Abl a ensuite été découvert dans le Virus du Sarcome Félin Hardy-Zuckerman 2 (HZ2-FeSV) (Besmer *et al.*, 1983). Le gène *abl* est, dans ce cas, délété à la fois des séquences codant l'extrémité N-terminale et le domaine SH3 ainsi que des séquences codant une grande partie du domaine C-terminal et inséré entre les séquences virales *gag* et *pol* du virus.

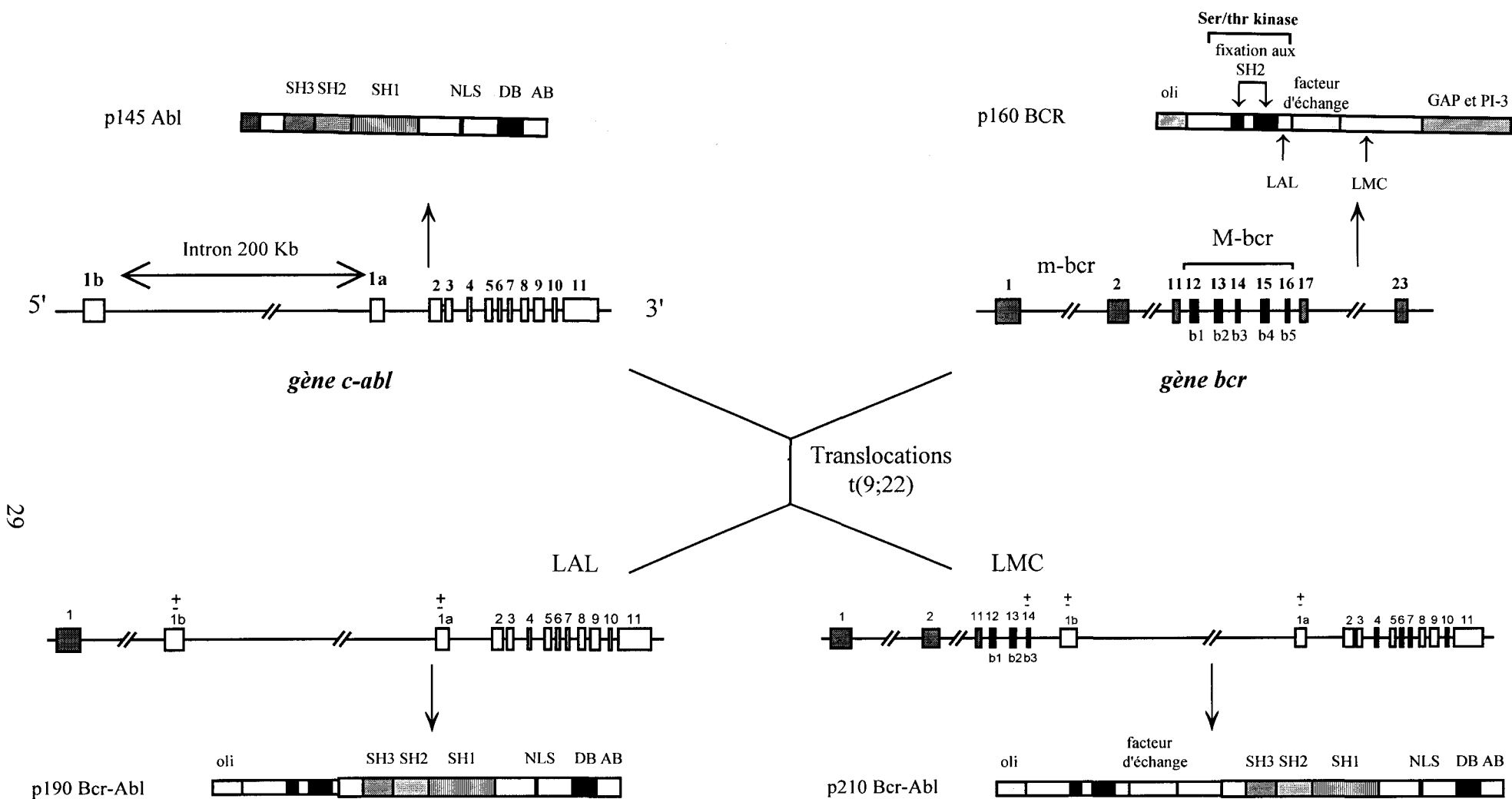
La protéine v-Abl a une activité tyrosine kinase constitutive liée à la perte du domaine SH3 de régulation négative alors qu'elle a perdu sa capacité de liaison à l'ADN et à une localisation principalement cytoplasmique périmembranaire. La protéine v-Abl peut toutefois activer l'expression du gène *c-myc* via l'activation du site E2F (Wong *et al.*, 1995b) ou participer à la formation du complexe CREB et transactiver à partir des motifs CRE (Birchenall-Roberts *et al.*, 1995). Le domaine de liaison à l'actine est fonctionnel et est indispensable à la transformation par le virus AMuLV (McWhirter and Wang, 1993). V-Abl est capable de transformer les cellules *in vitro* et d'induire des leucémies *in vivo* et d'inhiber ou de stimuler la croissance cellulaire selon le contexte cellulaire (Renshaw *et al.*, 1992). Dans la majorité des cellules, v-Abl induit un arrêt en phase G1 du cycle cellulaire, alors que, dans une minorité d'autres, il permet une prolifération indépendante des facteurs de croissance tels que les interleukines 2 et 3 (Mathey-Prevot *et al.*, 1986). De plus, l'oncogène v-Abl

confère un avantage de survie aux cellules hématopoïétiques via la suppression de l'apoptose par la voie de la protéine Bcl-X_L (Evans *et al.*, 1993 ; Chen *et al.*, 1997). Il nécessite la protéine Rac pour transduire son message mitogène (Renshaw *et al.*, 1996) et régule négativement l'action des facteurs de transcription Rel/NF-κB dans les lymphocytes B (Klug *et al.*, 1994).

2. La protéine Bcr-Abl

Le gène *bcr-abl* est obtenu suite à une translocation réciproque au niveau des chromosomes 9 et 22 humains et aboutissant à la formation du chromosome Philadelphie (Ph) (Nowell and Hungerford, 1960) associé à 95% des Leucémies Myéloïdes Chroniques (LMC), à 20% des Leucémies Aiguës Lymphoblastiques (LAL) de l'adulte et à 5% des LAL de l'enfant. La translocation t(9;22) implique le gène appelé *bcr* (pour Breakpoint Cluster Region) localisé sur la bande q11 du chromosome 22 et le gène *c-abl* en position q34 du chromosome 9. La LMC est un désordre myéloprolifératif clonal des cellules souches hématopoïétiques touchant les lignées myéloïdes, érythroïdes, mégacaryocytaires ainsi que la lignée B et parfois T alors que la LAL se caractérise par un désordre touchant la lignée lymphoïde (Kantarjian *et al.*, 1993).

Dans la LMC et 1/3 des LAL Ph⁺, la cassure se produit dans la région M-bcr (pour Major breakpoint cluster region) contenant les exons 12 à 15 du gène *bcr*, encore appelés exons b1 à b4. Le point de cassure a lieu le plus souvent entre les exons b2 et b3 ou entre les exons b3 et b4. Ainsi, les ARNm chimères diffèrent de 75 bases et codent des protéines variant par la présence ou non de 25 AA et appelées toutes deux p210^{Bcr-Abl}. Par contre dans 2/3 des LAL Ph⁺, la coupure se fait au niveau de la région m-bcr (pour minor breakpoint cluster region) et ne conserve que le premier exon du gène *bcr*. La protéine hybride ainsi obtenue ne fait que 190 kDa et représente une forme plus agressive que la protéine de 210 kDa (Kelliher *et al.*, 1991) (Figure G2). Un autre type de jonction, beaucoup plus rare, consiste en une cassure en 3' du gène *bcr* et permet de conserver 20 des 21 exons de *bcr* dans le gène hybride *bcr-abl*. La protéine produite contient alors 180 AA de plus que la protéine p210^{Bcr-Abl} classique de la LMC (Saglio *et al.*, 1990). Cependant, dans certains cas de LMC, la protéine hybride Bcr-Abl est exprimée dans les cellules alors que le chromosome Ph n'est pas identifié par analyse du caryotype. Le gène *bcr-abl* est alors obtenu par translocation



29

Figure G2 : La translocation *t(9;22)* : les gènes impliqués et les protéines qui en découlent.

M-bcr : site majeur de la translocation responsable de la LMC ; m-bcr : site mineur impliqué dans la translocation *t(9;22)* responsable de la LAL ; SH : *src* homology ; KKKKK : site polylysine responsable de la localisation nucléaire de la protéine ; DA : domaine *DNA-binding* ; AB : domaine *actine-binding* ; N : extrémité N-terminale ; C : extrémité C-terminale ; oli : domaine d'oligomérisation (d'après Daley and Ben-Neriah, 1991).

complexe comme la t(9 ;22 ;20)(q34 ;q11 ;p13) décrite par Morris *et al.* (1991). Il faut noter que certains cas de LMC ont été décrits comme ne résultant pas de l'obtention du gène hybride *bcr-abl* mais de la surexpression conjointe des gènes *c-abl* et *c-myb* (Toth *et al.*, 1994).

La translocation crée aussi le gène hybride réciproque *abl-bcr* sur le chromosome 9q+. Ce gène est transcrit en un ARNm de 3,5 kb ayant une phase ouverte de lecture de 370 à 414 AA, selon le lieu de la translocation, mais la protéine hybride Abl-Bcr n'a pas été identifiée dans les cellules exprimant la protéine Bcr-Abl (Delfau *et al.*, 1988 ; Melo *et al.*, 1993).

L'expression des protéines p210^{Bcr-Abl} et p190^{Bcr-Abl} est sous le contrôle du promoteur du gène *bcr*. Le gène *bcr* est très conservé entre espèces et est exprimé de manière ubiquiste à un taux constant entre cellules. Il s'étend sur 130 kpb en position q11.21 du chromosome 22 et est composé de 21 exons et code pour une sérine-thréonine kinase de 160 kDa (Dhut *et al.*, 1990). Son promoteur ne comporte pas de TATA-*box* mais des régions riches en paires de bases G/C, un site de reconnaissance pour le facteur de transcription Sp1 et deux séquences répétées de manière inversée ayant un rôle crucial dans l'initiation de la transcription (Hariharan and Adams, 1987). De plus, la région 5' non codante du gène contient deux courtes phases ouvertes de lecture de 14 et 18 codons qui pourraient moduler l'expression des gènes *bcr* et *bcr-abl* au niveau traductionnel (Lifshitz *et al.*, 1988). D'autres gènes homologues au gène *bcr* ont été identifiés de part et d'autre de celui-ci sur le chromosome 22 (gènes *bcr2*, *bcr3* et *bcr4*) ou sur le chromosome 17 (gène *abr*), mais aucun d'entre eux n'a été retrouvé impliqué dans des translocations (Arlinghaus, 1992).

La protéine p160^{Bcr} contient plusieurs domaines fonctionnels (Figure G2) (pour revue : Timmons and Witte, 1989) :

- Dans sa partie N-terminale, la protéine Bcr possède un domaine sérine-thréonine kinase contenant un site consensus de fixation à l'ATP, un site GXXXGK commun à l'ATPase et la GTPase ainsi qu'un domaine homologue aux protéines kinases AMPc-dépendantes (Maru and Witte, 1991). Cette activité sérine-thréonine kinase n'est pas indispensable à la fonction de Bcr-Abl. Elle contient également deux paires de cystéines indispensable à l'activité sérine-thréonine kinase et deux sites d'interaction au domaine SH2 de protéines impliquées dans la transduction du signal et l'activation de la fonction tyrosine kinase de Bcr-Abl (Muller *et al.*, 1991).

- Le domaine central de la protéine Bcr contient des homologies avec le produit du proto-oncogène *dbl* de Drosophile, ayant un rôle d'échange GDP-GTP indispensable à la transduction du signal, avec la protéine CDC24 de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, ayant un rôle dans l'organisation du cytosquelette et le contrôle de la division cellulaire, et avec l'oncogène Vav (Adams *et al.*, 1992). Ce domaine est présent dans la protéine p210^{Bcr-Abl} mais pas dans la protéine p190^{Bcr-Abl} et semble participer à la stabilisation des fibres d'actine (McWhirter and Wang, 1997).
- Le domaine C-terminal de Bcr quant à lui possède une activité *GTPase Activating Protein* (GAP) spécifique de la protéine p21^{Rac} (Diekmann *et al.*, 1991) et est homologue à la n-chimerin, à la sous unité de 85 kDa de la PI3K, aux protéines Bam2 et Bam3 de *Saccharomyces pombe* et à la protéine 3BP1 interagissant avec le domaine SH3 de c-Abl (Cicchetti *et al.*, 1992). Ce domaine n'est pas retrouvé dans les protéines p210^{Bcr-Abl} et p190^{Bcr-Abl}.

La partie Bcr confère des fonctions et des localisations différentes à la protéine Abl avec laquelle elle est fusionnée. Ainsi, la protéine Bcr-Abl a une localisation exclusivement cytoplasmique et a perdu la capacité de fixer l'ADN spécifique à la protéine c-Abl. Bcr-Abl a de plus une activité de liaison à l'actine renforcée par rapport à celle de c-Abl et ne contient pas de site de myristylation, l'empêchant de se localiser comme c-Abl et v-Abl près de la membrane plasmique. A la suite de la fixation des séquences SH2-*binding* de la partie Bcr sur le domaine SH2 de la partie Abl, le domaine SH3 est rendu inaccessible aux protéines de régulation négative de l'activité catalytique, induisant une activité tyrosine kinase de Bcr-Abl constitutive (Pendergast *et al.*, 1991). Cette phosphorylation se fera sur des substrats qui peuvent être différents de ceux normalement phosphorylés par c-Abl du fait de leur localisation différente, tel que la paxilline, une protéine impliquée dans les phénomènes d'adhésion cellulaire (Salgia *et al.*, 1995). Les acides aminés 1 à 63 de la partie Bcr agissent également pour activer la fonction tyrosine kinase de la partie Abl de la protéine hybride (Lugo *et al.*, 1990) et pour augmenter l'activité de fixation aux filaments d'actine suite à la modification conformationnelle du domaine de liaison à l'actine (McWhirter and Wang, 1991 ; McWhirter *et al.*, 1993). Les 63 premiers AA de la partie Bcr correspondent à un domaine d'oligomérisation de type *coiled-coil* permettant la formation d'homotétramères de la protéine Bcr-Abl ou l'association en hétérotétramère avec la protéine Bcr (Liu *et al.*, 1993).

La protéine Bcr-Abl a un rôle dans l'inhibition de l'apoptose (Bedi *et al.*, 1994 ; McGahon *et al.*, 1994), dans l'indépendance vis à vis de l'IL3 pour la croissance cellulaire (Kabarowski *et al.*, 1994) ainsi que dans l'abrogation de la dépendance vis à vis de l'ancrage aux cellules du stroma de la moelle osseuse (Renshaw *et al.*, 1995).

La transformation induite par la protéine hybride fait intervenir différentes voies signalétiques telles que celles des protéines Ras (Mandanans *et al.*, 1993) et c-Myc (Sawyers *et al.*, 1992). Ainsi, l'activation de la voie de Ras se fait via l'interaction entre le résidu Tyr177 phosphorylé de la protéine Bcr-Abl et le domaine SH2 de la protéine adaptatrice GRB2. Celle-ci contient, en plus du domaine SH2, deux domaines SH3 permettant la fixation à la protéine d'échange SOS qui va favoriser la forme active Ras-GTP par rapport à la forme inactive Ras-GDP (Puil *et al.*, 1994). L'activation de la voie signalétique de Ras peut également faire intervenir la protéine SHC qui recrute alors le complexe SOS-GRB2 au niveau de la membrane, à proximité des protéines Ras (Goga *et al.*, 1995b).

La protéine Bcr-Abl active aussi la voie des protéines STAT (Shuai *et al.*, 1996) et agit sur l'activité de la protéine p65^{NF- κ B} en augmentant sa stabilité (Hamdane *et al.*, 1997).

3. Autres protéines hybrides

Une autre protéine de fusion impliquant le proto-oncogène c-Abl humain a également été décrite dans les leucémies aiguës (Papadopoulos *et al.*, 1995). Il s'agit de la protéine hybride Tel-Abl issue de la translocation t(9q34 ;12p13) responsable de leucémies (encore appelée ETV6-Abl). La protéine Tel appartient à la famille du facteur de transcription Ets. La translocation ne conserve que la partie codant le domaine de type HLH (*Helix-Loop-Helix*), homologue à Ets, de la protéine Tel et le place en 5' de la partie codante de *c-abl* identique à celle restante dans la fusion *bcr-abl*. La protéine oncogénique Tel-Abl possède une activité oncogénique élevée et active des voies signalétiques identiques à celles de la protéine Bcr-Abl (Okuda *et al.*, 1996). La protéine Tel-Abl peut se dimériser grâce au domaine HLH de la partie Tel afin de permettre la transformation cellulaire par la protéine Tel-Abl (Golub *et al.*, 1996). La protéine Tel-Abl est également exprimée dans un cas de LMC Bcr-Abl-négative où, en plus d'une translocation t(12 ;14), les cinq premiers exons du gène *tel* sont insérés en 5' et en phase ouverte de lecture avec l'exon 2 du gène *abl* sur le chromosome 9q34 (Andreasson *et al.*, 1997).

D. Rôle physiologique de la protéine c-Abl

Très conservée au cours de l'évolution, la protéine c-Abl est exprimée de manière ubiquiste dans le cytoplasme et le noyau de tous les types cellulaires de mammifères (VanEtten *et al.*, 1989) alors qu'elle n'est exprimée fortement, chez la Drosophile, que dans les cellules nerveuses avec une localisation exclusive dans le cytoplasme et sous la membrane des axones (Henkemayer *et al.*, 1990 ; Bennett and Hoffman, 1992). Au cours du développement embryonnaire de la Drosophile, la protéine c-Abl co-localise avec la protéine Disabled dans les axones (Gertler *et al.*, 1989) et interagit avec les protéines Enabled et Prospero impliquées dans le développement des cellules nerveuses (Gertler *et al.*, 1993, 1995). La protéine c-Abl de Drosophile interagit également avec la protéine FasI, une protéine d'adhésion cellulaire nécessaire pour guider les extrémités nerveuses en croissance (Elkins *et al.*, 1990), suggérant un rôle de la protéine c-Abl dans la régulation des interactions cellulaires.

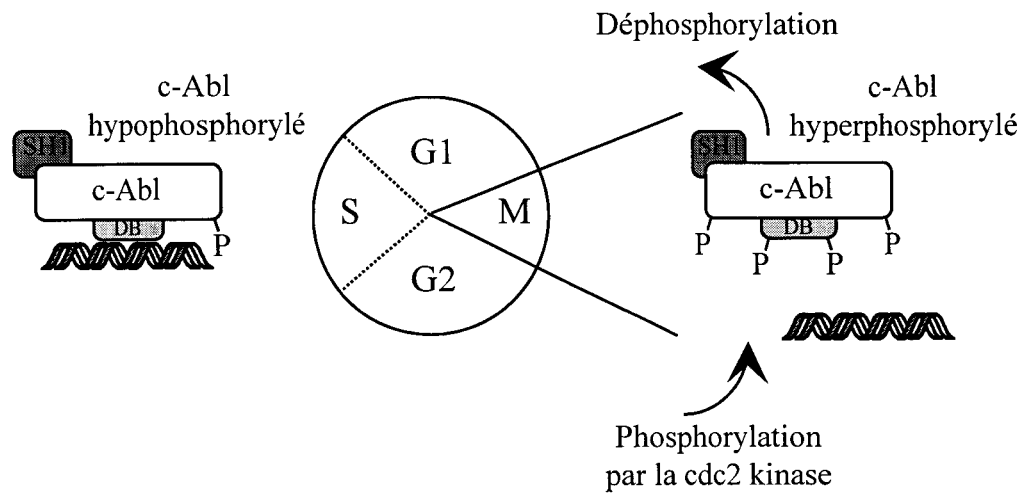
Cependant, le rôle physiologique de c-Abl dans le développement embryonnaire des cellules de mammifères est moins clair. Si les ARNm de *c-abl* sont exprimés dans tous les types cellulaires embryonnaires et adultes, ils sont plus fortement exprimés dans les testicules, le thymus et la rate fœtale (Muller *et al.*, 1982). Des souris homozygotes pour la délétion du gène *c-abl* peuvent survivre pendant tout le développement embryonnaire, suggérant que la protéine c-Abl n'est pas indispensable à la prolifération pendant l'embryogénèse, mais meurent quelques jours après la naissance. Les rares souris survivantes montrent que l'absence de la protéine c-Abl provoque des troubles du développement des cellules des lignées T et B, du développement de la rate, des yeux et du crâne, des désordres du tube digestif, une plus grande sensibilité aux infections et une réduction de la fertilité. Ces anomalies du développement sont liées soit à la perte par mutation de la fonction tyrosine kinase, ou soit à son activation suite à la délétion de la partie C-terminale (Schwartzberg *et al.*, 1991 ; Tybulewicz *et al.*, 1991). La protéine c-Abl de mammifère pourrait également avoir un rôle dans la régulation de l'organisation du cytosquelette par interaction avec la protéine ALP1 (*Amphiphysin-Like Protein 1*) (Kaldec and Pendergast, 1997).

Selon les cas, la protéine c-Abl agit comme régulateur positif ou négatif de la croissance cellulaire. Ainsi, des oligonucléotides antisens de l'ARNm de *c-abl* réduisent la

proportion de cellules en phase S (Rosti *et al.*, 1995), ce qui suggère que c-Abl a un rôle important dans l'entrée en phase S du cycle cellulaire. Par ailleurs, il a été montré que c-Abl transactive l'expression du gène *c-myc* (Wong *et al.*, 1995a). L'augmentation de l'expression de la protéine c-Myc est généralement corrélée à une augmentation de la prolifération cellulaire, suggérant que c-Abl stimule la prolifération cellulaire via c-Myc. Par ailleurs, pendant les phases G2, M et G1 du cycle cellulaire, la protéine RB hypophosphorylée séquestre 50% des protéines c-Abl qui perdent alors leur activité tyrosine kinase (Welch and Wang, 1993, 1995). L'hyperphosphorylation de RB pendant la transition G1/S du cycle cellulaire permet la libération de la protéine c-Abl et la restauration de son activité kinase, suggérant que la protéine c-Abl a un rôle d'activateur du cycle cellulaire de manière régulée par RB. Ainsi, la suppression de la protéine c-Abl abolit l'arrêt de croissance induit par RB. Par contre, la surexpression de la protéine sauvage dans des fibroblastes cause une inhibition de la prolifération alors que la surexpression d'un mutant déficient pour l'activité tyrosine kinase augmente la vitesse d'entrée dans le cycle cellulaire ainsi que la capacité transformante des protéines c-Myc, Ras, v-Abl et v-Fms. Sur la base de ces résultats, c-Abl est considéré comme un régulateur négatif de la croissance cellulaire (Sawyers *et al.*, 1994). Toutefois, des souris déficientes en protéine c-Abl ne montrent pas plus de tumeurs que les souris normales, ce qui est contraire au résultat attendu si c-Abl était réellement un gène suppresseur de tumeur. La fonction de c-Abl semble notamment passer par son interaction avec la protéine suppresseur de tumeur p53, ce qui augmente la capacité de la protéine p53 à transactiver des promoteurs contenant des sites de liaison à l'ADN de p53 (Goga *et al.*, 1995a).

Par ailleurs, de par sa capacité de liaison à l'ADN, la protéine c-Abl pourrait avoir une fonction dans la régulation de la transcription. En effet, plusieurs travaux ont montré que le domaine C-terminal (CTD) de la sous-unité 2 du complexe RNA polymérase II était phosphorylé *in vivo* sur des résidus tyrosine, sérine et thréonine (Young, 1991) et que la protéine c-Abl était capable *in vitro* de phosphoryler les résidus tyrosine au niveau des 52 séquences de 7 acides aminés répétés du CTD (Baskaran *et al.*, 1993, 1995). Le domaine SH2 de c-Abl est important pour la spécificité et la progression de cette phosphorylation sur les multiples résidus tyrosine (Duyster *et al.*, 1995). De la même manière qu'agissent les phosphorylations du CTD sur les résidus sérine et thréonine, la protéine c-Abl pourrait permettre le passage de l'étape d'initiation de la transcription à celle d'élongation (pour revue : Dahmus 1995 ; Nikolov and Burley, 1997). Ainsi, c-Abl serait la seule protéine

A



B

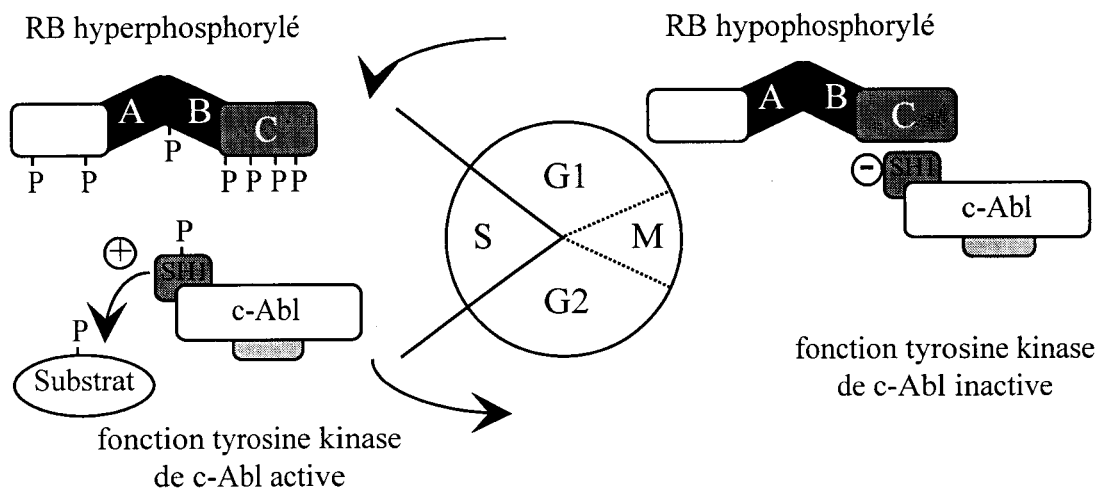


Figure G3 : La protéine c-Abl au cours du cycle cellulaire.

A : Inhibition de la capacité de liaison à l'ADN suite à la phosphorylation par la cdc2 kinase.

B : Interaction avec la p105^{RB} au cours du cycle cellulaire.

DB : Domaine de liaison à l'ADN ; SH1 : domaine tyrosine kinase (*Src Homology 1*) ; A, B et C représentent les différentes poches d'interaction protéine-protéine de la protéine RB.

tyrosine kinase à agir à la fois dans les étapes de transduction du signal au niveau du cytoplasme et dans la transcription au niveau du noyau.

En plus de ses différentes fonctions cellulaires, la protéine c-Abl semble être impliquée dans la réponse aux agents créant des dommages à l'ADN, ceci de manière associée à l'arrêt du cycle cellulaire. En effet, de tels agents de même que les radiations ionisantes activent l'activité tyrosine kinase de c-Abl dans le noyau. Le domaine SH3 de c-Abl interagit également avec la protéine ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*). Cette interaction participe à l'arrêt en phase G1 du cycle suite aux radiations (Shafman *et al.*, 1997). En réponse aux dommages de l'ADN, la protéine ATM phosphoryle la Ser465 de c-Abl qui, à son tour, interagit avec la protéine suppresseur de tumeur p53 pour activer la transcription de gènes cibles (Yuan *et al.*, 1996a, 1996b), ainsi que pour activer l'apoptose suite aux radiations ionisantes (Yuan *et al.*, 1997). La protéine c-Abl apparaît nécessaire à l'activation de la SAPK (*Stress-Activated Protein Kinase*) puisque l'activation de la SAPK après irradiation de fibroblastes n'est pas observée dans les souris homozygotes pour la mutation de c-Abl alors que l'expression de c-Abl dans ces cellules restaure l'activation de la protéine SAPK par les radiations (Kharbanda *et al.*, 1995a, 1995b). Par ailleurs, la protéine c-Abl, activée par les radiations ionisantes, interagit par son domaine SH3 avec la protéine tyrosine phosphatase SHPTP1 qu'elle phosphoryle sur des résidus en C-terminal (Kharbanda *et al.*, 1995b). De la même manière, les radiations ionisantes activent la protéine DNA-PK (*DNA-dependent Protein Kinase*, protéine contrôlant la réparation des cassures des doubles brins d'ADN dans les cellules de mammifère) qui va alors phosphoryler et activer la protéine c-Abl (Kharbanda *et al.*, 1997). Le recrutement de la DNA-PK au niveau de la cassure se fait via la protéine Ku qui se fixe aux extrémités de l'ADN. La protéine c-Abl phosphoryle à son tour le domaine C-terminal de la protéine DNA-PK et induit ainsi la dissociation de la protéine DNA-PK avec l'antigène Ku, protéine inhibitrice de la DNA-PK (Jin *et al.*, 1997). La fonction de la protéine c-Abl ferait également intervenir l'activation de la p38MAP-Kinase après traitement des cellules avec certains agents causant des dommages à l'ADN mais pas avec les expositions aux radiations ultra-violettes (Pandey *et al.*, 1996). La protéine Pag, protéine ayant une activité anti-oxydante, possède également un site d'interaction pour le domaine SH3 de c-Abl et inhibe ainsi l'activité tyrosine kinase de c-Abl (Wen and Van Etten, 1997). Ainsi, la protéine c-Abl participerait au couplage de la réparation de l'ADN avec le cycle cellulaire et/ou avec la transcription.

II. Les protéines HMG

Les protéines HMG (pour *High Mobility Group proteins*) ont été identifiées comme étant des protéines complexées à l'ADN dans la chromatine, différant des histones par leur migration en gel. Les protéines HMG ont une masse moléculaire de l'ordre de 10 à 30 kDa et sont isolées de la chromatine par des concentrations salines de l'ordre de 0,35 M. Elles sont regroupées en trois familles : HMG-1/-2, HMG-14/-17 et HMG-I (Y) qui se distinguent par leur masse moléculaire, leur séquence en acides aminés et leurs caractéristiques d'interaction avec l'ADN et la chromatine. Les membres de chaque famille sont regroupés par homologie de leur domaine de liaison à l'ADN. Toutes ces protéines HMG reconnaissent des structures spécifiques de l'ADN avec une faible ou aucune spécificité de séquence nucléotidique (pour revue voir Bustin and Reeves, 1996).

A. Les protéines de la famille HMG-1/-2

Les protéines de cette famille ont une masse moléculaire de l'ordre de 25 kDa et sont très abondantes dans la chromatine (environ une molécule pour 10 à 15 nucléosomes).

1. Structure

Les protéines HMG-1/-2 ont une structure tripartite composée d'un domaine A de 80 AA en N-terminal de la protéine, d'un domaine B au centre (de 80 AA) et d'un domaine acide en C-terminal de la protéine. Les domaines A et B (encore appelés HMG-*box* A et B) sont très basiques, homologues à environ 40% et servent à la fixation à l'ADN alors que l'extrémité acide de la protéine est impliquée dans les interactions avec d'autres protéines telles que l'histone H1 et des protéines qui modulent l'affinité des protéines HMG pour l'ADN (Stros *et al.*, 1994).

Le domaine HMG-*box* est également retrouvé dans de nombreuses autres protéines telles que la protéine UBF (*Upstream Binding Factor* ; Jantzen *et al.*, 1990), le facteur de transcription mitochondrial mtTF-1 ou la protéine de levure *Saccharomyces cerevisiae* ABF-2 (*ARS-Binding Factor*) (Baxevanis *et al.*, 1995 ; Baxevanis and Landsman, 1995). Cependant,

A

```

10      20      30      40      50      60      70      80
TCF1    KPTIKK-PLNAFMLYMKEMRAKVIAECTLKE--SAAINQILGRRWHALSREEQAKYYELARKERQLHMQLYPGWSAR-DNYGKKK
LEF1    RPHIKK-PLNAFMLYMKEMRANVVAECTLKE--SAAINQILGRRWHALSREEQAKYYELARKERQLHMQLYPGWSAR-DNYGKKK
MATA1   KAKIPR-PPNAYILYRKDHREIREQNPLGH--NNEIAVIVGNMWRDEQPHIREKYFMSNEIKRTLLENPDYRYN-PRRSQDI
MC      TERTPR-PPNAYILYRKDHREIREQNPLGH--NNEIAVIVGNMWRDEQPHIREKYFMSNEIKRTLLENPDYRYN-PRRSQDI
STE11   KSSVYK-PLNSFMLYRRDQAETI-----PTSN--HQISRTIIGQLWRNESAQYKYYSDLSALERQKHMLENPEYKY-PRKSTV
HSRY    QDRVYK-PMNAFMVWSRQQRKMALENPKMH--NSEISKQLGCRWKSLEAEKRPFFQEAQRKLIHREKYPNYKYR-PRRKAAY
MSRY    EGHVYK-PMNAFMVWSRQQRKMALENPKMH--NSEISKQLGCRWKSLEAEKRPFFQEAQRKLIHREKYPNYKYR-PRRKAAY
MA1     QDRVYK-PMNAFMVWSRQQRKMALENPKMH--NSEISKRLGAEWKSLEAEKRPFFDEAKRLRALHMKEHPDYKYR-PRRKTXT
MA2     PDRVYK-PMNAFMVWSRQQRKMALENPKMH--NSEISKRLGAEWKSLEAEKRPFFDEAKRLRALHMKEHPDYKYR-PRRKTXT
MA3     QDRVYK-PMNAFMVWSRQQRKMALENPKMH--NSEISKRLGADWKLTDAEKRPFFDEAKRLRAVHMKEHPDYKYR-PRRKTXT
MA4     SGHIKR-PMNAFMVWSRQQRKMALENPKMH--NSEISKRLGKRWKLKDSQKIPFQEAERLRLKHMADYDPKYR-PRKVKYS
ABF2-1  KQGPKR-PTSAFLYLQDHRSQVFAHQPKS--QLDLMKIIGDKWQSLDQSIKDKYIQE-----YKKAIQEYNARYPL---NK
ABF2-2  KLPPKR-PAGPFIKYANEVRSQVFAHQPKS--QLDLMKIIGDKWQSLDQSIKDKYIQE-----YKKAIQEYNARYPL---NK
T160    PNAPKR-PMSAYMLWLNASREKIKSDHPGIS--ITDLSKKAIGEIKWGSKEKKEEWRDRAEDARRDEYKAMKEYEGGRGSSKRD
SSRP1   PNAPKR-PMSAYMLWLNASREKIKSDHPGIS--ITDLSKKAIGEIKWGSKEKKEEWRDRAEDARRDEYKAMKEYEGGRGSSKRD
DROHMG0 SDKPKR-PLSAYMLWLNASREKIKRENPGIK--VTEVAKRGGELWRAMK--DKSEWAKAAKADDDYDRAVKEFEAN-GSSSANA
NHP6A   PNAPKR-ALSAYMFFANENRDIRSENPDIT--FGQVKKLGEKWKALTPEEKQPYEAKAQDKRYESEKELYNA-----TLA
NHP6B   PNAPKR-GLSAYMFFANENRDIRSENPDIT--FGQVGRILGERWKALTAEEKQPYEAKAQDKRYESEKELYNA-----TRA
ARA      PNAPKR-AMSFAFFQSFQMERONIKKEHPGIA--FGEVGVLDGKCVKCLLMKISHMKPRLOVDKQRYKDEISDYKN-----POP
HMG1-2  PNAPKR-PPSAFFLFCSEHRPKIKSEHPGLS--IGDTAKKLGEWMSQSAKDKQPYEQAALKEKYEKDIAAYRA-KGKSDAAG
HMG2-2  PNAPKR-PPSAFFLFCSEHRPKIKSEHPGLS--IGDTAKKLGEWMSQSAKDKQPYEQAALKEKYEKDIAAYRA-KGKSEAGK
HMG2-1  PNAPKR-PPSAFFLFCSEHRPKIKSEHPGLS--IGDTAKKLGEWMSQSAKDKQPYEQAALKEKYEKDIAAYRN-KGKVPYSM
HMG2-2  PNKPKR-APSAFFVFMEEFRKFKENPKNK--SVAAGKAAAGDRWKLSESDKAPYAKANKLLEYNKATAAYN--KGESTAAK
HMG2-2  PNKPKR-PPSAFFVFMEEFRKFKENPKNK--AVSAVGKAAAGAKWMTSDEAKAPYAKSEKRMAYN--KGAEAGPT
HMG2-2  PSKPKR-PQTGFYIKSEVFAKRRTECPTLK--VPEIVSKIESEYKALPEEKQKQYEAERYEKATYDKQDQWKEKYGDTEKS-
TETHMG2 PAAPKR-PLSAFFLQDHRSQVFAHQPKS--ITELTSMIAEKWKAVGEKQKYEYELQSEAKAYEKDQAYEKYKQPEKQ-
TETHMG2 PAAPKR-PLSAFFLQDHRSQVFAHQPKS--ITELTSMIAEKWKAVGEKQKYEYELQSEAKAYEKDQAYEKYKQPEKQ-
LGI      PKKPRG-KMSSYAFVQTCREEHKKHPDASVNFSEFSKCSERWKTMSAKEKGFEDMAKDKARYDREMKNYVPPKGDG-KKK
HMG1-1  PNKPRG-KMSSYAFVQTCREEHKKHPDASVNFSEFSKCSERWKTMSAKEKGFEDMAKDKARYDREMKNYVPPKGDG-KKK
HMG2-1  PNKPRG-KMSSYAFVQTCREEHKKHPDASVNFSEFSKCSERWKTMSAKEKGFEDMAKDKARYDREMKNYVPPKGDG-KKK
HMG2-1  PRKPRG-KMSSYAFVQTCREEHKKHPDASVNFSEFSKCSERWKTMSAKEKGFEDMAKDKARYDREMKNYVPPKGDG-KKK
MTTF1-2 LGKPKR-PRSAVNYVAERFQEAQDQSPQEK--L-----KTVKENWKLSDSEKELYIQHAKEDETRYHNMKSWEQEQIEVGR-K
CCG1     TTKDEE-FIRKALFDEQHREEMRKR-----RRIQEQLRRLRNQEKELKGPPEKPKPKMKRDPDLKLCGACGAIG
XUBF-1  PEPFKK-PLTPYFRFMKRAKYAKLHPMS--NLDLTKILSKYKELPEKKMKYIQDFOREKLEFERNLARFREHPD-----LM
XUBF-1  PDPFKK-PLTPYFRFMKRAKYAKLHPMS--NLDLTKILSKYKELPEKKMKYIQDFOREKLEFERNLARFREHPD-----LM
XUBF-2  ISEKPK-PLSAMFIFSEKRRQLQEEPELS--ESELTRLLARWINDLSEKKKAKYKAREALAKQSERKPPGGEREREGK-----LP
XUBF-3  DGRPTKPPNSYSYLCAELMAN-----MKDVP--STERMVLCSQWKLKSKQEKDAYHKCDQKQKDYEVELLRFLESLPEEEQQR
XUBF-2A DGRPTKPPNSYSYLCAELMAN-----MKDVP--STERMVLCSQWKLKSKQEKDAYHKCDQKQKDYEVELLRFLESLPEEEQQR
XUBF-5   QGEPKPPMNGYKQFSQELLSN--GELNHLPL--LKERMVEIGSRWRLISQSQHEKYLKLAEEQKQYKVLHDLWVKSLSPOQRAA
XUBF-5   LGEKPKAMPNGYKQFSQELLSN--GELNHLPL--LKERMVEIGSRWRLISQSQDYKLAEDQQRVYRTQDFTWKGLSSQDRAA
MTTF1-1 ASCPKK-PVSSYLRFSEKQLPIFKAQNPDAK--TTELIRRIARWRLEPDSKIKIYQDAYRAEWQYKKEISRFKLEQLTPSQIMS
XUBF-2  SDTPEK-PKTPOQLWYTHEKVKYLKVRPDAT--TKEVKDSLQKQWQLSDKKRLKWIHKALEQRKQYEGIMRBYIQKHPDLNT-S
XUBF-2  SDVPEK-PKTPOQLWYTHEKVKYLKVLHADAS--TKVDKDALGKQWQLSDKKRLKWIHKALEQRKQYEGIMRBYIQKHPDLNT-A
XUBF-4   GKLPES-PKRAEIIWQSQVIGDYLARFKNDR--VKALK-AMEMTWNMKEKELMWTIKKAAEDQKRYERELSEMRAAPPAATNS-S
XUBF-4   AKLPET-PKTAEEIWQSQVIGDYLARFKNDR--AKALK-SMEGTWLNMEKKEIMWTIKKAAEDQKRYERELSEMRAAPPAATNS-S
CONS     ...P.A.....R.....P.....Y.....G.W.....K.Y.....A.....
HELIX     .....

```

B

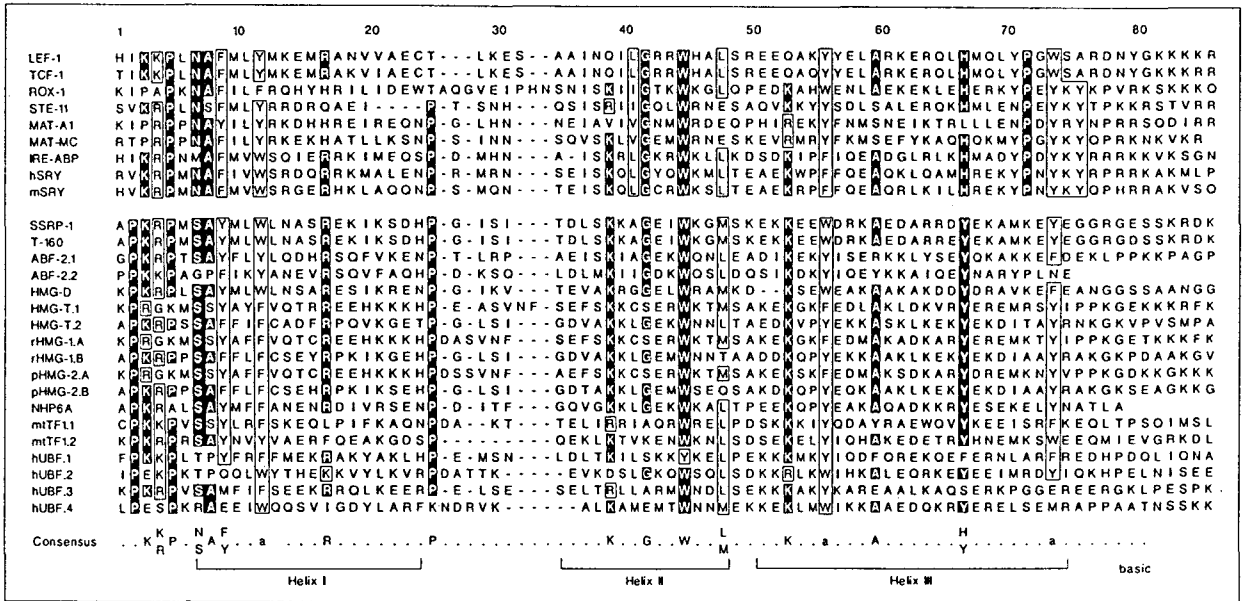


Figure G4 : Le domaine de liaison à l'ADN des protéines de la famille HMG1/2.

Comparaison de séquence des protéines de la famille HMG1 et détermination d'un consensus, d'après Laudet *et al.*, 1993 (A) et Landsman and Bustin, 1993 (B).

alors que ces protéines sont faiblement homologues entre elles, elles possèdent certains acides aminés conservés au niveau de leur positionnement et de leur espacement respectifs (Landsman and Bustin, 1993). Ainsi, si les homologies sont très faibles, ils conservent toutefois certains résidus comme la tyrosine, le tryptophane et la phénylalanine (Laudet *et al.*, 1993 ; Falciola *et al.*, 1994) (Figure G4).

Cette famille HMG-1/-2 se divise en deux sous-groupes :

- Le groupe des HMG-1/-2 vraies qui regroupent les protéines HMG-1 , HMG-2, UBF, ABF-2 et mtTF-1. Elles contiennent au moins deux domaines de type HMG-*box*.
- Le groupe des protéines HMG-*like* , telles que les protéines SRY, LEF-1, NH6A/B et la recombinase T16. Elles ne possèdent qu'un domaine de type HMG-*box* au sein d'une molécule plus grosse.

Ce domaine HMG-*box* est constitué de trois hélices- α organisées en L avec un bras long (hélice III) et un bras plus court (hélices I et II en position antiparallèle) (Weir *et al.*, 1993). La plupart des AA très conservés dans les motifs HMG-*box* sont des résidus hydrophobes localisés à l'intérieur de la structure de manière à stabiliser les hélices α en forme de L. Des résidus acides et basiques conservés sont localisés de manière asymétrique pour assurer la distribution correcte des charges électriques importante à l'interaction avec l'ADN (Landsman and Bustin, 1993).

2. Mode d'interaction à l'ADN

Les deux sous-groupes se distinguent également par la spécificité des séquences d'ADN linéaire de forme B reconnues. Ainsi, les protéines HMG1 et HMG2 n'ont pas de site préférentiel de reconnaissance de l'ADN (Solomon *et al.*, 1986) et couvre une séquence de 14 pb de long (Butler *et al.*, 1985), les protéines UBF et ABF-2 sont capables de protéger certaines séquences nucléotidiques de la digestion de l'ADN mais ces séquences n'ont pas d'homologies entre elles (Parisi and Clayton, 1991). La protéine HMG-D, quant à elle, interagit préférentiellement avec des séquences d'ADN contenant le dinucléotide TG (Churchill *et al.*, 1995). Par opposition, les protéines SRY, SOX et LEF-1 reconnaissent une séquence consensus d'ADN : $^A/T$ AACAA $^A/T$ pour les protéines SRY et SOX (Harley *et al.*, 1994) et la séquence AACAAAG pour LEF-1 (Grosschedl *et al.*, 1994). Ces sites de

reconnaissance sont en général très riches en paires de bases A ou T et peuvent être reconnus par d'autres protéines de la même famille. Par rapport aux facteurs de transcription classiques, les protéines HMG-like ont toutefois une spécificité de reconnaissance faible. Ainsi, les protéines SRY et LEF-1 reconnaissent leur séquence consensus de fixation avec seulement 25 à 40 fois plus d'affinité que la fixation à des séquences non spécifiques (Ferrari *et al.*, 1992 ; Giese *et al.*, 1991). La spécificité de reconnaissance de l'ADN se fait par l'hélice III et les 12 AA de l'extrémité N-terminale qui constituent le bras long du L de la boîte HMG (Nasrin *et al.*, 1991 ; Giese *et al.*, 1991) (Figure G5A). En particulier, un résidu proline en position 7 et un résidu sérine en position 12 sont caractéristiques du domaine de liaison à l'ADN de manière indépendante de la séquence alors qu'un résidu hydrophobe en position 7 associé à un résidu asparagine en position 12 sont retrouvés dans les domaines d'interaction séquence-spécifique à l'ADN (Read *et al.*, 1994). Les résidus 15 et 16 de l'hélice I de SRY et HMG-D reconnaissent spécifiquement la séquence TTG ou TG (Hardman *et al.*, 1995). L'intercalation du résidu 16 (isoleucine) de SRY entre les bases TT est importante pour permettre la torsion de la séquence d'ADN reconnue mais pas pour la reconnaissance des structures tordues de l'ADN (Peters *et al.*, 1995).

Quel que soit le sous-groupe, les protéines HMG interagissent préférentiellement par le petit sillon de l'ADN (Giese *et al.*, 1991 ; van de Wetering and Clevers, 1992 ; King and Weiss, 1993) et reconnaissent des séquences tordues de l'ADN qu'elles soient de type ADN cruciforme, jonction (Figure G5C) à quatre brins ou ADN cisplatiné (Bianchi *et al.*, 1989 ; Bruhn *et al.*, 1992 ; Locker *et al.*, 1995). L'ADN platiné est obtenu par liaison covalente d'une molécule de cisplatine (*cis*-diamine-dichloroplatinium utilisé en chimiothérapie) avec les radicaux en N7 de deux guanines successives. Cette interaction permet la torsion de l'ADN d'un angle de 32-34° (Bellon and Lippard, 1990). L'affinité de la fixation de la protéine HMG1 à un fragment d'ADN platiné est de l'ordre de 4.10^{-7} M soit une affinité 100 fois plus élevée que pour des fragments d'ADN linéaire (4.10^{-5} M) (Pil and Lippard, 1992). *In vivo*, les ADN ainsi modifiés par le cisplatine sont réparés par le système d'excision par les nucléases et *in vitro*, la fixation des protéines HMG1 sur les ADN platinés inhibe cette réparation, suggérant à l'équipe de Huang *et al.* (1994) que le type et le taux de protéines HMG dans les cellules tumorales influencent la sensibilité de ces cellules à la chimiothérapie.

Par ailleurs, les protéines HMG1 et HMG2 fixent de manière non spécifique des fragments d'ADN simple brin et peuvent distinguer différentes conformations de molécules d'ADN simple brin (Isackson *et al.*, 1979 ; Bustin *et al.*, 1990).

En plus de reconnaître des séquences tordues de l'ADN, les protéines HMG sont capables de tordre les fragments d'ADN avec lesquelles elles interagissent. Ainsi, la protéine SRY est capable de tordre l'ADN au niveau de son site de reconnaissance d'un angle de 85° (Ferrari *et al.*, 1992) et la protéine LEF-1 d'un angle de 120° vers le petit sillon (Giese *et al.*, 1992, 1995 ; Love *et al.*, 1995). La principale cause de cette torsion est l'intercalation, par le petit sillon, d'un résidu isoleucine entre deux paires de bases A/T du site consensus (King and Weiss, 1993). Pour la protéine HMG-1, seule la boîte B est capable de tordre l'ADN comme la protéine entière mais pas la boîte A (Teo *et al.*, 1995a). Les protéines HMG peuvent ainsi super-enrouler des ADN plasmidiques mais aussi permettre la circularisation de fragments court d'ADN (jusqu'à 66 pb pour le domaine HMG-*box* B de la protéine HMG-1) alors que les extrémités de ces fragments ne peuvent se toucher et se circulariser en présence de ligase que lorsqu'ils ont une taille supérieure à 150 pb (Paull *et al.*, 1993 ; Pil *et al.*, 1993). Cette torsion est supérieure à celle observée pour l'ADN autour des histones dans le nucléosome. L'efficacité de la courbure et du super-enroulement induits par la protéine HMG1 ou la protéine HMG-D est modulée par le domaine C-terminal acide qui réduit de 4 à 5 fois son affinité pour l'ADN ainsi que sa capacité de torsion de l'ADN (Sheflin *et al.*, 1993 ; Stros *et al.*, 1994 ; Wisniewski and Schulze, 1994 ; Payet and Travers, 1997). Le résidu tryptophane très conservé dans les HMG-*box* est crucial pour la capacité de torsion de l'ADN mais n'influence pas la capacité de reconnaissance d'ADN intrinsèquement tordu, cette dernière fonction semble dépendre de la présence d'un résidu proline (Teo *et al.*, 1995b).

3. Fonctions des protéines de la famille HMG-1/-2

Les protéines de cette famille participent à la régulation de la structure de la chromatine de manière positive par leur capacité de tordre l'ADN afin de rapprocher différents facteurs de transcription et de manière négative par leur capacité d'entrer en compétition avec l'histone H1 pour la fixation à certaines régions de la chromatine. Cette compétition explique comment la protéine HMG1 active la transcription par action sur la chromatine dans certains contextes alors qu'elle peut également l'inhiber dans d'autres

systèmes expérimentaux. De par la capacité d'interaction de leur domaine C-terminal acide avec d'autres facteurs, les protéines HMG agissent dans la formation de complexes nucléoprotéiques impliqués dans la régulation de la transcription (Aizawa *et al.*, 1994). Ainsi, les protéines HMG-1/-2 stimulent *in vitro* la transcription à partir du promoteur majeur tardif de l'Adénovirus dans les cellules HeLa (Watt and Molloy, 1988). Elles stimulent aussi la transcription de nombreux gènes cellulaires (Waga *et al.*, 1988 ; 1990) en agissant probablement sur la stabilisation de l'association TFIID-TFIIA du complexe transcriptionnel de base (Tremethick and Molloy, 1988 ; Shykind *et al.*, 1995). La protéine HMG1 augmente aussi la fixation de certains facteurs de transcription tel que le complexe « progestérone-récepteur de la progestérone » dont l'affinité pour sa séquence cible augmente de 10 fois, probablement via l'action de torsion de l'ADN par HMG1 au niveau de la séquence cible du récepteur de la progestérone (Onate *et al.*, 1994). De même, le protéine HMG2 interagit spécifiquement avec le domaine POU des facteurs de transcription Oct1 et Oct2, augmentant ainsi leur affinité pour leur séquence cible (Zwilling *et al.*, 1995). Au contraire, les protéines HMG-1/-2 inhibent *in vitro* la transcription par la RNA polymérase II par interaction avec la protéine TBP (*TATA-Binding Protein*) fixée sur la TATA-box, en empêchant la fixation de TFIIB sur la TBP, étape nécessaire à la formation du complexe de base (Ge and Roeder, 1994). La protéine SRY pourrait également agir sur la transcription de différents gènes spécifiquement exprimés dans les cellules sexuelles (Haqq *et al.*, 1993). De même, les protéines Sox-4 et Sox-18, homologues de SRY, ont un domaine transactivateur qui leur permet d'activer la transcription notamment dans les lymphocytes (van de Wetering *et al.*, 1993 ; Hosking *et al.*, 1995). La protéine LEF-1 possède également un domaine transactivateur qui permet à la protéine d'activer la transcription de certains gènes dans les cellules lymphoïdes et le thymus (Giese and Grosschedl, 1993 ; Sheridan *et al.*, 1995 ; Haynes *et al.*, 1996).

La famille des protéines HMG-1/-2 a également un rôle dans la réplication et la réparation de l'ADN grâce à leur capacité de reconnaître des structures d'ADN de type jonction quatre-brins.

Les protéines HMG1 et HMG2 ont une localisation préférentiellement cytoplasmique dans les cellules différenciées alors que leur localisation est principalement nucléaire dans les cellules peu différenciées. La phosphorylation de ces protéines par la protéine kinase C modifie leur distribution subcellulaire en empêchant leur translocation du cytoplasme vers le

noyau et donc leurs fonctions sur la transcription, la réplication et la réparation de l'ADN (Wisniewski *et al.*, 1994).

B. La famille HMG-I(Y)

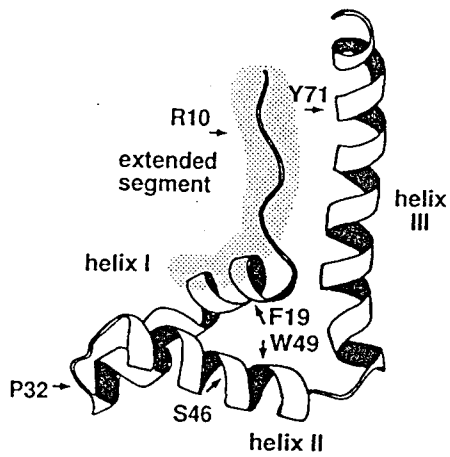
Cette famille contient trois membres : les protéines HMG-I et HMG-Y qui diffèrent de 11 AA suite à un épissage alternatif et la protéine HMG-I-C (Zhou *et al.*, 1996). Ces protéines ont une masse moléculaire de 10 à 12 kDa et présentent *in vivo* de nombreuses modifications post-traductionnelles dont des phosphorylations par la cdc2-kinase au cours de la mitose du cycle cellulaire aboutissant à une réduction de leur affinité pour l'ADN d'environ 20 fois (Nissen *et al.*, 1991 ; Reeves *et al.*, 1991 ; Siino *et al.*, 1995). Les protéines de la famille HMG-I(Y) sont notamment fortement exprimées à la suite de la stimulation cellulaire induite par différents facteurs de croissance tels que le PDGF, le FGF, l'EGF et les esters de phorbol (Friedmann *et al.*, 1993 ; Ogram and Reeves, 1995).

1. Structure du domaine de liaison à l'ADN et mode d'interaction à l'ADN

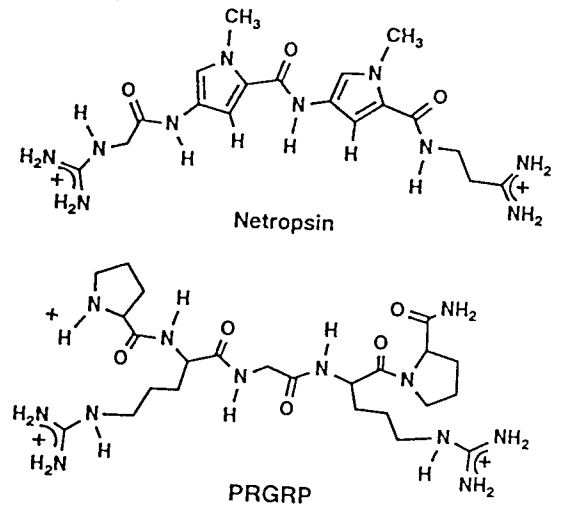
Le domaine de liaison à l'ADN des protéines de type HMG-I(Y) est également appelé domaine « *AT-hook* » de par son interaction préférentielle avec des séquences d'ADN linéaires très riches en résidus A et T (Churchill and Travers, 1991). La fixation se fait par trois courts peptides de 11 AA contenant le motif minimum PRGRP. Ces peptides interagissent chacun avec le petit sillon d'une séquence de 5 à 6 pb A ou T soit un total de 15 à 18 pb occupées par les protéines HMG-I(Y) via le petit sillon de l'hélice d'ADN (Reeves and Nissen, 1990 ; Geierstanger *et al.*, 1994). Ces motifs *AT-hook* sont également retrouvés dans d'autres protéines cellulaires telles que la protéine MLL (pour *Mixed-Lineage Leukemia*) (Zeleznik-Le *et al.*, 1994) et les histones H1 et H2B (Suzuki, 1989 ; Churchill and Susuki, 1989 ; Khadake and Rao, 1997).

Le peptide minimal PRGRP a une structure tridimensionnelle similaire à celles de certaines molécules interagissant par le petit sillon de l'ADN telles que la distamycine A, la

A



B



C

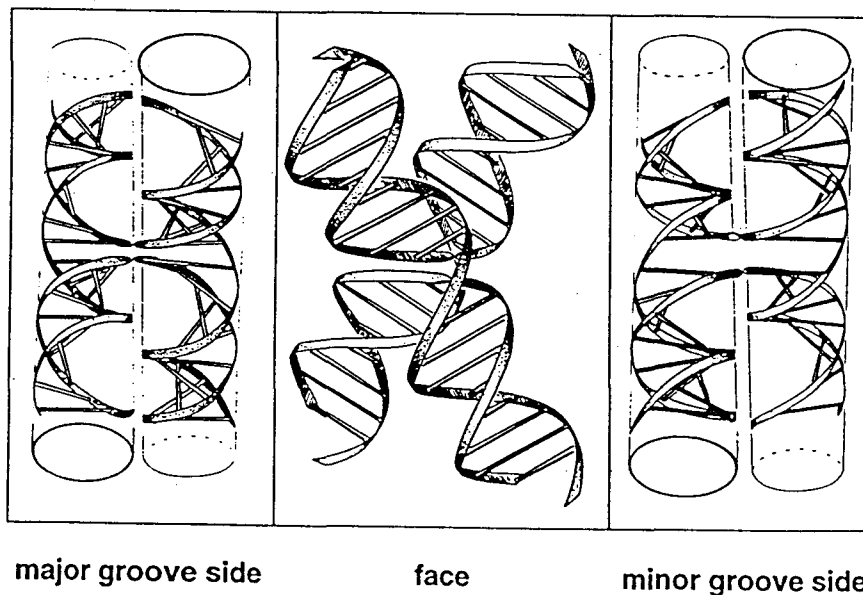


Figure G5 : Les domaines de liaison à l'ADN des protéines de la famille HMG1/2 et HMG-I(Y)..

A : Positionnement des hélices du domaine HMG-box de la famille HMG1/2.

B : Comparaison de la structure du peptide PRGRP responsable de la liaison à l'ADN des protéines de la famille HMG-I(Y) avec la structure de la nétropsine.

C : Représentation schématique de la structure jonction quatre brins (four-way) (Lilley, 1994).

nétropsine et la molécule fluorescente Hoechst 33258 (Reeves and Nissen, 1990)(Figure G5B).

Les protéines HMG-I(Y) ne reconnaissent en fait pas n'importe quelle succession de paires de bases A ou T avec la même affinité, suggérant qu'elles reconnaissent une structure particulière liée à la séquence de l'ADN plutôt qu'à la succession de paires de bases elle-même. De la même manière que les protéines HMG-1/-2, le domaine *AT-hook* des protéines HMG-I(Y) interagit avec des structures tordues de l'ADN (de type jonction 4-brins ou plasmides superenroulés) et sont capables de tordre l'ADN linéaire. Ainsi, à faible rapport protéine/ADN, les protéines HMG-I(Y) induisent un superenroulement positif des plasmides, alors qu'à un haut rapport le superenroulement induit est négatif (Nissen and Reeves, 1995). Les protéines HMG-I(Y) interagissent également avec l'ADN des nucléosomes au niveau de l'entrée de l'ADN dans la structure du nucléosome, ceci d'une manière structure-dépendante et non séquence-dépendante puisque tous les nucléosomes ne contiennent pas des séquences très riches en bases A ou T (Reeves and Nissen, 1993).

2. Fonctions cellulaires

Les protéines HMG-I(Y) sont impliquées dans différents événements cellulaires tels que la formation du nucléosome pour la condensation métaphasique des chromosomes, la réparation de l'ADN et le *processing* en 3' de l'ARNm. Elles sont également responsables de la régulation positive ou négative de la transcription par fixation sur des séquences riches en bases A ou T situées à proximité d'*enhancer* ou de promoteurs (Thanos and Maniatis, 1993 ; Chuvpilo *et al.*, 1993). Cette fonction est liée à la torsion de l'ADN permettant de rapprocher des facteurs de transcription coopérant entre eux ou à la possibilité d'interaction des protéines HMG-I(Y) avec différents facteurs de transcription reconnaissant des séquences cibles spécifiques tels que NF- κ B, IRF, c-Jun, ATF-2 et Elf-1 (Thanos and Maniatis, 1992 ; Du and Maniatis, 1994 ; John *et al.*, 1995). Ainsi, les protéines HMG-I(Y) augmentent l'affinité des facteurs NF- κ B et ATF2 pour leurs séquences cibles localisées sur le promoteur du gène de l'IFN β . La fixation des protéines HMG-I(Y) aux séquences riches en paires de bases A ou T est 50 fois plus forte lorsque ces séquences sont libres plutôt qu'associées au nucléosome. Ces séquences sont également reconnues par l'histone H1 qui entre alors en compétition avec les protéines HMG-I(Y) de manière à modifier l'accessibilité de l'ADN aux protéines régulatrices

de la transcription et de la réplication. Cette compétition pourrait avoir un rôle important dans les cellules transformées et les cellules embryonnaires où les protéines HMG-I(Y) sont fortement exprimées alors qu'elles sont indétectables dans les cellules normales différenciées (Giancotti *et al.*, 1987).

C. La famille HMG-14/-17

1. Structure

Les protéines de la famille HMG-14/-17 sont exprimées de manière ubiquiste dans toutes les cellules d'eucaryotes supérieurs mais pas dans les cellules d'eucaryotes inférieurs ou les procaryotes. Elles ont un domaine de liaison à l'ADN contenant différentes séquences d'acides aminés caractéristiques et une richesse en résidus lysine, alanine et proline (Figure G6A). L'interaction se fait par l'intermédiaire des AA 17 à 47, région chargée positivement (Crippar *et al.*, 1992). La partie C-terminale de la protéine est homologue à certains domaines transactivateurs mais ne semble pas fonctionnelle (Trieschmann *et al.*, 1995).

2. Interaction avec l'ADN et la chromatine

Les protéines HMG-14/-17 ont une localisation nucléaire associée aux fibres chromatinienne où elles interagissent avec le nucléosome de manière indépendante des séquences nucléotidiques qui le compose (Mardian *et al.*, 1980). La fixation se fait sous forme d'homodimère avec une constante d'affinité de l'ordre de 10^{-7} M (Postnikov *et al.*, 1994). La séquence d'ADN reconnue par la protéine s'étend sur 20 à 30 pb réparties en deux endroits du nucléosome de manière à former un pont qui retient et stabilise les deux hélices d'ADN parallèles dans le nucléosome (Figure G6B). Cette interaction se fait par le grand sillon de l'ADN (Crippa *et al.*, 1992). Les protéines HMG-14/-17 pourraient également avoir un rôle dans l'espacement des nucléosomes au sein de la chromatine de manière à en réduire la compaction peut-être par compétition avec l'histone H1 (Alfonso *et al.*, 1994) (Figure G6C). Elles sont ainsi deux fois plus présentes dans les régions de la chromatine transcriptionnellement active que dans la chromatine inactive.

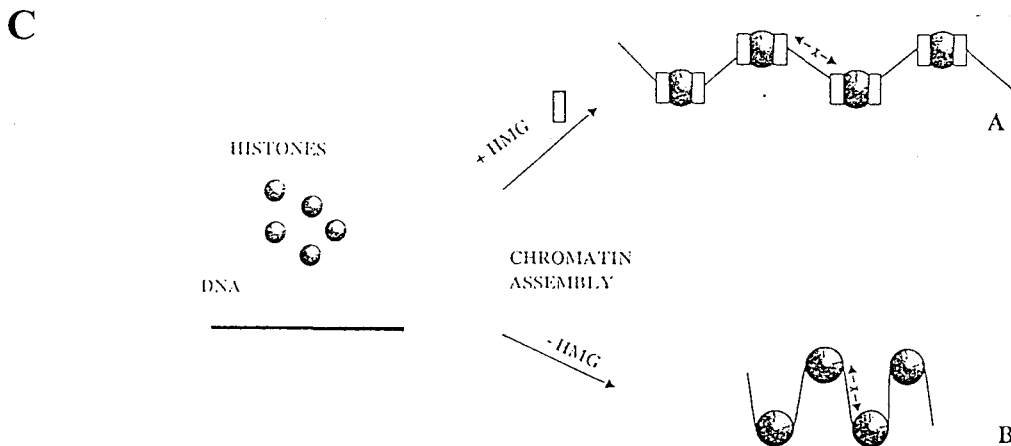
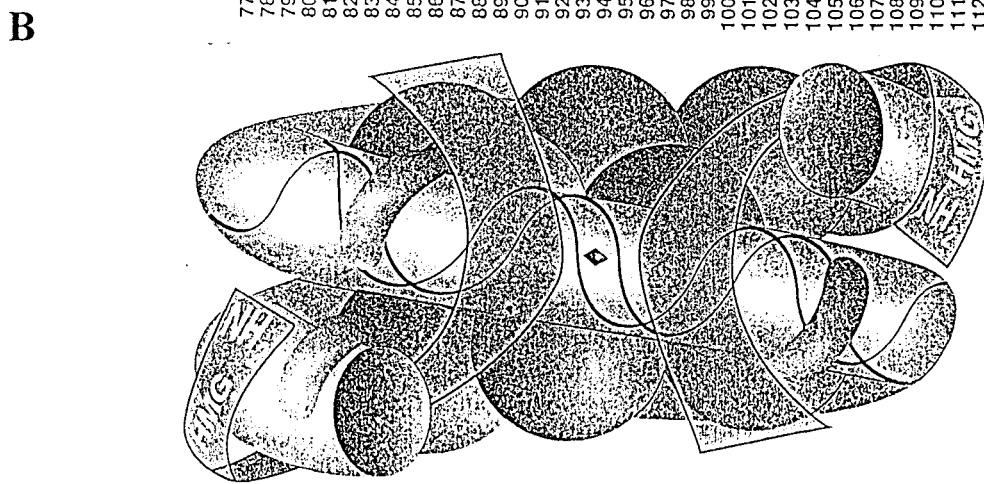
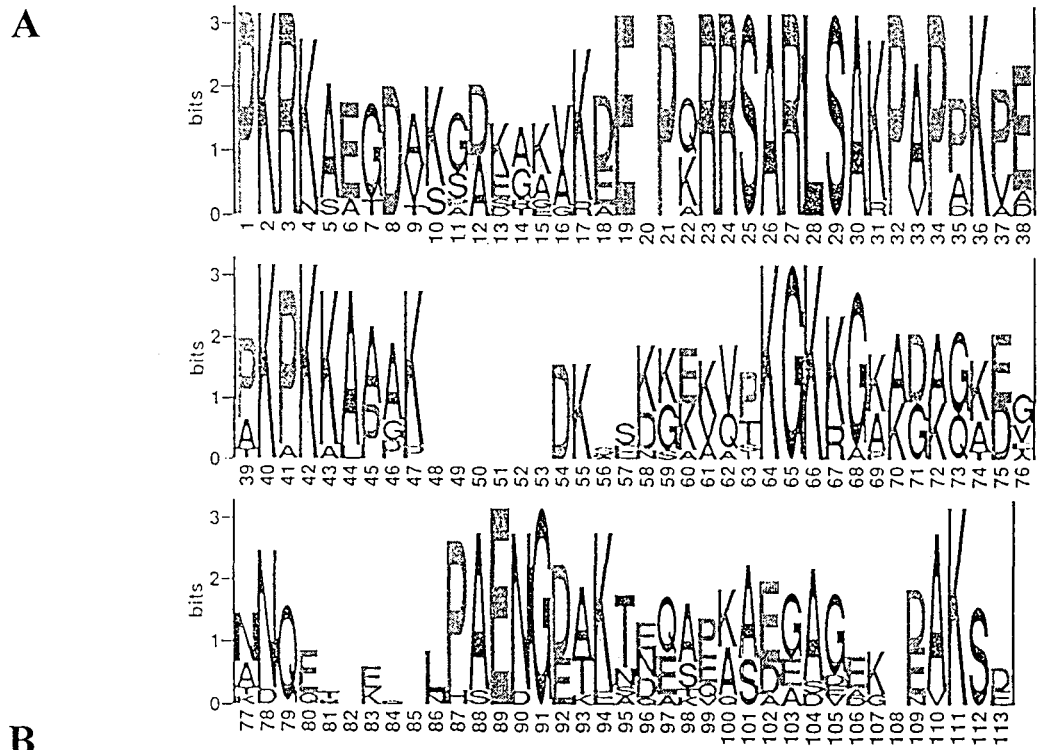


Figure G6 : Les protéines de la famille HMG-14/-17 (d'après Bustin and Reeves, 1996)

A : Comparaison des séquences des domaines de liaison à l'ADN des protéines de la famille HMG-14/-17.

B : Positionnement des protéines HMG-14/-17 autour du nucléosome.

C : Rôle des protéines HMG-14/-17 dans la décompaction de l'ADN.

III. La protéine c-Myb

A. Organisation et transcription du gène *c-myb*

Localisé chez l'homme sur le bras long du chromosome 6 en position q22-23 (Harper *et al.*, 1983), le gène *c-myb* contient plusieurs exons dont certains sont épissés de manière alternative (Majello *et al.*, 1986). Le gène *c-myb* est transcrit sous le contrôle de son promoteur situé en 5' de la partie codante mais aussi, pour une moindre part, à partir d'un second promoteur contenu à la fin du premier intron (Jacobs *et al.*, 1994). Aucun de ces promoteurs ne contient de véritable TATA-*box* ni de CAAT-*box* mais chacun d'eux est très riche en paires de bases G-C et contient de nombreux sites de fixation pour les facteurs de transcription Sp1. L'expression du gène *c-myb* est également activée par les facteurs de transcription c-Jun, JunD et NF- κ B (Toth *et al.*, 1995 ; Suhasini *et al.*, 1997), alors qu'elle est régulée négativement par la protéine suppresseur de tumeur WT1 (McCann *et al.*, 1995), par la protéine à doigt de zinc MZF1 (Perrotti *et al.*, 1995) et par la protéine c-Myb elle-même en une boucle d'autorégulation dans les cellules de la lignée T (Nicolaidis *et al.*, 1991). L'obtention de l'ARNm de *c-myb* est en parallèle régulée par un signal atténuateur de la transcription (Reddy and Reddy, 1989).

L'ARNm produit, d'environ 3,8 kb, permet la traduction en une protéine de 636 AA, la p75^{c-Myb} (Bender *et al.*, 1986). Les ARNm produits ont des extrémités 5' différentes. Cette variabilité est due à la présence de sites multiples de démarrage de la transcription du fait de l'absence de TATA-*box* et à l'existence de deux promoteurs. Des épissages alternatifs ont également leur rôle dans la variabilité de la taille des ARNm. Ainsi, l'exon 9A est épissé pour obtenir la protéine p75^{c-Myb} mais est conservé dans 10% des ARNm de *c-myb* pour la production d'une protéine p85^{c-Myb} ayant une insertion de 121 AA dans son domaine leucine-*zipper*. Les deux protéines produites ont toutefois une même demi-vie d'environ 40 mn (Shen-Ong *et al.*, 1989 ; Schuur *et al.*, 1994).

Si l'expression du gène *c-myb* est très élevée dans les cellules de la lignée hématopoïétique et en particulier dans les cellules hématopoïétiques immatures (Coll *et al.*, 1984 ; Mucenski *et al.*, 1991), elle l'est à moindre taux dans d'autres lignées cellulaires telles que les cellules endothéliales (Brown *et al.*, 1992), les cellules épithéliales lors du développement embryonnaire (Desbiens *et al.*, 1991 ; Sitzmann *et al.*, 1995) et les fibroblastes primaires (Thompson *et al.*, 1986).

Des délétions et des translocations impliquant le gène *c-myb* sont retrouvées dans de nombreux cancers tels que des mélanomes malins chez l'homme (Trent *et al.*, 1989 ; Meese *et al.*, 1989 ; Hijiya *et al.*, 1994). Mais l'expression du gène *c-myb* est aussi retrouvée associée à de nombreuses autres pathologies telles que le cancer du colon (Alitalo *et al.*, 1984 ; Torelli *et al.*, 1987 ; Ramsay *et al.*, 1992), le cancer du sein (Guerin *et al.*, 1990 ; Collyn-d'Hooghe *et al.*, 1991) ainsi que des neuroblastomes (Thiele *et al.*, 1988) et le carcinome du poumon à petites cellules (Griffin and Baylin, 1985).

B. Activation oncogénique de c-myb

Le gène *c-myb* a tout d'abord été identifié comme étant l'homologue cellulaire du gène *v-myb* présent dans le virus AMV (*Avian Myeloblastosis Virus*), induisant des leucémies monoblastiques aiguës chez le poulet (Chen *et al.*, 1980 ; Baluda and Reddy, 1994) et dans le virus E26 responsable de leucémies érythroblastiques aiguës du poulet (Leprince *et al.*, 1983) exprimant de manière constitutive une forme de la protéine Myb tronquée aux deux extrémités. Dans le virus AMV, la protéine p45^{v-Myb} est délétée des deux extrémités et contient en plus de nombreuses mutations ponctuelles. Ce virus a la particularité de ne pas transformer les fibroblastes en culture (Engelke and Lipsick, 1994) mais transforme très activement les cellules hématopoïétiques alors que seule une très forte surexpression de la protéine normale p75^{c-Myb} peut les transformer (Ferrao *et al.*, 1995). L'expression de la protéine Myb délétée de ces deux extrémités (de la même manière que l'oncogène v-Myb) induit, elle aussi, la transformation des cellules hématopoïétiques et induit des lymphomes de type B (Press *et al.*, 1995).

Dans le virus E26, la séquence *v-myb* est fusionnée aux séquences *gag* virales et à la séquence *v-ets*, permettant la production de la protéine oncogénique p135^{Gag-Myb-Ets} (Moscovici *et al.*, 1983).

Cependant, la protéine Myb est également activée par intégration de séquences rétrovirales dans ses séquences codantes (Wolff *et al.*, 1991 ; Mukhopadhyaya and Wolff, 1992 ; Nason-Burchenal and Wolff, 1993). Ainsi, l'intégration du Virus Moloney de la Leucémie Murine (MoMuLV) dans le locus de *c-myb* est observé dans les cellules ABPL (pour *Abelson leukemia virus-induced plasmocytoid lymphosarcoma*) (Mushinski *et al.*, 1983 ; Shen-Ong *et al.*, 1984) ce qui induit des erreurs d'épissage en 5' et en 3' du site

d'intégration (Rosson *et al.*, 1987 ; Tentavahi *et al.*, 1996). De même, la production d'une protéine c-Myb tronquée de sa partie C-terminale dans la lignée NFS-60 est liée à l'intégration d'un rétrovirus dans le gène *c-myb* (Weinstein *et al.*, 1986 ; Dudek and Reddy, 1989).

C. Rôle physiologique de c-Myb

La protéine c-Myb a une action prépondérante dans l'hématopoïèse (pour revue : Graf, 1992 ; Lyon *et al.*, 1994). Elle est en particulier cruciale pour l'hématopoïèse normale dans le foie fœtal de souris puisque des souris homozygotes pour la délétion du gène *c-myb* meurent *in utero* d'anémie sévère. Elle a un rôle dans l'érythropoïèse, la myélopoïèse mais pas dans la formation des mégacaryocytes (McClinton *et al.*, 1990 ; Mucenski *et al.*, 1991). Exprimée dans les cellules hématopoïétiques immatures, cette protéine voit son expression diminuer au moment de la différenciation en cellules matures (Gonda *et al.*, 1982 ; Westin *et al.*, 1982). Ainsi, l'expression constitutive de la protéine c-Myb empêche la différenciation des cellules érythroïdes ou myéloïdes en culture (Todokoro *et al.*, 1988) et bloque aussi la différenciation érythroïde induite par différents agents de différenciation (Clarke *et al.*, 1988 ; Rosson and O'Brien, 1995). La protéine c-Myb a aussi un rôle important dans la prolifération et la différenciation des lymphocytes T (Badiani *et al.*, 1994), ceci en corrélation avec l'action de c-Myb sur la transcription des gènes CD-4 et TCR γ et δ . Elle est également exprimée lorsque les lymphocytes mémoires sont stimulés pour se multiplier (Thompson *et al.*, 1986).

La surexpression de c-Myb chez la souris n'a pas d'effet sur le développement embryonnaire, ceci même dans les cellules qui n'expriment pas habituellement c-Myb à haut niveau. Cette surexpression n'induit pas de tumeurs ni de leucémies, montrant que la protéine c-Myb entière est régulée négativement et n'est pas oncogénique, la seule incidence observée étant une anomalie des muscles squelettiques et du cœur (Ness, 1996).

L'expression de l'ARNm de *c-myb* est maximale pendant la transition G1/S et reste forte pendant la phase S du cycle cellulaire quand la protéine est exprimée faiblement. Cependant, son taux ne varie pas tout au long du cycle cellulaire quand la protéine est exprimée à très haut niveau (Thompson *et al.*, 1986 ; Gewirtz *et al.*, 1989).

Des expériences utilisant des oligonucléotides antisens de l'ARNm de *c-myb* montrent par ailleurs que l'expression de *c-myb* est indispensable pour la progression dans le cycle

cellulaire des cellules hématopoïétiques (Gewirtz and Calabretta, 1988 ; Anfossi *et al.*, 1989). Toutefois, Burgess et collaborateurs (1995) ont montré que des oligodésoxynucléotides complémentaires de l'ARNm de *c-myb* contenant une succession de 4 nucléotides G avaient un effet anti-prolifératif dans de nombreux types cellulaires mais de manière indépendante de l'action sur l'ARNm de *c-myb*. D'autres séquences d'oligonucléotides antisens ont aussi été utilisées pour inhiber la prolifération des cellules K562 ou d'autres cellules issues de Leucémie Myéloïde Chronique (LMC) exprimant la protéine Bcr-Abl (Calabretta *et al.*, 1991 ; Ratajczak *et al.*, 1992a, 1992b). De même, un protocole thérapeutique basé sur l'utilisation d'oligonucléotides antisens de l'ARNm de *c-myb* dans le but d'inhiber la prolifération cellulaire a pu être établi pour le traitement de la LMC (Gewirtz, 1994).

D. Les différents domaines fonctionnels de la protéine c-Myb

Les protéines c-Myb et v-Myb sont principalement nucléaires (Slamon *et al.*, 1986) et agissent comme facteur de transcription dans la régulation de nombreux gènes cellulaires et de certains gènes viraux. Ces protéines contiennent donc plusieurs domaines fonctionnels importants pour leur rôle dans la reconnaissance de l'ADN et dans l'activation transcriptionnelle. Ainsi, la protéine normale c-Myb contient un domaine de liaison à l'ADN dans sa partie N-terminale, un domaine transactivateur complexe et différents domaines intervenant dans la régulation de l'activité de la protéine (Figure G7A). Si les domaines transactivateurs et de liaison à l'ADN sont également présents dans les protéines oncogéniques v-Myb, certaines régions impliquées dans la régulation négative de la transactivation induite par la protéine sont absentes ce qui explique comment la protéine v-Myb échappe au contrôle de son activité par la cellule et devient oncogénique.

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

a. Structure du domaine de liaison à l'ADN

Localisé dans la partie N-terminale de la protéine, le domaine de liaison à l'ADN de la protéine c-Myb est constitué de trois domaines répétés de 51 ou 52 AA, appelés R1, R2 et R3 (Gonda *et al.*, 1985 ; Boulikas, 1994). Les domaines répétés R2 et R3 sont capables à eux

seuls d'interagir avec la séquence d'ADN cible de c-Myb et constituent donc le domaine minimal de liaison à l'ADN de la protéine c-Myb (Klempnauer and Sippel, 1987 ; Sakura *et al.*, 1989). Le domaine R1 n'est pas indispensable à la fixation de la protéine sur l'ADN mais intervient pour moduler l'affinité de la fixation à certaines séquences cibles, de même que pour stabiliser les complexes ADN-protéine (Dini and Lipsick, 1993 ; Ebneith *et al.*, 1994 ; Ording *et al.*, 1994). Le domaine de liaison à l'ADN R1R2R3 est présent à la fois dans la protéine c-Myb et dans les protéines homologues A-Myb et B-Myb, alors que seul le domaine minimal R2R3 est présent dans les protéines oncogéniques v-Myb et Gag-Myb-Ets. Ainsi, la délétion du domaine R1 dans la protéine v-Myb tout comme dans les autres formes tronquées et oncogéniques de c-Myb, n'empêche pas l'interaction entre le domaine de liaison à l'ADN et sa séquence cible (Howe *et al.*, 1990 ; Saikumar *et al.*, 1990 ; Ogata *et al.*, 1995) mais diminue l'affinité pour sa cible de 5 à 10 fois (Dini and Lipsick, 1993 ; Tanikawa *et al.*, 1993 ; Engelke *et al.*, 1995). Cependant, le domaine R1 n'interagit pas avec les séquences d'ADN cible. Il pourrait toutefois stabiliser l'interaction du domaine R2R3 à sa cible par pontage de très faible affinité avec les groupements phosphate de l'ADN (Ogata *et al.*, 1994).

Le domaine de liaison à l'ADN de c-Myb constitue un domaine particulier qui n'a pas de motifs d'interaction à l'ADN classiques tels que les motifs *zinc finger*, les motifs leucine zipper associé à une région basique d'interaction à l'ADN, les motifs contenant une région basique associée à un domaine de type Hélice-Tour-Hélice (HTH), les homéodomains ou encore les feuillets β (Lüscher and Eisenman, 1990).

Toutefois, chaque domaine répété R1, R2 et R3 contient trois hélices α (Figure G7B) (Ogata *et al.*, 1994) qui ressemblent aux structures de type HTH retrouvées dans l'homéodomaine de la protéine *Antennapedia* de *Drosophila* (Frampton *et al.*, 1989). Les deux agencements HTH du domaine R2R3 semblent fonctionner comme un doigt de zinc de type C2H2 plutôt que comme deux domaines agissant en dimère (Ogata *et al.*, 1995), ceci comme dans certains répresseurs procaryotiques tel que le répresseur λ Cro (Frampton *et al.*, 1989 ; Mossing and Sauer, 1990 ; Gabrielsen *et al.*, 1991). De plus, le domaine minimal de liaison à l'ADN R2R3 est très riche en AA basiques (23%), comme le domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription CTF/NF-1 (Mitchell and Tijan, 1989).

Par ailleurs, la présence dans chaque *repeat* de trois résidus tryptophane espacés de 18 à 19 AA (Anton and Frampton, 1988) est identique à celle observée dans les domaines de liaison à l'ADN des protéines de la famille Ets (Karim *et al.*, 1990). Laget *et al.* (1993) ont

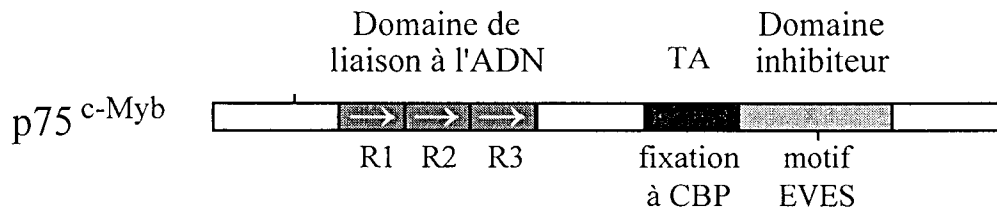
suggéré l'existence d'une homologie structurale entre les domaines de liaison à l'ADN des protéines Myb, Ets et HMG. Les résidus tryptophane se trouvent au sein d'un motif hydrophobe qui permet aux hélices de prendre une configuration adéquate pour le bon positionnement des AA interagissant avec l'ADN (Saikumar *et al.*, 1990 ; Kanei-Ishii *et al.*, 1990 ; Ogata *et al.*, 1996). La plupart des protéines Myb contiennent par ailleurs un résidu cystéine hautement conservé et entouré de résidus basiques selon le motif KQCRER présent dans le domaine R2. Cette séquence d'acides aminés est retrouvée dans les protéines Jun et Fos de la famille des protéines b-ZIP où elle pourrait intervenir dans le changement de conformation du domaine de liaison à l'ADN quand celui-ci est ou non fixé à sa séquence cible (Lipsick, 1996). La substitution de cette cystéine en sérine dans v-Myb diminue l'activité de liaison à l'ADN et abolit ainsi son activité transformante (Grässer *et al.*, 1992).

La reconnaissance précise de la séquence cible fait intervenir les troisièmes hélices des domaines R2 et R3 qui se positionnent dans le grand sillon de l'ADN, mais aussi des interactions entre l'ADN et des AA positionnés entre les hélices α (Kanei-Ishii *et al.*, 1990 ; Ogata *et al.*, 1994) (figure G7B). L'interaction des hélices α avec l'ADN fait intervenir des acides aminés différents dans chaque hélice, montrant qu'il ne s'agit pas d'une redondance de fixation de chaque domaine répété à la séquence cible mais qu'il s'agit d'une coopération entre les deux domaines répétés R2 et R3 qui ne peuvent pas interagir isolément avec l'ADN (Tanikawa *et al.*, 1993). Les deux domaines R2 et R3 recouvrent une seule face de l'ADN, rendant possible l'accès à l'ADN par l'autre face pour d'autres protéines interagissant avec le petit sillon (Ogata *et al.*, 1994). Certains auteurs ont suggéré que la troisième hélice du domaine R2 serait instable (Jamin *et al.*, 1993) mais que sa formation serait facilitée lors de la fixation à sa séquence cible (Myrser *et al.*, 1993 ; Ebnet *et al.*, 1994), alors que d'autres auteurs proposent que la relative instabilité de la troisième hélice de R2 serait plus liée à la différence de température à laquelle est réalisée la RMN qu'à une réelle stabilisation de la structure hélicoïdale en présence d'ADN (Ogata *et al.*, 1994).

La protéine c-Myb induit également la torsion de la séquence d'ADN sur laquelle elle se fixe. L'angle de la torsion induite par la protéine c-Myb est de 110 à 116°, alors qu'il n'est que de 36° avec le domaine de liaison à l'ADN R1R2R3 et que de 30° avec le domaine minimal R2R3 (Saikumar *et al.*, 1994).

Le domaine de liaison à l'ADN de c-Myb pourrait avoir aussi un rôle de domaine d'interaction protéine-protéine nécessaire à la transactivation, mais également un rôle dans la

A



B

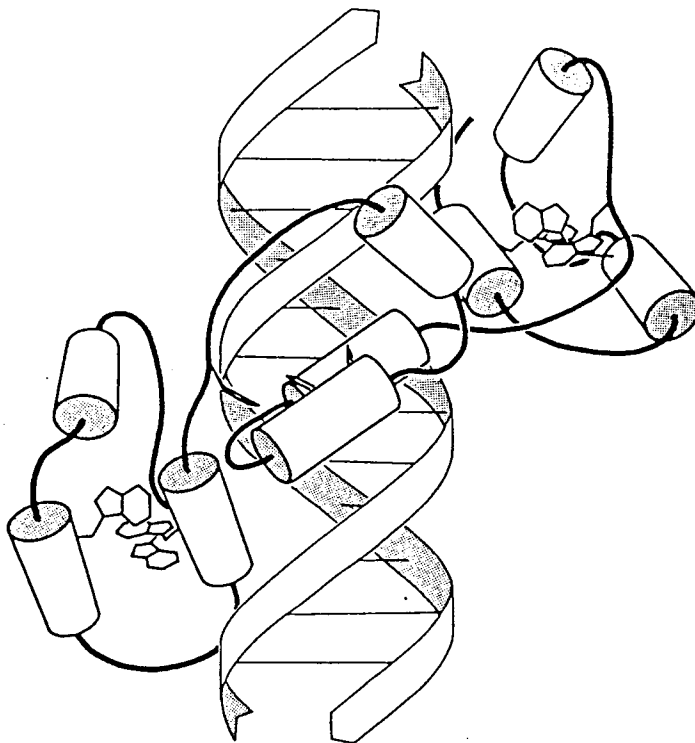


Figure G7 : Structure de la protéine c-Myb.

A : La protéine c-Myb. R1, R2 et R3 représente chacune des séquences peptidiques répétées correspondant au domaine de liaison à l'ADN ; TA : domaine transactivateur.

B : Représentation du positionnement dans la double hélice d'ADN des différents hélices alpha du domaine de liaison à l'ADN de c-Myb (d'après Kanei-Ishii *et al.*, 1990).

localisation nucléaire de la protéine (Lipsick, 1996). Le domaine R1 est particulièrement pressenti pour l'interaction avec d'autres protéines. Le domaine minimal R2R3 pourrait également avoir un rôle dans les interactions avec les protéines cellulaires. Cette hypothèse repose sur la possibilité de transactivation du gène *mim1* par la protéine Gag-Myb-Ets du virus E26 de la même manière que la protéine c-Myb, alors que la protéine v-Myb du virus AMV ne le peut pas (Ness *et al.*, 1989 ; Introna *et al.*, 1990 ; Nakano and Graf, 1992). Cette dernière diffère de c-Myb par la mutation de trois AA localisés dans le domaine minimal de liaison à l'ADN R2R3, mais dans une zone hydrophobe située à l'opposé du site d'interaction à l'ADN (Ogata *et al.*, 1995). Ceci suppose que les AA mutés dans v-Myb n'interagissent pas avec l'ADN mais avec des protéines cellulaires pour médier l'activation du gène *mim1* endogène. Ces 3 AA ne sont pas indispensables à la coopération avec le facteur de transcription NF-M (voir ci-dessous), puisque ce facteur est co-purifié avec la protéine Myb (Ness *et al.*, 1993 ; Burk *et al.*, 1993 ; Mink *et al.*, 1996). Toutefois, certains AA substitués dans le domaine de liaison à l'ADN de v-Myb par rapport à c-Myb semblent avoir été sélectionnés pour leur capacité à interagir avec un certain nombre de gènes qui seront alors activés par v-Myb. Ces gènes peuvent être différents de ceux activés par la protéine normale c-Myb ou être les mêmes mais activés à des niveaux différents (Dini *et al.*, 1995).

b. Séquence cible de fixation

La fixation des protéines c-Myb et v-Myb avec la matrice nucléaire et la chromatine a tout d'abord suggéré que l'ADN devait contenir des sites de fixation pour les protéines Myb (Klempnauer, 1988). Le site de fixation à l'ADN de la protéine Myb a d'abord été identifié comme étant la séquence consensus de fixation ${}^C/T AACG^T/G$ avec le motif AAC-GTT présent dans 100 % des séquences reconnues par la protéine v-Myb utilisée pour la détermination (Biedenkapp *et al.*, 1988 ; Garcia *et al.*, 1991). Plus tard, le site préférentiel d'interaction à l'ADN des protéines Myb a été élargi à la séquence ${}^C/T AACG^T/C^A/G$ (Howe and Watson, 1991) et à la séquence ${}^C/T AACG^T/GHH$ où H représente les bases A, C ou T (Weston, 1992).

Dans le site consensus de c-Myb ${}^C/T AACG^T/G$, le 1^{er} nucléotide A, le nucléotide C en position 4 et le nucléotide G en position 6 interagissent de manière très spécifique avec le domaine de liaison à l'ADN de c-Myb et sont reconnus respectivement par les résidus Asn¹⁸³ du domaine R3, Lys¹⁸² du domaine R3 et Lys¹²⁸ du domaine R2 (Tanikawa *et al.*, 1993 ; Ogata

et al., 1994). Le nucléotide pyrimidique C/T en première position du site consensus est quant à lui reconnu par le résidu Ser¹⁸⁷ du domaine R3 (Oda *et al.*, 1997), mais constitue une interaction moins forte, de la même manière que le nucléotide A en position 3 et le nucléotide G/T en position 5 (Tanikawa *et al.*, 1993).

Par ailleurs, le domaine de liaison à l'ADN de c-Myb reconnaît avec une affinité plus forte un oligonucléotide contenant deux sites de fixation placés en tandem qu'un oligonucléotide ne contenant qu'un seul site potentiel de fixation, alors même qu'une seule fixation de c-Myb n'est observée (Howe *et al.*, 1990). Howe et collaborateurs (1990) suggèrent que la fixation en monomère des domaines R2 et R3 se fait sur une partie de chaque séquence cible ainsi placée en tandem. De plus, par *CASTing* (*Cyclic Amplification of Sequence Targeting*), Weston (1992) montre qu'un tiers à la moitié des séquences sélectionnées par la protéine c-Myb contient au moins deux sites potentiels de fixation pour c-Myb, le plus souvent séparés de quelques paires de bases seulement.

c. Les gènes cibles de la protéine Myb

La séquence cible de fixation à l'ADN de la protéine c-Myb est retrouvée dans les promoteurs de nombreux gènes cellulaires, permettant d'en activer la transcription. Parmi ceux-ci, on compte les gènes :

- *mim1* (Ness *et al.*, 1989 ; Introna *et al.*, 1990),
- *c-myc* (Evans *et al.*, 1990 ; Zobel *et al.*, 1991 ; Nakagoshi *et al.*, 1992 ; Cogswell *et al.*, 1993 ; Deng *et al.*, 1996),
- neutrophil elastase (Nuchprayoon *et al.*, 1997),
- *CD-4* (Siu *et al.*, 1992),
- *CD-13* (Shapiro, 1995),
- *CD-34* (Melotti *et al.*, 1994 ; Melotti and Calabretta, 1994),
- *Cdc 2* (Ku *et al.*, 1993),
- *TCR δ* (Récepteur des Cellules T) (Hernandez-Munain and Krangel, 1994 ; 1995),
- adénosine déaminase (Ess *et al.*, 1995),
- facteur d'épissage PR264 (Sureau *et al.*, 1992),
- *PAX6/PAX-QNR* de caille (Plaza *et al.*, 1995),
- *lck* (McCracken *et al.*, 1994),

- et *c-myb* lui-même, permettant une autorégulation du gène (Nicolaidis *et al.*, 1991 ; Guerra *et al.*, 1995).

De nombreux autres gènes cellulaires contiennent les sites potentiels de fixation de la protéine c-Myb et sont supposés être régulés par la protéine c-Myb (Ness, 1996 ; Deng *et al.*, 1996).

La protéine c-Myb agit aussi sur des promoteurs viraux tels que l'*enhancer* du virus SV40 (Nakagoshi *et al.*, 1990) et le LTR (*Long Terminal Repeat*) du virus humain HTLV1 (Bosselut *et al.*, 1992 ; Dasgupta *et al.*, 1992) et du virus HIV1 (Dasgupta *et al.*, 1990).

Dans certains cas, la protéine Myb réprime la transcription à partir de promoteurs contenant sa séquence cible de fixation. C'est le cas des promoteurs des gènes *c-erbB2*, *c-fms* et *N-ras*. Dans l'exemple du promoteur du gène *c-erbB2*, la répression de la transcription par c-Myb s'explique par le fait que son site de fixation chevauche la TATA-*box* du promoteur et gêne la fixation du facteur de transcription TFIID, empêchant ainsi la formation du complexe de base de transcription et donc l'initiation de la transcription du gène (Mizugushi *et al.*, 1995). Par contre, dans le cas du promoteur du gène *c-fms*, les sites de fixation pour la protéine c-Myb se trouvent suffisamment éloignés du site d'initiation de la transcription. La répression fait ici intervenir le domaine de régulation négative, en C-terminal de la protéine, qui pourrait fonctionner comme un répresseur transcriptionnel sans empêcher la fixation du domaine de liaison à l'ADN à sa séquence cible. En effet, le domaine de régulation négative de c-Myb est particulièrement riche en proline et en résidus de charge neutre mais est très pauvre en résidus acides. Cette composition est semblable à celle de certains domaines répresseurs. De même, le domaine C-terminal de c-Myb contient des séquences homologues à celles de la protéine *Eve* (*Even-skipped*) de Drosophile qui fixe la protéine TBP (Um *et al.*, 1995). Ainsi, ce domaine de c-Myb pourrait séquestrer des protéines du complexe de base de transcription et empêcher ainsi l'initiation de la transcription. La répression de la transcription du gène *N-ras* par les protéines c-Myb et v-Myb s'expliquerait quant à elle par un changement de conformation de la protéine lorsqu'elle interagit avec sa séquence cible. Ce changement de conformation de la protéine Myb fixée à sa cible pourrait expliquer pourquoi la protéine active ou réprime la transcription de gènes selon la séquence cible et son environnement au sein du promoteur des différents gènes (Ganter and Lipsick, 1997).

Enfin, la transcription de certains gènes est activée par la protéine c-Myb alors que leur promoteur ne contient aucun site potentiel de reconnaissance de l'ADN par la protéine c-Myb. C'est le cas du promoteur précoce du Virus Epstein-Barr (EBV) à partir duquel la protéine c-Myb active la transcription en synergie avec la protéine BZLF1 du virus EBV, alors qu'elle ne fixe pas directement les séquences promotrices (Kenney *et al.*, 1992). L'expression du gène *hsp70* est également régulée par la protéine c-Myb alors que son promoteur ne contient pas de cible pour la fixation de la protéine (Foos *et al.*, 1994 ; Kanei-Ishii *et al.*, 1994). Ainsi, la transactivation de ces gènes induite par c-Myb doit être médiée par d'autres protéines fixant l'ADN avec laquelle la protéine c-Myb interagirait. La protéine c-Myb agit alors comme un co-facteur et non comme un facteur de transcription classique.

2. Le domaine transactivateur de Myb

En plus de la présence d'un domaine de liaison à l'ADN, les facteurs de transcription possèdent un domaine transactivateur interagissant directement ou indirectement avec les composants du complexe de base de la transcription. Ces domaines sont regroupés principalement en trois groupes : les domaines transactivateurs acides, riches en glutamine ou encore riches en proline (Mitchell and Tijan, 1989). La protéine c-Myb contient, elle aussi, un domaine transactivateur comme l'ont démontré de nombreux auteurs (Weston and Bishop, 1989 ; Sakura *et al.*, 1989 ; Nishina *et al.*, 1989 ; Kalkbrenner *et al.*, 1990 ; Bortner and Ostrowski, 1991 ; Chen and Lipsick, 1993). Ainsi, le domaine transactivateur de la protéine c-Myb s'étend sur environ 50 AA en aval du domaine de liaison à l'ADN, entre les acides aminés 275 et 327 de la protéine c-Myb humaine (Kalkbrenner *et al.*, 1990). Ce domaine est très acide mais la transactivation n'est pas assurée par les résidus acides qui le composent mais par des résidus hydrophobes qui interviendraient dans les interactions protéine-protéine (Chen *et al.*, 1995).

Cependant, la présence de ce domaine minimal de transactivation ne suffit pas à activer la transcription de tous les gènes cibles de c-Myb ou v-Myb, ni à induire la transformation cellulaire. En effet, d'autres régions de la protéine c-Myb ou v-Myb interviennent également dans la transactivation (Ibanez and Lipsick, 1988 ; Senaca *et al.*, 1993 ; Chen *et al.*, 1995). Ainsi, Bortner et Ostrowski (1991) ont montré l'existence d'un second domaine transactivateur en C-terminal de la protéine et ayant un rôle dans l'interaction

avec des protéines transactivatrices. D'autres domaines ont ensuite été proposés comme domaines transactivateurs additionnels, notamment deux régions (AA 163 à 197 et 198 à 232 de v-Myb) entre le domaine de liaison à l'ADN et le domaine transactivateur minimal (positionné entre les AA 204 et 254 dans la protéine v-Myb), mais aussi un domaine dans la partie centrale de la protéine (AA 234 à 295 de v-Myb) et un domaine en C-terminal (AA 295 à 356 de v-Myb). Il y aurait coopération entre ces différents domaines pour interagir avec différentes protéines et agir sur le complexe de base de transcription (Chen *et al.*, 1995).

3. La région C-terminale

Elle contient, en plus des différents domaines transactivateurs décrits précédemment, différents domaines fonctionnels tel qu'un domaine de régulation négative de l'activité transactivatrice de la protéine Myb, un domaine de type leucine *zipper* important pour la dimérisation, différents sites de phosphorylation et un domaine impliqué dans le transport de la protéine au noyau.

a. Le domaine de régulation négative de la protéine c-Myb

Le domaine de régulation négative est situé à l'extrémité C-terminale de la protéine c-Myb. Il est tronqué dans la protéine v-Myb, suggérant un rôle important de ce domaine dans le contrôle négatif de la transactivation de c-Myb et de l'activité transformante de la protéine (Ibanez and Lipsick, 1988 ; Gonda *et al.*, 1989 ; Sakura *et al.*, 1989 ; Bortner and Ostrowski, 1991 ; Chen and Lipsick, 1993 ; Press *et al.*, 1994). Cette région est responsable d'interactions protéine-protéine mais la nature de ces protéines reste inconnue (Kanei-Ishii *et al.*, 1992 ; Favier and Gonda, 1994). Le domaine C-terminal de c-Myb exprimé à part agit comme dominant négatif de la protéine fonctionnelle c-Myb en séquestrant les protéines se fixant sur ce domaine et régulant négativement la transactivation de c-Myb (Hu *et al.*, 1991 ; Dubendorff *et al.*, 1992 ; Seneca *et al.*, 1993 ; Vorbrueggen *et al.*, 1994).

Ce domaine de régulation négative en C-terminal de la protéine c-Myb interagit en système double hybride avec un site de régulation négative situé en N-terminal du domaine de liaison à l'ADN (Dash *et al.*, 1996 ; Kiewitz and Wolfes, 1997). Ainsi, la régulation négative

de la protéine c-Myb se fait par repliement de la protéine sur elle-même, ce qui provoque une diminution de sa capacité de liaison à l'ADN. Ce repliement empêche aussi l'accessibilité du domaine transactivateur aux protéines impliquées dans la transactivation telle que la protéine CBP (*CREB Binding Protein*). L'interaction avec la partie N-terminale implique les acides aminés contigus E, V, E et S du domaine de régulation négative. Ce site EVES est présent dans de nombreuses protéines c-Myb de différentes espèces mais est absent dans les protéines homologues A-Myb et B-Myb. Il est également retrouvé dans la protéine p100, protéine qui interagit avec le facteur TFIIE du complexe basal de transcription (Tong *et al.*, 1995). Ainsi, l'inhibition de la transactivation induite par le domaine de régulation négative peut être levée par une compétition entre le site EVES en C-terminal de c-Myb et le site EVES de la protéine p100 pour la fixation de la partie N-terminale de c-Myb. La fixation de la protéine p100 à la partie N-terminale de c-Myb permet de restaurer l'accessibilité du domaine transactivateur, suggérant un rôle de la protéine p100 comme co-activateur de c-Myb (Dash *et al.*, 1996). Le domaine transactivateur peut alors interagir avec des protéines telle que la protéine CBP qui agit comme co-activateur transcriptionnel de c-Myb, notamment dans le cadre de la coopération entre les facteurs de transcription c-Myb et NF-M (Oelgeschläger *et al.*, 1996a) (voir paragraphe III.E).

b. Le domaine de dimérisation de c-Myb

Un domaine de type leucine *zipper* est également présent entre les domaines transactivateurs et de régulation négative de c-Myb (Kanei-Ishii *et al.*, 1992). La délétion de ce domaine augmente l'activité transactivatrice de la protéine c-Myb. Différentes protéines ont été identifiées pour leur interaction avec le domaine leucine *zipper* de Myb pour réguler négativement la transcription (Favier and Gonda, 1994). Toutefois, ce domaine sert également à la formation d'homodimères de la protéine Myb, rendue ainsi inactive pour la transactivation (Nomura *et al.*, 1993). Cette homodimérisation des protéines Myb est cependant contestée par d'autres auteurs (Krieg *et al.*, 1995).

c. Site de translocation nucléaire

La localisation nucléaire de la protéine c-Myb (Klempnauer *et al.*, 1984) fait intervenir un domaine de 29 AA localisé dans le motif répété R1 du domaine de liaison à l'ADN (Ibanez and Lipsick, 1988) ainsi que la séquence PLLKKIKQ positionnée entre les AA 521 et 528 de c-Myb (Dang and Lee, 1989).

4. Phosphorylation de c-Myb

L'activité de la protéine c-Myb est également régulée par phosphorylation de certains de ses résidus. Ainsi, la caséine kinase II (CKII) phosphoryle des résidus en N-terminal de la protéine c-Myb, alors que la protéine GSK3 phosphoryle un site proche du domaine leucine zipper et que la protéine MAPK (*Mitogenic Activated Protein Kinase*) phosphoryle des résidus en C-terminal de Myb (Lipsick, 1996).

Si la phosphorylation par la protéine GSK3 semble nécessaire à la transformation par v-Myb, son mode d'action reste inconnu (Lipsick, 1996).

La protéine p42^{MAPK}, impliquée dans la cascade de transduction du signal et le système de régulation de l'expression de certains gènes, phosphoryle la sérine en position 532 de c-Myb (Aziz *et al.*, 1993). La mutation de ce site augmente l'activité transactivatrice de c-Myb, suggérant le rôle de ce site de phosphorylation par la MAPK comme régulateur négatif (Aziz *et al.*, 1995). Il faut noter que l'activité régulatrice de la capacité de transformation de c-Myb par son domaine de régulation négative situé en C-terminal ne nécessite pas seulement cette sérine 532 et le motif EVES décrit précédemment, mais implique aussi les AA 443 à 514 (de c-Myb) contenant la séquence TTPFK. Cette séquence est très conservée entre espèces mais également dans les protéines homologues A-Myb et B-Myb (Sakura *et al.*, 1989 ; Dubendorff *et al.*, 1992). Les protéines interagissant avec ces AA conservés ne sont cependant pas connues.

La régulation la plus connue de la fonction de c-Myb par phosphorylation reste celle par la CKII. La CKII reconnaît des sérines ou thréonines suivies d'une séquence spécifique de 6 AA. Elle phosphoryle la protéine c-Myb préférentiellement sur les résidus Ser11 et Ser12 (Lüscher *et al.*, 1990), mais d'autres sites de phosphorylation ont été mis en évidence *in vivo*

et *in vitro* (Aziz *et al.*, 1995). Cette phosphorylation diminue la capacité de liaison à l'ADN de la protéine c-Myb. Ces résidus reconnus par la CKII sont absents dans la protéine tronquée v-Myb, ne permettant plus la régulation par la CKII de la fixation du domaine R2R3 à l'ADN (Lüscher *et al.*, 1990 ; Oelgeschläger *et al.*, 1995). Cependant, la phosphorylation par la CKII ne module l'affinité du domaine de liaison pour sa cible que lorsqu'il s'agit d'une cible de haute affinité mais ne modifie pas la fixation aux sites de plus basse affinité (Oelgeschläger *et al.*, 1995). D'autres auteurs ont montré que la phosphorylation par la CKII sur les mêmes sites pouvait induire une augmentation de la capacité de liaison à l'ADN de c-Myb, probablement en empêchant l'effet de régulation négative du domaine C-terminal par repliement de la protéine sur elle-même (Ramsay *et al.*, 1995). Différentes mutations du domaine N-terminal de Myb modifient la spécificité de la protéine pour des cibles présentes dans différents promoteurs en fonction du type cellulaire utilisé, suggérant que les sites de phosphorylation par la CKII interagissent avec des protéines présentes ou non dans les types cellulaires étudiés (Dini and Lipsick, 1993 ; Oelgeschläger *et al.*, 1995).

E. Coopération entre c-Myb et NF-M

La régulation fine de la transcription des gènes cellulaires nécessite l'action de multiples facteurs de transcription sur le promoteur des gènes cibles. Certains d'entre eux agissent indépendamment sur la transcription alors que d'autres coopèrent pour *trans*-réguler de manière synergique la transcription des gènes cibles. Ainsi, différents facteurs de transcription coopèrent avec la protéine c-Myb. C'est le cas notamment du facteur de transcription CBF (*C*ore *B*inding *F*actor) pour réguler l'*enhancer* du TCR δ (Hernandez-Munain and Krangel, 1994, 1995), mais aussi l'*enhancer* du gène de la myéloperoxydase (Britos-Bray and Friedman, 1997) et le LTR du virus SL3 (*S*imian *L*eukemia *v*irus 3) (Zaiman and Lenz, 1996). C'est le cas également de la protéine BZLF1, protéine du virus Epstein-Barr (EBV), pour la régulation du promoteur précoce de EBV (Kenney *et al.*, 1992). La protéine Ets régule également, en coopération avec c-Myb, l'expression du gène *lck1* (McCracken *et al.*, 1994) et du gène de la glycoprotéine de surface CD13 (Shapiro, 1995).

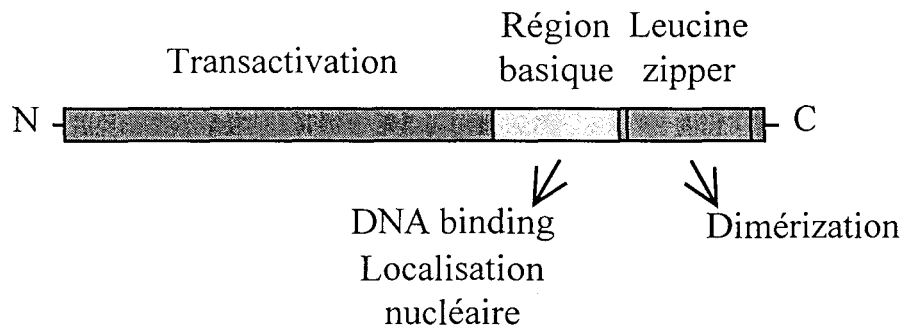
Toutefois, les facteurs c-Myb et NF-M agissant en synergie sur la transcription des gènes *mim1* (Burk *et al.*, 1993 ; Ness *et al.*, 1993 ; Kowenz-Leutz *et al.*, 1995 ; Mink *et al.*, 1996 ; Oelgeschläger *et al.*, 1995, 1996a), de la *neutrophil elastase* (Oelgeschläger *et al.*, 1996b ; Nuchprayoon *et al.*, 1997) et du lysozyme (Ness *et al.*, 1993), sont les seuls à pouvoir être co-immunoprécipités.

La protéine NF-M est l'homologue aviaire de la protéine humaine C/EBP β , encore appelée NF-IL6, LAP, IL6-DBP ou CRP2 selon les différents auteurs qui l'ont identifiée (Descombes *et al.*, 1990 ; Ron and Habener, 1992 ; Ness *et al.*, 1993 ; Wedel and Zigler-Heitbrock, 1995). Plusieurs membres de la famille C/EBP ont été décrits : C/EBP α , C/EBP β , C/EBP δ , C/EBP γ , crp1, d/CEBP de *Drosophila* et CHOP10 (pour revue voir Wedel and Zigler-Heitbrock, 1995). Toutes ces protéines C/EBP (pour CAAT/Enhancer Binding Protein) reconnaissent deux types de sites : la CAAT-*box* des promoteurs cellulaires et la séquence cible TGTGG^A/_T^A/G de certains *enhancer* viraux. La séquence optimale de reconnaissance serait une séquence palindromique de type GATTGC(N)_nGCAATC (Shuman *et al.*, 1990 ; Koldin *et al.*, 1995). Cependant, la protéine C/EBP γ qui n'a pas de domaine transactivateur agit comme un inhibiteur transdominant négatif des autres protéines C/EBP (Cooper *et al.*, 1995).

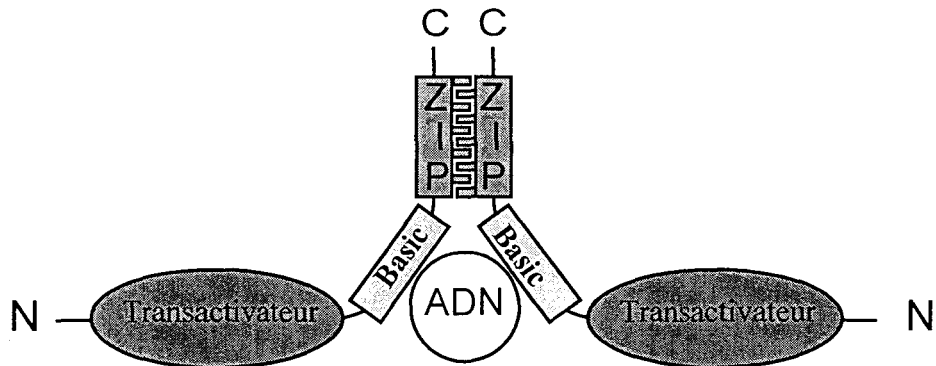
Toutes ces protéines sont très homologues dans leur partie C-terminale comprenant le domaine de liaison à l'ADN basique ainsi que le domaine leucine *zipper* (et appelé bZIP pour domaine basique associé à un domaine zipper) et reconnaissent toutes la même séquence d'ADN cible avec laquelle elles interagissent (Figure G8A). Cette liaison se fait via le grand sillon de la double hélice (Suckow *et al.*, 1993). Les protéines C/EBP peuvent former à la fois des homodimères et des hétérodimères par l'intermédiaire du domaine leucine *zipper* (Landschulz *et al.*, 1989 ; Roman *et al.*, 1990 ; Williams *et al.*, 1991) (Figure G8B). Mais elles peuvent aussi former des hétérodimères avec d'autres protéines de la super-famille des protéines à domaine b-ZIP telles que les protéines Fos, Jun et CREB/ATF (Vinson *et al.*, 1993 ; Hurst, 1994). Dans ce cas, C/EBP ne reconnaît pas sa propre séquence cible mais les sites de fixations AP1 ou CRE reconnus par leurs partenaires (Fos/Jun ou CREB/ATF, respectivement) (Sterneck *et al.*, 1992 ; Vallejo *et al.*, 1993 ; Hsu *et al.*, 1994).

Les protéines C/EBP interagissent aussi avec des protéines qui n'appartiennent pas à la superfamille des protéines b-ZIP comme avec celles de la famille Rel (p50 et p65 NF κ B ainsi

A



B



C

Element E de HBV:

5' -TGGGGGTTGCGTCAGCAAACAACCTTG-3'

3' -ACCCCAACGCAGTCGTTTGTAGAAC-5'

Figure G8 : Structure de la protéine NF-M (C/EBP β).

La protéine NF-M, représentée de manière linéaire dans le schéma du haut, s'homodimérise par son domaine *leucine zipper* et se fixe via son domaine basique sur sa séquence d'ADN cible telle que l'élément E de l'*enhancer* du virus HBV (représenté en bas). N et C représentent respectivement les extrémités amino- et carboxy-terminale de la protéine.

que Rel A) (LeClair *et al.*, 1992 ; Stein *et al.*, 1993) avec lesquelles la protéine C/EBP β régule en synergie la transcription des gènes IL-6 et IL-8 (Matsukara *et al.*, 1993 ; Stein and Yang, 1995). Elles interagissent également avec les récepteurs hormonaux nucléaires comme le récepteur orphelin HNF-4 en coopération avec lequel C/EBP α régule la transcription du gène de l'apolipoprotéine B (Metzger *et al.*, 1993). Les protéines C/EBP régulent aussi l'expression de certains gènes en synergie avec la protéine c-Myb mais sans qu'il n'y ait d'interaction directe entre ces deux facteurs de transcription.

La partie N-terminale des protéines C/EBP α et C/EBP β contient à la fois un domaine transactivateur et plusieurs domaines atténuateurs de la transactivation. L'activation de la protéine C/EBP β (NF-M) se fait probablement par changement de sa structure (Kowenz-Leutz *et al.*, 1995). Le domaine transactivateur interagit avec un domaine atténuateur, faisant intervenir le résidu Thr²¹⁸, un site de phosphorylation par la MAPK (Kowenz-Leutz *et al.*, 1994). Le domaine de transactivation permet également d'interagir avec les protéines TBP et TFIIB du complexe basal de transcription, pour médier la transactivation (Nerlov and Ziff, 1995).

Au niveau de sa distribution tissulaire, C/EBP β est fortement exprimée dans les cellules hépatiques matures (Umek *et al.*, 1991), les adipocytes (Cao *et al.*, 1991) et dans les cellules myélomonocytiques (Scott *et al.*, 1992), mais est également exprimée dans les cellules B matures, les cellules endothéliales, les fibroblastes, dans la glande pituitaire, le placenta et les carcinomes mammaires (Wedel and Zigler-Heitbrock, 1995). Elle y régule différents gènes tels que celui de la sérum albumine (Lichtensteiner *et al.*, 1987), de la transferrine, de l' α 1 fétoprotéine (Thomassin *et al.*, 1992), du collagène α 1, de l'IGF-II (van Dijk *et al.*, 1992), du facteur HNF-3 β (Samadani *et al.*, 1995), du gène de la phosphoénolpyruvate carbokinase dans les cellules du foie (Croniger *et al.*, 1997) et des gènes IL-1B, IL-6, IL-8, TNF- α , M-CSF, G-CSF, *mim1*, lysozyme dans les cellules myélomonocytiques (Wedel and Zigler-Heitbrock, 1995). La protéine C/EBP β régule aussi l'expression du récepteur α du GM-CSF en collaboration avec la protéine PU-1/Spi1 (Hohaus *et al.*, 1995) et celui du facteur de coagulation IX (Boccia *et al.*, 1996). Les protéines c-Myb, C/EBP α et C/EBP β sont également capables de réguler l'expression du gène 422 dans les adipocytes (Chenaval *et al.*, 1991).

Au niveau du promoteur du gène *mim1*, la protéine c-Myb reconnaît trois sites de fixation *mim1A*, *mim1B* et *mim1C* mais transactive surtout à partir du site *mim1A* pour lequel elle a le plus d'affinité. La protéine NF-M, quant à elle, reconnaît deux sites de fixation, l'un entre *mim1A* et *mim1B* et l'autre en 3' de *mim1A*; la présence de ces deux sites est indispensable à l'action de la protéine NF-M (Burk *et al.*, 1993 ; Ness *et al.*, 1993). Toutefois, il faut noter qu'à forte concentration, la protéine c-Myb ne peut pas coopérer avec NF-M alors que la coopération est pleinement efficace pour des concentrations en protéine c-Myb plus faibles (Burk *et al.*, 1993). Le promoteur de la *neutrophil elastase* ne contient qu'un seul site de fixation pour chacune des protéines c-Myb et NF-M, ces deux sites n'étant séparés que d'une seule paire de bases (Oelgeschläger *et al.*, 1996b ; Nuchprayoon *et al.*, 1997). Par contre, le promoteur du gène du lysozyme ne contient pas de site de fixation pour la protéine c-Myb mais seulement un site pour NF-M.

L'interaction entre les deux facteurs de transcription c-Myb et NF-M n'est pas directe mais fait intervenir un facteur de pontage. Ce facteur a récemment été identifié comme étant une protéine de 100 kDa appelée p100 (Dash *et al.*, 1996), protéine interagissant également avec la protéine TFIIE du complexe basal de transcription et le facteur de transcription EBNA-2 du virus Epstein-Barr (Tong *et al.*, 1995). La protéine p100 possède des homologies avec le domaine de régulation négative de la partie C-terminale de c-Myb, tous deux pouvant interagir avec un motif dans le domaine de liaison à l'ADN de c-Myb (Dash *et al.*, 1996). Cette protéine p100 peut donc entrer en compétition avec le domaine de régulation négative de c-Myb et ouvrir ainsi la protéine afin de permettre l'interaction du domaine transactivateur avec ses cibles pour agir sur la transcription des gènes dont elle fixe les promoteurs.

En parallèle, la protéine CBP (CREB Binding Protein) a également été identifiée comme étant un co-activateur de c-Myb en interagissant avec la partie C-terminale du domaine transactivateur de c-Myb (Kiewitz et Wolfes, 1997). Elle médie l'activité transactivatrice de la protéine c-Myb par interaction avec le facteur TFIIB du complexe de base de transcription qui lui-même entre en contact avec la TBP et permet le recrutement de l'ARN polymérase II au niveau du promoteur (Dai *et al.*, 1996) ou, comme récemment montré, avec l'ARN hélicase A associée au complexe transcriptionnel de base (Nakajima *et al.*, 1997). La protéine CBP est connue pour interagir avec le facteur de transcription CREB (cAMP Response Element Binding protein) mais est connue aussi comme médiateur dans l'activité transcriptionnelle des facteurs de transcription c-Fos et c-Jun. CBP interagit avec c-

Myb ou CREB par le même domaine mais seule la fixation à CREB est modulée par phosphorylation, suggérant que le facteur CBP est un activateur constitutif de c-Myb. La protéine p300, très homologue à CBP, a également été identifiée récemment comme étant un facteur de pontage entre c-Myb et C/EBP β . Elle interagit avec c-Myb par un domaine permettant aussi la fixation au facteur CREB, domaine très homologue à celui de CBP pour la reconnaissance de CREB. La fixation à C/EBP β fait intervenir un domaine plus en N-terminal de p300, domaine qui interagit aussi avec la protéine E1A (Mink *et al.*, 1997).

Récemment, une autre protéine a également été démontrée comme pouvant interagir à la fois avec c-Myb et NF-M et activer plus encore la synergie entre ces deux facteurs. Il s'agit du complexe GABP qui se fixe sur un élément du promoteur de la *neutrophil elastase*, non loin des sites pour les protéines c-Myb, NF-M et CBF. GABP est un complexe hétérotétramérique constitué de deux protéines GABP α , protéines de la famille Ets et donc homologues au facteur PU-1 qui a déjà été présenté comme coopérant avec NF-M (Hohaus *et al.*, 1995), et de deux protéines GABP β contenant des domaines homologues avec la protéine Notch de Drosophile. GABP α se fixe sur le site *ets* du promoteur de la *neutrophil elastase* puis recrute la protéine GABP β pour former le complexe transcriptionnellement actif GABP. Le complexe GABP augmente l'effet synergique entre c-Myb et NF-M (Nuchprayoon *et al.*, 1997).

F. Les protéines de la famille Myb

La protéine c-Myb est retrouvée dans de nombreuses espèces animales, comme dans le Xénope (Amaravadi and King, 1994) et la Drosophile (Katzen *et al.*, 1985), mais aussi dans les plantes comme le pétunia (Solano *et al.*, 1995) et dans certains champignons comme le *Dictyostelium discoideum* (Stober-Grässer *et al.*, 1992). Cependant, d'autres protéines homologues de la protéine c-Myb sont également retrouvées dans différentes espèces. Les deux premières découvertes sont les protéines A-Myb et B-Myb chez l'homme (Nomura *et al.*, 1988).

La protéine A-Myb est la plus homologue de c-Myb. Elle contient un domaine de liaison à l'ADN composé, comme c-Myb, de trois domaines répétés, homologue à 90% à celui

de c-Myb et fixant la même séquence d'ADN. Elle contient également un domaine transactivateur riche en acides aminés acides comme c-Myb et peut transactiver des promoteurs contenant leur cible commune (Golay *et al.*, 1994 ; Foos *et al.*, 1994 ; Ma and Calabretta, 1994 ; Trauth *et al.*, 1994 ; Takahashi *et al.*, 1995). De même, A-Myb contient un domaine de type leucine zipper mais plus dégénéré que celui de c-Myb et le domaine de régulation négative (Katzen *et al.*, 1985 ; Sleeman, 1993). Ce domaine C-terminal de A-Myb ressemble plus à celui de la protéine p85^{c-Myb}, issue d'un épissage incomplet de l'ARN pour conserver l'exon 9A, qu'à celui de la protéine p75^{c-Myb}. Cette insertion de 121 AA codés par l'exon 9A interrompt le domaine leucine zipper de c-Myb, suggérant que la protéine A-Myb, de la même manière que la protéine p85^{c-Myb}, serait moins sujette que la protéine p75^{c-Myb} à une régulation négative par l'action du domaine leucine zipper (Shen-Ong *et al.*, 1989). La protéine A-Myb est exprimée à très haut niveau dans les spermatogonies, les cellules précurseurs neuronaux et les cellules de la lignée B (Sleeman, 1993 ; Trauth *et al.*, 1994 ; Mettus *et al.*, 1994) et son expression ne change pas au cours du cycle cellulaire (Lyon *et al.*, 1994). La protéine A-Myb agit donc comme transactivateur sur les mêmes cibles et probablement avec les mêmes partenaires que c-Myb mais pas dans les mêmes types cellulaires.

La protéine B-Myb, quant à elle, contient un domaine de liaison à l'ADN composé de trois séquences répétées ayant 75% d'homologie avec celui de c-Myb et reconnaît la même séquence d'ADN que c-Myb (Mizugushi *et al.*, 1990). Cependant, quelques préférences existent pour les bases adjacentes au site de fixation (Howe and Weston, 1991). B-Myb ne contient pas de leucine zipper ni de domaine de régulation négatif. Il ne contient pas de région homologue au domaine transactivateur de c-Myb mais peut activer la transcription à partir d'un domaine différent situé entre les AA 205 et 338. Ce domaine transactivateur est légèrement acide et est indispensable pour transactiver des promoteurs tels que ceux de *c-myc* ou de SV40 (Mizugushi *et al.*, 1990 ; Nakagoshi *et al.*, 1992). L'activité régulatrice de B-Myb semble restreinte à certains types cellulaires où elle agirait en général comme répresseur transcriptionnel (Foos *et al.*, 1993 ; Watson *et al.*, 1993 ; Nakagoshi *et al.*, 1993). Ainsi, B-Myb et c-Myb interagiraient avec des co-facteurs différents (Tashiro *et al.*, 1995) expliquant que la protéine B-Myb ne puisse pas transactiver le gène *mim1* alors qu'elle interagit avec le site de fixation *mim1A* (Foos *et al.*, 1993).

La protéine B-Myb est exprimée dans de très nombreux types cellulaires et n'est pas limitée à la lignée hématopoïétique. Elle est notamment importante pour la différenciation et la survie des cellules neuroblastiques (Raschellà *et al.*, 1995). Par ailleurs, elle est exprimée plus tôt que c-Myb et A-Myb au cours de l'embryogenèse et dans tous les types cellulaires en prolifération, suggérant que la protéine B-Myb a un rôle général dans la division cellulaire (Sitzmann *et al.*, 1996) et le contrôle du cycle cellulaire (Lam *et al.*, 1992). La protéine B-Myb est exprimée pendant tout le cycle cellulaire mais avec un pic en début de phase G1 et pendant la phase S, de manière similaire à l'expression de c-Myb (Golay *et al.*, 1991 ; Lam *et al.*, 1995). B-Myb est, par ailleurs, phosphorylée pendant la phase S sans que le rôle de la phosphorylation ni que la protéine responsable ne soient connus (Robinson *et al.*, 1996). Elle est une cible directe de la protéine E2F, régulateur crucial pour la transition G1/S (Lam and Watson, 1993) et serait ainsi requise pour la progression normale dans le cycle cellulaire (Arsura *et al.*, 1992).

D'autres protéines homologues à c-Myb sont également retrouvées dans des plantes. Les plus fortes homologies sont concentrées dans le domaine de liaison à l'ADN mais celui-ci peut fixer des séquences d'ADN totalement différentes de celles reconnues par la protéine c-Myb animale. C'est le cas de la protéine MybSt1 isolée de la pomme de terre qui ne contient qu'un seul domaine R et transactive après fixation sur les séquences de type GGATA (Baranowskij *et al.*, 1994) et de la protéine BAS1 de *Saccharomyces cerevisiae* (Hovring *et al.*, 1994).

RESULTATS-DISCUSSION

I. Etude du domaine de liaison à l'ADN de la protéine c-Abl humaine

A. Détermination de la séquence cible de fixation de la protéine c-Abl

Afin de déterminer la séquence cible de liaison à l'ADN de la protéine c-Abl ainsi que son mode d'interaction, nous avons d'abord entrepris de délimiter son domaine de liaison à l'ADN afin de produire et de purifier la protéine correspondante qui sera utilisée lors des expériences d'interaction avec l'ADN.

1. Délimitation du domaine de liaison à l'ADN de c-Abl

Le domaine de liaison à l'ADN de la protéine c-Abl murine a tout d'abord été déterminé par Kipreos and Wang (1992) dans la partie C-terminale de la protéine. Afin de le délimiter dans la protéine humaine, nous avons d'abord testé la capacité de liaison à l'ADN de la large partie C-terminale de la protéine humaine. Pour cela, le fragment d'ADN compris entre les deux sites *Bgl*III (1233 et 3440, numérotation par rapport au gène *c-abl*) de la partie c-Abl du gène hybride Bcr-Abl est cloné dans le site compatible *Bam*HI du vecteur pcDNA3, en aval du promoteur T7. Ce fragment contient un codon d'initiation ATG, en phase avec la séquence codante, positionné 8 pb en aval du site *Bgl*III (1233) et indispensable pour la production de la protéine appelée BB. La protéine BB est produite en lysat de réticulocytes en présence de méthionine marquée. Sa capacité de rétention à la DNA-cellulose est analysée face à des lavages par des tampons de concentration saline croissante (40 mM, 100 mM, 300 mM, 500 mM et 1 M NaCl). Les différentes fractions d'élution sont séparées sur gel SDS-PAGE et quantifiées. Un pic d'élution est obtenu pour une concentration saline de 300 mM NaCl (indiqué +++ sur la figure R1). La capacité de liaison à l'ADN de ce large domaine est comparée à celle d'un domaine plus en amont de la protéine Bcr-Abl (exprimé à partir du fragment *Hind*III(3206)-*Bcl*I(5104), numérotation par rapport au gène hybride *bcr-abl*) ainsi qu'à celle de la protéine luciférase. Ces deux dernières protéines n'ont pas la capacité d'interagir avec de l'ADN et sont éluées rapidement. Nous avons vérifié que la protéine BB ne fixait pas la cellulose elle-même et qu'elle ne fixait que très faiblement de l'ADN dénaturé fixé sur la cellulose. La rétention de la protéine BB est donc bien due à la présence d'un domaine de liaison à l'ADN au sein de la protéine. Afin de tester une protéine plus restreinte

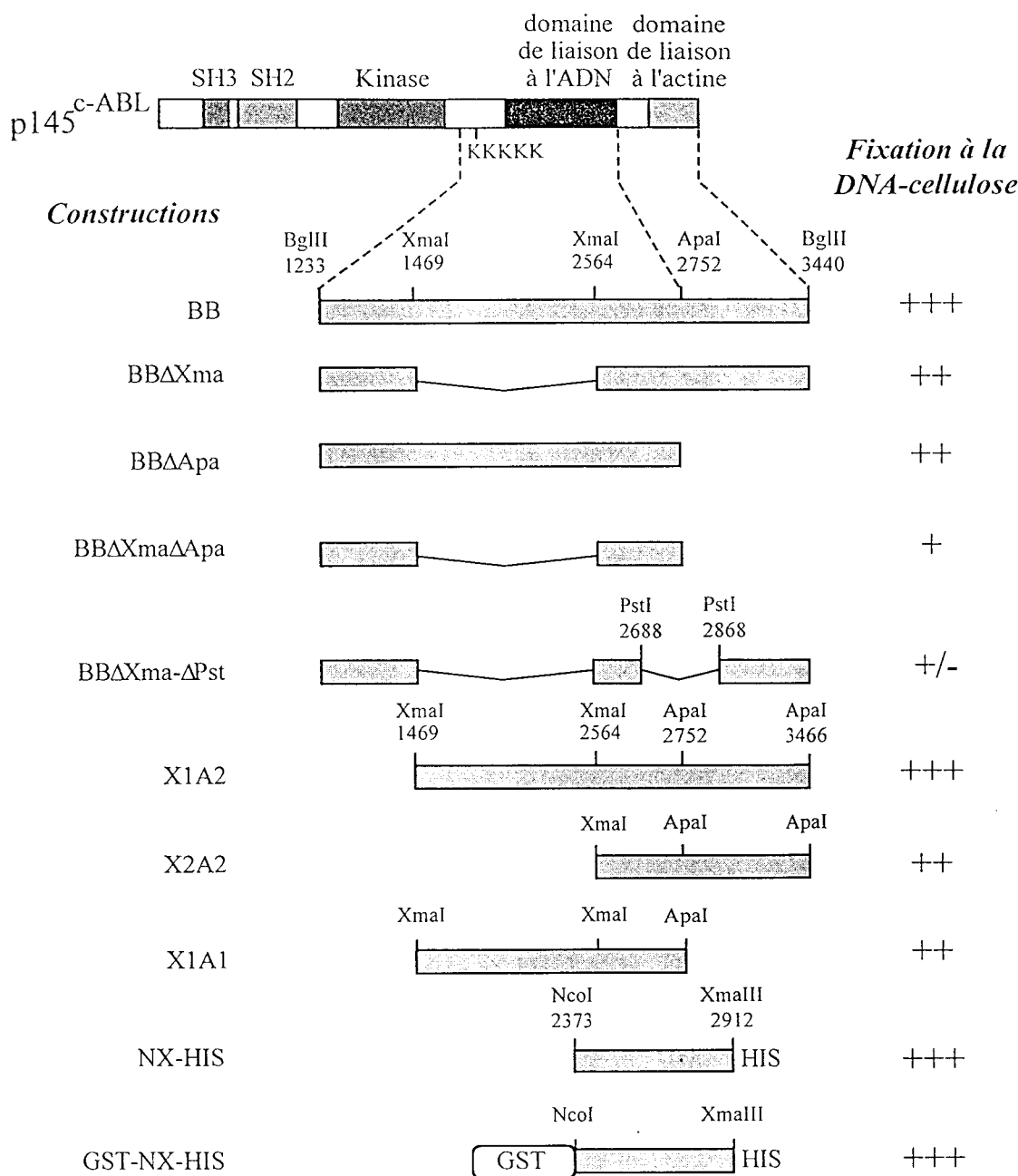


Figure R1 : Délimitation du domaine de liaison à l'ADN de c-Abl humain.

Les différents mutants de délétion sont marqués à la méthionine S³⁵ en lysat de réticulocytes avant d'être incubés avec la DNA-cellulose et élués avec des solutions de concentration saline croissante. Le symbole +++ montre que la protéine est éluee à 300 mM NaCl dans les mêmes proportions que la protéine BB correspondant à la large partie C-terminale de c-Abl. Les symboles ++ et + représentent une élution avec un pic à 300 mM NaCl de plus en plus aplati par rapport à celui de la protéine BB. Le symbole +/- représente un pic d'élution à 100 mM NaCl suggérant une affinité pour la DNA-cellulose beaucoup plus faible que celle de la protéine BB. La partie Glutathione-S-Transférase et la séquence polyhistidine sont représentées respectivement par les symboles GST et HIS.

dans sa partie N-terminale, le fragment [*XmaI* (1469)-*ApaI* (3466)] a été cloné dans le vecteur pALTER-EX1, modifié par insertion d'un site multiple de clonage renfermant un signal ATG en phase avec les séquences codantes d'Abl insérées par l'intermédiaire de l'un ou l'autre des sites de restriction *XmaI*. Ce vecteur permet lui aussi la production de protéine en lysat de réticulocytes. La protéine X1A2 ainsi obtenue présente la même affinité pour l'ADN que la protéine plus large BB, suggérant que la partie codée par les séquences comprises entre les sites *BglIII* (1233) et *XmaI* (1469) n'intervienne pas dans l'interaction avec l'ADN. La délétion de la partie la plus en 3' (en aval du site *ApaI* en position 2752) de la protéine BB et de la protéine X1A2 a alors été réalisée et les mutants de délétion codent les protéines appelées respectivement BBdelApa et X1A1. Celles-ci présentent également un pic d'élution à 300 mM mais plus aplati, suggérant que l'affinité pour l'ADN diminue un peu (indiqué ++). De même, la délétion de la partie codée par les séquences comprises entre les deux sites *XmaI* (positions 1469 et 2564) aboutit à une faible diminution de l'affinité des protéines BBdelXma et X2A2 pour l'ADN (++). Le domaine minimal de liaison à l'ADN de la protéine c-Abl semble donc être codé par les séquences comprises entre les sites *XmaI* (2564) et *ApaI* (2752). La protéine X2A1 ne contient qu'un résidu méthionine mais pas de cystéine, nous n'avons donc pas pu le produire de manière suffisamment radiomarquée afin de vérifier son affinité pour la DNA-cellulose. Nous avons donc utilisé la protéine BBdelXmadelApa qui est plus radioactive grâce aux résidus méthionine de la partie N-terminale. Cette protéine doublement délétée interagit encore avec l'ADN mais avec une plus faible proportion de protéines éluées en pic à 300 mM (+). Une délétion interne *PstI* (2688)-*PstI* (2868) dans les séquences codant la protéine BBdelXma permet de produire une protéine qui a perdu, en très grande partie, sa capacité de fixation à l'ADN puisque le pic d'élution se trouve déplacé à la concentration saline de 100 mM au lieu de 300 mM pour les autres protéines (indiqué +/-). La capacité du domaine de liaison à se fixer sur l'ADN est supérieure à celle de certaines protéines testées pour leur affinité pour la DNA-cellulose tels que le domaine de liaison à l'ADN de la protéine SRY et les domaines A et B de la protéine HMG1 qui sont élués à 50% de la DNA-cellulose à une force ionique totale comprise entre 70 et 90 mM et à 100% à une force ionique totale de 100 mM pour le domaine B de HMG1 et à 200 mM pour le domaine A de HMG1 (Teo *et al.*, 1995a).

L'ensemble de ces résultats suggère que le domaine de liaison à l'ADN d'Abl est affecté par des délétions de sa séquence codante entre les sites de restriction *XmaI* (2564) et

ApaI (2752). Le domaine de liaison à l'ADN chevauche donc cette région. Ce domaine ne contient pas d'homologie avec des domaines de liaison à l'ADN typiques, aussi des études de comparaison de séquence de protéines ont-elles été entreprises mais n'ont pas révélé d'homologie significative avec d'autres protéines. Les meilleurs résultats concernaient des homologies avec des domaines qui n'étaient pas conservés au sein d'une même famille de protéines ou avec des régions autres que le domaine de liaison à l'ADN lorsqu'il s'agissait de protéines en ayant un.

2. Production et purification du domaine de liaison à l'ADN

Afin de produire le domaine de liaison à l'ADN de c-Abl en grande quantité, nous avons choisi de le produire en système bactérien. Pour cela, nous avons cloné la séquence d'ADNc chevauchant la région comprise entre les sites de restriction *XmaI* (2564) et *ApaI* (2752) et codant le domaine minimal de liaison à l'ADN précédemment déterminé dans des vecteurs d'expression procaryotiques. Concrètement, un site pour l'enzyme de restriction *NcoI* a été créé en position 2373 par mutagenèse dirigée, permettant de générer un codon ATG d'initiation de la traduction en phase avec la séquence codante. Le fragment [*NcoI* (2373)-*XmaI* (2912)] a ensuite été cloné entre les sites de restriction *NcoI* et *NotI* du vecteur pALTER-EX1, préalablement modifié par intégration dans son *polylinker* d'une séquence contenant entre autre ces deux sites de restriction. Le vecteur pALTER-NX ainsi obtenu a été modifié par ajout d'un oligonucléotide codant une succession de sept résidus histidine en 3' et en phase ouverte de lecture avec la séquence NX. Le vecteur pALTER-NX-HIS permet alors la production en système bactérien d'une protéine de fusion NX-HIS de masse moléculaire apparente de 21 kDa et pouvant être purifiée par interaction entre les résidus histidine et des colonnes de nickel. La protéine NX-HIS ainsi obtenue s'est révélée être insoluble et a donc dû être purifiée en condition dénaturante avant de subir une étape de renaturation progressive par dialyse contre le tampon D (voir Matériel et Méthodes). La quantité de protéine ainsi obtenue étant trop faible pour être utilisée dans l'ensemble des expériences à suivre, nous avons préféré utilisé le vecteur pGEX-2T dans lequel la séquence codant la protéine NX-HIS a été clonée en phase ouverte de lecture et en 3' des séquences GST (Glutathion-S-Transférase). Ce vecteur pGEX-NX-HIS permet la production en plus grande quantité d'une protéine de fusion GST-NX-HIS de 46 kDa, purifiable en conditions dénaturantes par son extrémité poly-

histidine affine pour le nickel. La protéine GST-NX-HIS correspond à environ 98 % des protéines totales ainsi purifiées. La présence des séquences GST et poly-histidine de part et d'autre des séquences de la protéine c-Abl permet également de stabiliser la partie C-terminale de la protéine c-Abl qui, seule, est très sensible aux dégradations comme nous l'avons préalablement observé et ainsi que l'avait remarqué Wang (1993). En effet, nous avons d'abord produit une protéine GST-BN de 72,5 kDa à partir du vecteur pGEX-BN obtenu par clonage du fragment [*Bcl*I(1955)-*Nar*I(3221)] dans le vecteur pGEX-3X. La protéine ainsi obtenue en bactérie était soluble mais était très rapidement dégradée dans sa partie C-terminale correspondant au domaine de la protéine c-Abl, ceci malgré la présence de nombreux inhibiteurs de protéases présents à chaque étape de purification et quelle que soit la souche bactérienne utilisée. La production en lysat de réticulocytes de la protéine NX-HIS marquée, ainsi qu'un marquage métabolique en bactéries avant la purification des protéines GST et GST-NX-HIS, nous ont permis de tester leur affinité pour la DNA-cellulose. Si la protéine GST n'a pas la capacité de lier l'ADN, l'affinité des protéines NX-HIS et GST-NX-HIS pour la DNA-cellulose s'est avérée être identique à celle des protéines BB et X1A2 produite en lysat de réticulocytes (notée +++ sur la figure R1). La fixation des protéines NX-HIS et GST-NX-HIS à la DNA-cellulose montre (i) que l'interaction entre le domaine C-terminal de c-Abl et l'ADN se fait directement et n'implique pas la présence d'une protéine contenue dans le lysat de réticulocytes, (ii) que les étapes de dénaturation et de renaturation réalisées lors de la purification du domaine de liaison à l'ADN produit en bactérie n'ont pas affecté sa capacité de liaison à l'ADN et (iii) que la séquence choisie [*Nco*I-*Xma*III] chevauche parfaitement la région codant le domaine minimal de liaison à l'ADN de c-Abl.

Nous avons alors déterminé la structure secondaire potentielle du domaine de liaison à l'ADN ainsi délimité. Cinq programmes de prédiction de structure ayant des modes de calcul différents ont été utilisés et un consensus en a été déduit (Garnier *et al.*, 1978 ; Gorman *et al.*, 1982 ; Levin *et al.*, 1986 ; Gibrat *et al.*, 1987 ; Gascuel and Golmard, 1988 ; Levin and Garnier, 1988 ; Geourjon and Deleage, 1995). La figure R2 montre que le domaine de liaison à l'ADN de c-Abl est constitué de trois hélices alpha potentielles et de trois feuillets bêta plissés dans l'ordre suivant : $\beta 1-\alpha 1-\beta 2-\alpha 2-\alpha 3-\beta 3$. Ce type d'agencement secondaire est semblable à celui du domaine de liaison à l'ADN de c-Myb, hormis que ce dernier est constitué d'hélices plus longues et séparées par de plus courtes régions de type « *coiled* ».

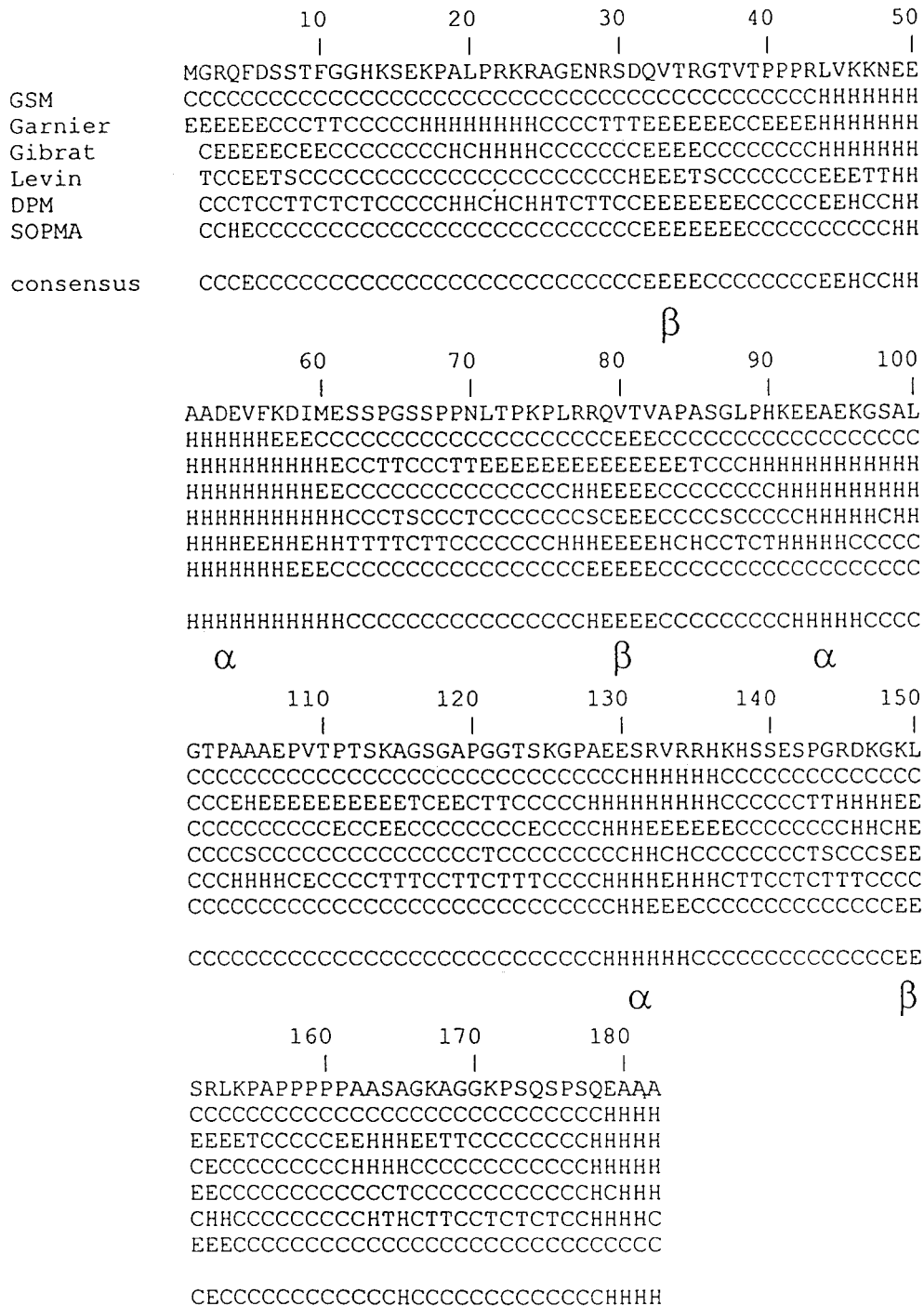


Figure R2 : Prédiction de la structure secondaire potentielle du domaine NX de liaison à l'ADN de c-Abl.

La première ligne correspond à la séquence protéique de la protéine NX. Les symboles H, C, T et E représentent respectivement des régions organisées en hélices alpha, en structure de type « coiled », en coude bêta et en feuillet bêta plissé. Le consensus représente la moyenne des résultats donnés par les cinq méthodes de prédiction de structure.

3. Détermination de la séquence d'ADN cible de la protéine c-Abl

La technique de *CASTing* (pour *Cyclic Amplification of Sequence Targetting*) a été utilisée pour déterminer la séquence cible du domaine de liaison à l'ADN de la protéine c-Abl. Cette technique consiste à sélectionner progressivement les séquences les plus affines pour une protéine immobilisée sur une résine. Ici, la protéine GST-NX-HIS est immobilisée sur billes de nickel puis incubée avec un mélange d'oligonucléotides de 62 pb contenant des séquences aléatoires. Le nombre de nucléotides variables au sein de la séquence de 62 pb a été limité à 12 pb. Ce choix s'est basé sur l'observation faite lors des expériences de fixation à la DNA-cellulose. Ainsi, deux témoins positifs produits en lysats de réticulocytes ont été utilisés : la protéine c-Myb, reconnaissant une séquence de 6 pb, fixe la DNA-cellulose de la même manière que la protéine BB correspondant au domaine de liaison à l'ADN de c-Abl alors que la protéine NF-M, fixant une séquence de 10 pb, a une très faible affinité pour la DNA-cellulose et est rapidement éluée. Cette faible affinité peut s'expliquer par le fait qu'une séquence spécifique de 10 pb se retrouve beaucoup moins fréquemment qu'une séquence de 6 pb dans la DNA-cellulose, suggérant que la protéine c-Abl devrait reconnaître une séquence courte du type de celle de la protéine c-Myb plutôt qu'une séquence plus longue. Une succession de 12 pb aléatoires apparaît donc suffisante pour déterminer la séquence cible de fixation à l'ADN de c-Abl.

Afin de sélectionner plus efficacement les séquences les plus affines, la stringence du tampon d'incubation a été progressivement augmentée par augmentation de sa force ionique (KCl jusqu'à 300 mM) et augmentation de la quantité de compétiteur non spécifique poly(dI-dC).(dI-dC) jusqu'à 5 µg par réaction alors que la quantité de protéine était diminuée (jusqu'à 0,5 ng). Les différents ampligènes sont marqués et leur affinité pour la protéine GST-NX-HIS est déterminée par retard en gel. Après neuf cycles de sélection-amplification, les ampligènes sont purifiés et digérés par les enzymes de restriction *Bam*HI et *Eco*RI (dont les sites sont compris dans l'une ou l'autre des amorces ayant servi à l'amplification) pour être clonés dans le vecteur pBS_{II}SK. Les ampligènes sont alors séquencés. Le résultat de l'alignement des séquences est présenté dans le tableau I. Plusieurs des séquences déterminées ont été retrouvées dans différents clones, suggérant que l'on approchait du nombre total d'ampligènes sélectionnés. Les séquences 11 et 14a sélectionnées par *CASTing* sont identiques mais étaient

```

          G A A A A C A A C A A C      O1
    A A A A C A A C A C A C A A C A A C A A      O2
          A A A A C A A C A C A C A A C A A C A A      O2
          A A A A A A C A G A C A G G      O3
          A A A A A A C A C A A C      O4
          A A C A A C A A C A A A      O5
          C A A A A C A A G A A A T A A G A A C A A C G T C      O6
    C A A A A C A A G A A A T A A G A A C A A C G T C      O6
          A A A A A C A C G A A A C      O7
          G T A A C A A A C G G G      O8
          G G A A A C A A C A A C      O9
          G A A G C A A A A C A G      10
          A A G C A A A A C A A C G      11
          A C A A C A A C A A C A      12
    G G G A A A A C C A A C G A C A A G C A A A C A A C G      13
          A A G C A A A A C A A C G      14a
          A A A A A C A C G A A A C G A C A A A T C A A A T G      14b
          C A C A A A C A A C A A G A C A C G A      14c
          A A A A C A A G A A A T A A G A A C A A C G T C      15
    A A A A C A A G A A A T A A G A A C A A C G T C      15
          C A A C A A A G A A G C A C G A C A A C G A C C      16
          C C A A A A C G A C C A G A A A A A T A G G      18
          C A C A T A A A C A G G      19a
    G T A A G A A C A A G A A A C A A A C A      19b
          G A A C A G C A A A A C      20
          A A A G C A A C A A C G C A      21
          C A A A A A A C G A G A G T      22a
          C A A A C A A C A A C G      22b
    C G T G G A A A A C C A A C G A C A A G C C A A A A C A A C      22c
          A A A A C C A A C G A C A A G      23
          G G A A C A A A A A G G      24a
          G C A G C A A C A T G G      24b
    G C T A A G A A C A A G A A A C A A A C A      27a
          G A A A A C A A A C G A A      27b
          G G A A A A C A G C G A      28
    A A A C A T A A G A A A G A A C A A G A A      29
          A G C A C A T A A A C      30
          A A A A C A G A A A A C      32
          G C A A A C A A A C A G G      34
          A A A A C A A C A A T A      35
          G A A A C A A C A A T A C      37
          C A A A A C A A A A T G      38
          G A A C A A C A C A A A      39
          G A C A A A C A A A A G G      40

```

Total Number	28	36	42	44	44	44	44	43	43	42	36	30
--------------	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

G	8	3	6	5	0	0	0	4	7	9	10	3
A	13	24	31	28	44	44	0	39	31	11	20	21
T	1	0	2	0	0	0	0	0	2	0	0	2
C	7	9	3	11	0	0	44	0	3	22	6	4

% Consensus

	46	67	74	63	100	100	100	91	72	52	55	70
A	A	A	A	A	A	A	C	A	A	C	A	A
G	C		C						A	G		
	29	25		25					26	28		
C									G	C		
	25								21	17		

```

    G T G A G G A A A A G G      17
    T A A A G T A A A G G T A G G A A A G C A C A      25
    C A C A A A T A A A A      26
    G C C A A A T C A G G C      31
    T G G T A C A C G G G C      33
    C C A T A T A C T C T G      36

```

Tableau I : Détermination du consensus de fixation par CASTing.

Les différentes séquences isolées par *CASTing* sont alignées de manière à révéler le consensus de fixation. Les six séquences placées en bas ne contiennent pas le motif AAC et ne sont pas utilisées pour la détermination du consensus. Les séquences a, b ou c correspondent à des ampligènes trouvés dans le même vecteur de clonage.

présentes en sens opposé entre les séquences des amorces, montrant qu'il s'agit là de deux ampligènes différents dont les séquences sélectionnées par le domaine de liaison à l'ADN sont identiques dans leur totalité. Sur les 41 séquences déterminées, 35 montrent une forte homologie au niveau de séquences de type AAC ou AACAA, elles ont donc été utilisées comme base pour l'alignement présenté en haut du tableau I, alors que les 6 autres séquences non utilisées sont représentées en bas du tableau. Les 35 séquences alignées contiennent toutes le motif AAC du site de fixation ainsi déterminé. Ce motif est retrouvé en multimère dans certaines séquences (voir séquences 01, 05 ou 12 du tableau I) alors que d'autres contiennent une séquence plus longue AAAAACA. Un consensus large $A^A/C AACAA^A/C$ a été déterminé sachant que le site strict de liaison à l'ADN semble impliquer le motif AAC.

Il faut noter que, dans de nombreuses séquences, le nombre de paires de bases comprises entre les *primers* est supérieur aux 12 pb aléatoires de départ. Une analyse des ampligènes des 9 cycles de sélection-amplification sur gel de polyacrylamide dénaturant a montré que la proportion d'ampligènes de taille supérieure à 62 pb augmentait au long de la sélection. Cette augmentation semble être le résultat de la sélection, par la protéine GST-NX-HIS, d'ampligènes de taille plus grande obtenus par erreurs de PCR, plutôt que d'un problème de PCR seul qui sélectionne préférentiellement des séquences d'ADN plus courtes.

4. Etude de l'interaction ADN-protéine par retard en gel

Alors que nous venions de séquencer nos clones et de déterminer une séquence consensus de fixation, Miao et Wang (1996) présentaient la détermination de la séquence cible de fixation à l'ADN de la protéine Abl murine. Ils proposent que la protéine Abl murine reconnaît non pas un consensus strict de fixation mais une séquence riche en paires de bases A ou T. Parmi les séquences que nous avons déterminées, nombre d'entre elles sont riches en duplex A-T, y compris parmi les séquences que nous n'avons pas retenues pour la détermination du consensus, mais nous n'avons retrouvé aucune séquence contenant les successions linéaires de bases A ou T comme reporté par Miao et Wang (1996). Nous avons donc voulu vérifier la capacité de fixation de la protéine GST-NX-HIS à quelques séquences représentatives.

Par la technique de retard en gel, nous avons étudié l'interaction de la protéine GST-NX-HIS (1 μ M) avec différentes sondes contenant ou non des séquences issues du *CASTing*

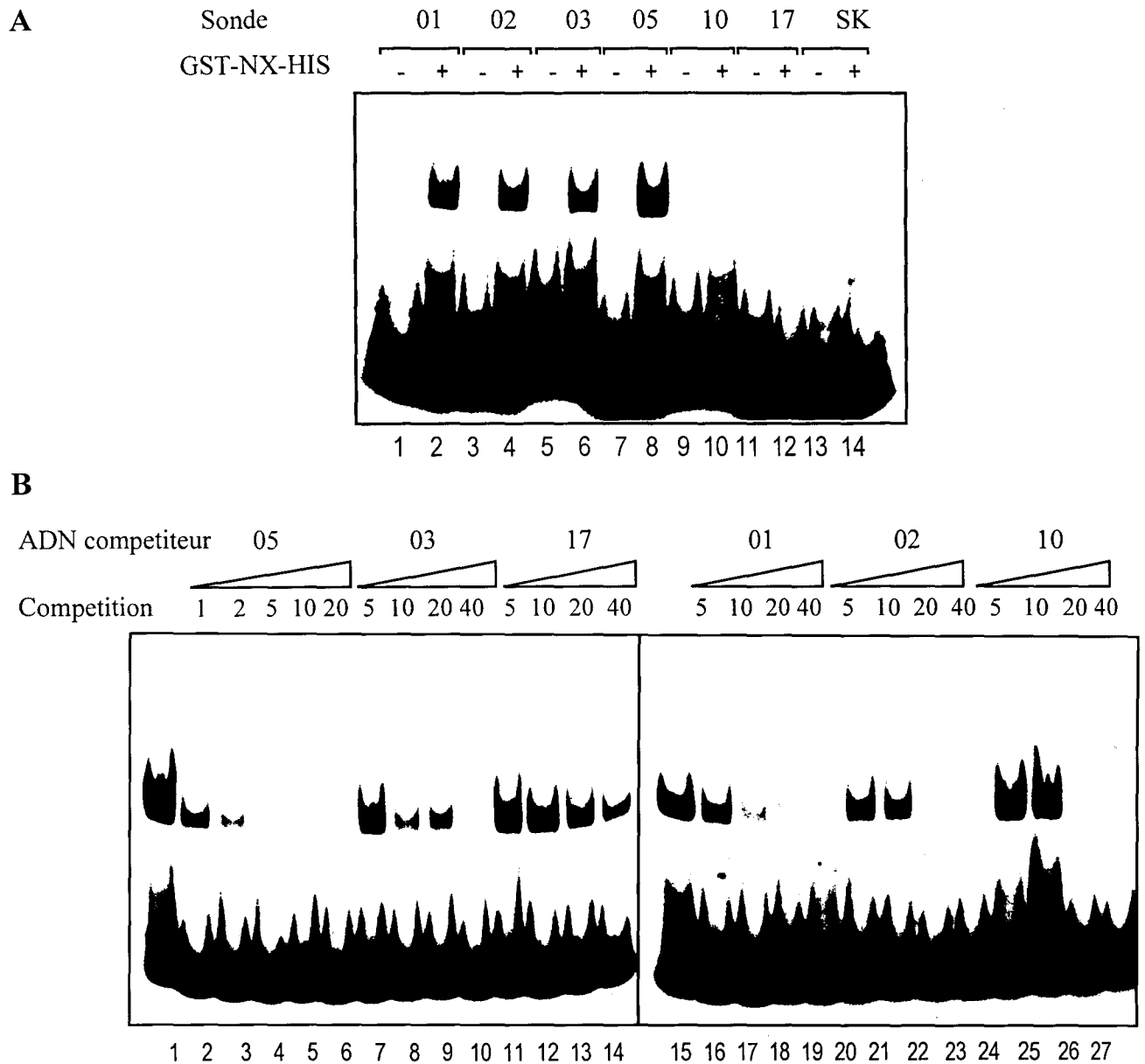


Figure R3 : Etude de la fixation de la protéine GST-NX-HIS à différentes séquences isolés par CASTing.

Les différentes sondes et fragments non marqués sont obtenus par digestion enzymatique des vecteurs de clonage au niveau des sites de restriction *Xba*I et *Xho*I encadrant les sites de clonage des ampligènes. (A) Les différentes sondes sont incubées avec (+) ou sans (-) 1 μ M de protéine GST-NX-HIS en présence de poly(dI-dC)(dI-dC). (B) Le complexe formé entre la protéine GST-NX-HIS (1 μ M) et la sonde 05-*Xba*I-*Xho*I (pistes 1 et 15) est incubé avec des concentrations croissantes d'ADN compétiteur correspondant aux fragments *Xba*I-*Xho*I contenant les séquences 05 (pistes 2 à 6), 03 (pistes 7 à 10), 17 (pistes 11 à 14), 01 (pistes 16 à 19), 02 (pistes 20 à 23) et 10 (pistes 24 à 27).

(Figure R3A). Les sondes ont été obtenues par digestion enzymatique au niveau des sites *XbaI* et *XhoI* des vecteurs contenant les séquences indiquées sur la figure, générant un fragment de 73 à 78 pb selon les sondes, suivi d'un marquage en 3'. Le vecteur pBS_{II}SK d'origine a été utilisé comme contrôle (appelé SK). Les pistes impaires correspondent aux sondes seules alors que les pistes paires correspondent à l'incubation de la protéine GST-NX-HIS avec les sondes correspondantes. Un complexe protéine-sonde retardé apparaît dans les pistes correspondant aux sondes 01, 02, 03, 05 et plus faiblement avec la séquence 10. Aucun complexe retardé n'est observé dans le cas de l'incubation de la protéine avec la sonde contenant la séquence 17, qui ne correspond pas au consensus déterminé, ni avec la sonde SK issue du vecteur de départ ne contenant pas de séquence isolée par *CASTing* ni d'homologie avec le site consensus de fixation. L'interaction semble plus forte avec la séquence 05 puis avec les séquences 01, 03, 02 et 10. Des expériences de compétition du complexe protéine-sonde 05 par des fragments *XbaI-XhoI* non marqués, issus des différents clones du *CASTing* indiqués, montrent la même préférence (Figure R3B). Ceci suggère que la séquence consensus déterminée correspond bien au site de fixation à l'ADN de c-Abl.

Il faut noter que les mêmes séquences issues du *CASTing* mais au sein d'un fragment d'ADN plus court compris entre les sites de restrictions *BamHI* et *EcoRI* utilisés pour le clonage (de 32 à 37 pb) ont montré une interaction beaucoup plus faible avec la protéine. L'augmentation de la taille de la sonde 05 de 32, 52, 59, 80, 87, 125 et 136 pb montre une augmentation progressive de la capacité d'interaction avec la protéine (résultat non montré), alors même que les séquences ajoutées de part et d'autre du site 05 sont identiques à celles contenues dans la séquence SK testée dans les pistes 13 et 14 de la figure R3A. Cette augmentation de l'interaction avec la taille du fragment d'ADN atteint un maximum à partir d'environ 80 pb ; une taille plus grande ne modifie plus l'affinité. Ceci suggère que la présence de fragments d'ADN de taille suffisante en 5' et/ou en 3' du site préférentiel de fixation est indispensable pour stabiliser les interactions et permet d'expliquer la présence des ampligènes de taille supérieure à 62 pb sélectionnés par le domaine de liaison à l'ADN de c-Abl lors du *CASTing*. Ceci suppose que le domaine de liaison à l'ADN de c-Abl reconnaît un site préférentiel de fixation mais que la liaison est stabilisée par des interactions non séquence-spécifique agissant plus loin sur l'ADN cible. Ce type de fixation ressemble au mode d'interaction avec l'ADN de la protéine c-Myb qui nécessite la présence d'au moins 10 pb en 3' de sa séquence cible pour avoir une affinité maximale (Gabrielsen *et al.*, 1991).

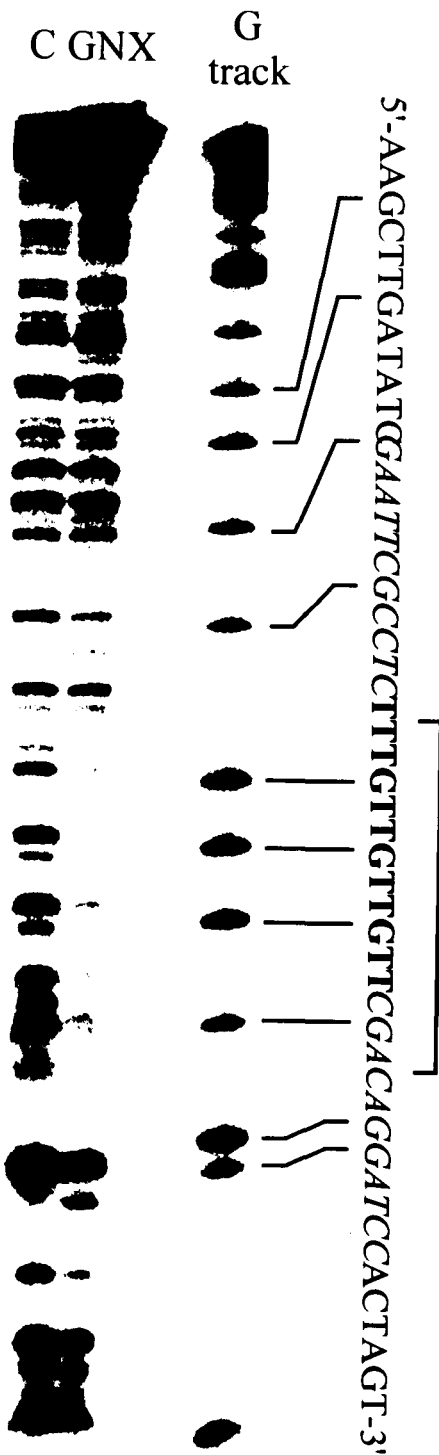


Figure R4 : Empreinte à la DNase I.

Les pistes GNX (ADN en présence de la protéine GST-NX-HIS) et C (contrôle avec BSA) correspondent à la digestion par la DNase I de la sonde 05-*XbaI-XhoI* marquée en 3' à l'extrémité *XbaI*. La piste *G track* présente le positionnement des guanines au sein de la séquence d'ADN et permet de visualiser la localisation de la séquence 05 (en gras) révélée par empreinte à la DNase I (crochet).

5. Empreinte à la DNase I

Afin d'identifier le site exact d'interaction entre la protéine GST-NX-HIS sur la sonde *XbaI-XhoI-05*, nous avons réalisé une réaction d'empreinte à la DNase I. Cette technique consiste à incuber une protéine avec un fragment d'ADN marqué à une extrémité puis à effectuer une digestion modérée de l'ADN par la DNase I. La portion d'ADN reconnue par la protéine ne sera pas digérée et sera révélée par comparaison à une piste sans la protéine d'intérêt. Dans le cas présent, 20 μ M de protéine GST-NX-HIS sont incubés avec la sonde 05 marquée en 3' à l'extrémité *XbaI*, permettant de révéler l'interaction avec le brin contenant la séquence cible du côté GTT. La digestion à la DNase I révèle une empreinte qui chevauche la séquence 05 issue du *CASTing* (Figure R4), dont la localisation est déterminée par rapport au *G-track* (voir section Matériel et Méthodes). Aucune autre empreinte ne semble détectée en 5' ou 3' du site de fixation 05, suggérant que la stabilisation de l'interaction, par des séquences de part et d'autre du site 05 comme observée précédemment, fait intervenir des interactions de très faible affinité. Il faut noter que l'utilisation du fragment d'ADN contenant cette même séquence 05 mais marquée à l'autre extrémité n'a pas permis de révéler d'empreinte dans les mêmes conditions.

6. c-Abl interagit par le petit sillon de l'ADN

La reconnaissance d'une séquence d'ADN par une protéine peut se faire au niveau du grand ou du petit sillon de l'ADN. Afin de déterminer par quel sillon de l'ADN le domaine de liaison à l'ADN de c-Abl interagit, nous avons incubé la protéine GST-NX-HIS avec la sonde *XbaI-XhoI-05* en présence ou non de nétopisine, un antibiotique s'intercalant par le petit sillon dans l'ADN de manière séquence non-spécifique (Figure R5A). Le complexe protéine-sonde est déplacé par de faibles concentrations de nétopisine (1 μ M, piste 3), suggérant que l'interaction de la protéine GST-NX-HIS avec sa séquence cible se fait par l'intermédiaire du petit sillon.

Un autre type de compétition est utilisé pour corréler ces résultats. Il consiste à incuber le complexe protéine-sonde *XbaI-XhoI-05* avec des quantités croissantes d'oligonucléotides dont les bases A/T du site de fixation à l'ADN sont changées en bases I/C ou G/C. Nous

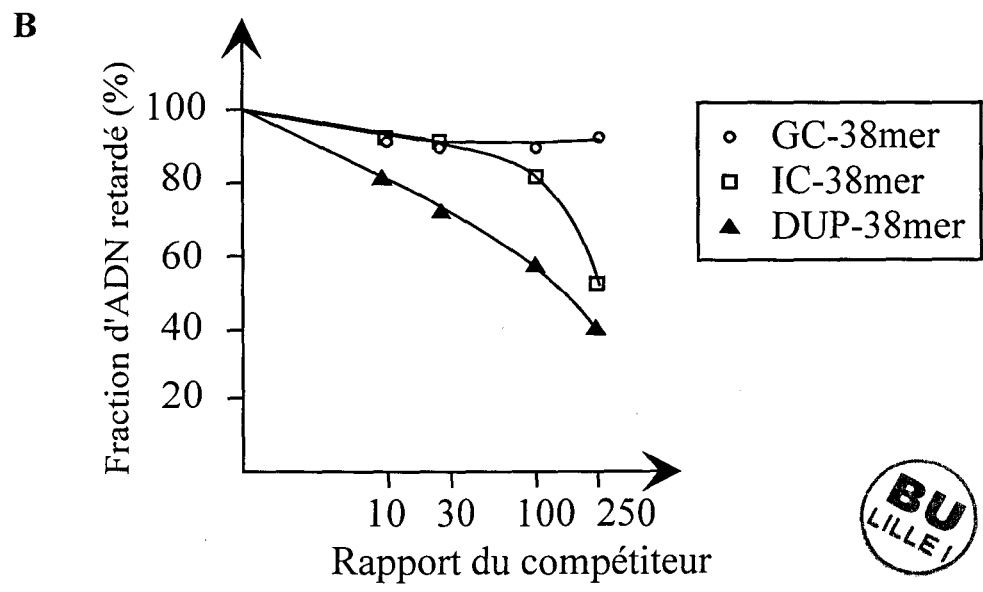
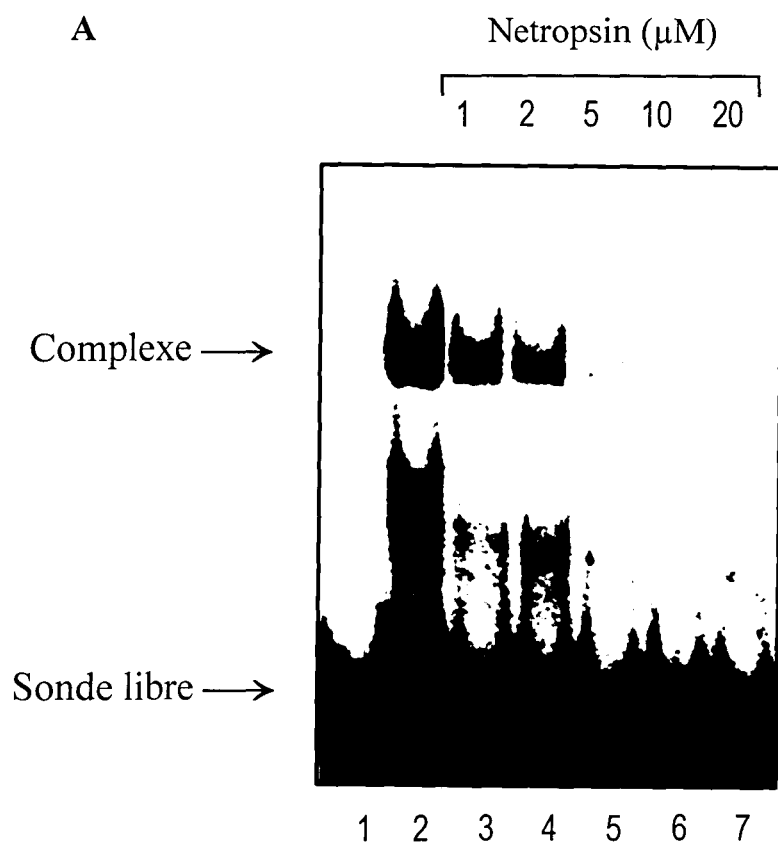


Figure R5 : Interaction par le petit sillon.

A : Compétition à la nétropsine. La sonde 05 *XbaI-XhoI* (pistes 1 à 7) est incubée avec 1 μM de protéine GST-NX-HIS (pistes 2 à 7) et des concentrations croissantes de nétropsine (pistes 3 à 7) avant migration en gel.

B : Graphe représentant la compétition de la fixation de la sonde 05 *XbaI-XhoI* à la protéine GST-NX-HIS (1 μM) par des quantités croissantes de sondes DUP-38mer, IC-38mer ou GC-38mer.

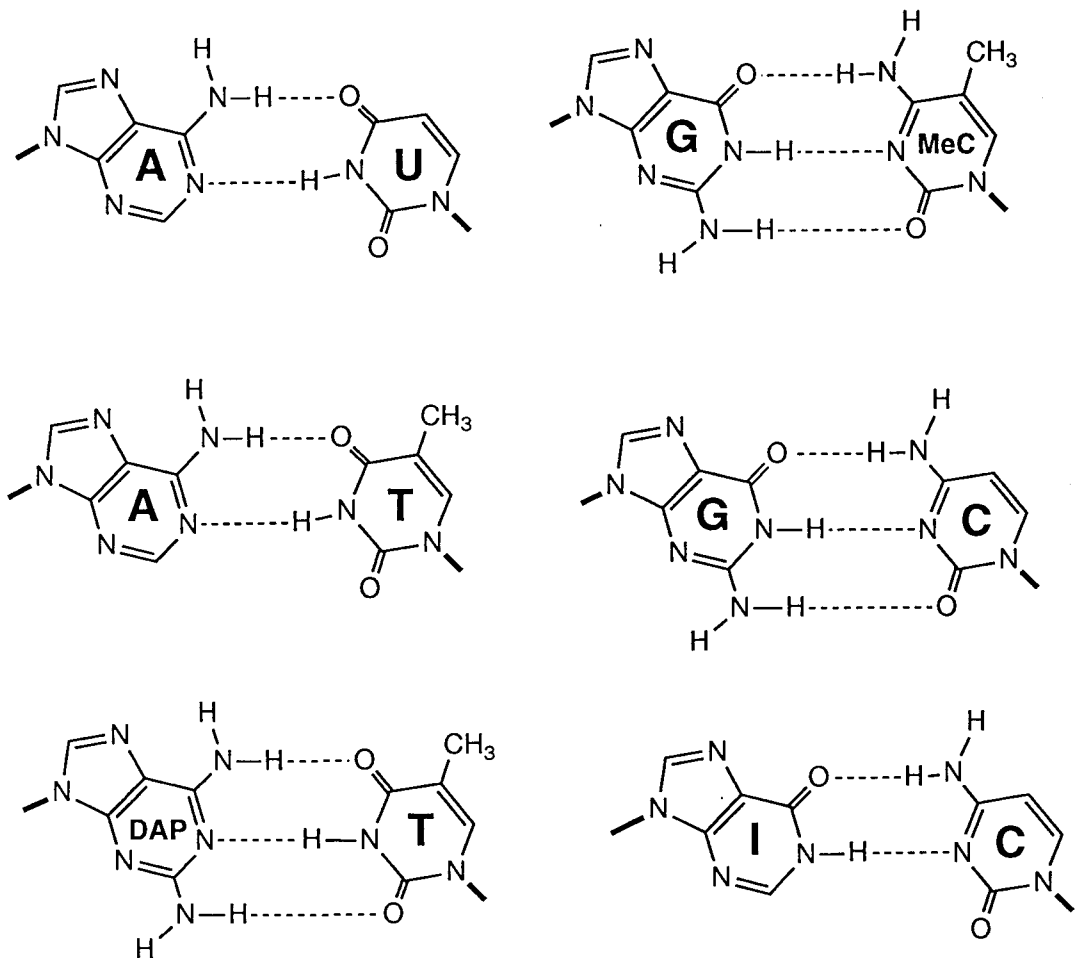


Figure R6 : Structure des différentes bases nucléotidiques utilisées.

Les bases normales A, T, G et C sont représentées au milieu de la page. Les liaisons hydrogène permettant les liaisons sont représentées en tiret. La partie de la molécule déterminant le grand sillon de l'ADN se trouve sur le dessus des liaisons hydrogène ainsi représentée alors que le petit sillon se situe au-dessous des liaisons hydrogène.

avons utilisé une sonde duplex de 38 pb, contenant le site consensus de liaison à l'ADN en son centre, ainsi que les oligonucléotides mutants dérivés. Comme présenté sur la figure R6, les bases I/C montrent un même encombrement stérique que les bases A/T au niveau du petit sillon. Réciproquement, les bases G/C ont un encombrement stérique plus important dans le petit sillon que les bases A/T, dû à la présence d'un groupement amine supplémentaire, mais ont un grand sillon homologue à celui des bases A/T. Une compétition avec l'oligonucléotide modifié par des bases G/C apporterait la preuve d'une interaction par le grand sillon, sans rôle du petit sillon, alors qu'une compétition avec l'oligonucléotide modifié par des bases I/C mais pas par celui modifié par des bases G/C suggérerait une interaction de la protéine dans le petit sillon de l'ADN. Cette technique a été utilisée par d'autres auteurs pour montrer l'interaction des protéines SRY, LEF-1 et TBP via le petit sillon de l'ADN (Starr and Hawley, 1991 ; van de Wetering and Clevers, 1995 ; Wong and Bateman, 1994 ; Juo *et al.*, 1996).

Le graphe de la figure R5B montre qu'il y a, comme attendu, une compétition avec la sonde contenant les bases normales A/T. Il faut noter que cette compétition a lieu à partir de 10 fois plus de compétiteur froid contenant le site consensus. Ceci s'explique par le fait que l'oligonucléotide compétiteur est de taille relativement petite (38 pb) par rapport à la sonde *XbaI-XhoI-05* (73 pb) et que la taille influence l'affinité de l'interaction comme nous l'avons montré précédemment. Un déplacement du complexe est également observé par compétition avec la sonde contenant les bases I/C mais pas avec la sonde contenant les bases G/C. La modification A/T en I/C ne modifie que très peu l'interaction de la protéine GST-NX-HIS avec la sonde *XbaI-XhoI-05*, suggérant ici encore que l'interaction se fait via le petit sillon.

B. c-Abl reconnaît des structures tordues de l'ADN

Le site consensus de liaison à l'ADN que nous avons déterminé pour la protéine c-Abl humaine ($A^A/cAACAA^A/c$) est très homologue à celui de certains membres de la famille des protéines HMG telles que SRY ou SOX dont le site consensus de reconnaissance est $A^A_T AACAA^A_T$ (Harley *et al.*, 1994) ou encore telle que la protéine LEF-1 dont le site de liaison à l'ADN correspond à la séquence AACAAAG (Grosschedl *et al.*, 1994). Miao et Wang (1996) ont montré que le domaine de liaison à l'ADN de la protéine c-Abl murine interagissait avec des séquences riches en A/T de la même manière que le domaine de liaison à l'ADN des protéines HMG, alors que le site de liaison à l'ADN de la protéine c-Abl

humaine montre, dans nos expériences, une nette préférence pour des séquences d'ADN similaires à celles reconnues par les membres de la famille des protéines *HMG-like*. Ils proposent également que le domaine de liaison à l'ADN de la protéine c-Abl murine serait constitué de trois domaines d'interaction à l'ADN du type de ceux des protéines HMG. Les facteurs de transcription de la sous-famille des protéines *HMG-like* ont la capacité d'interagir à la fois avec des séquences spécifiques d'ADN et avec des structures tordues de l'ADN, indépendamment des bases nucléotidiques qui constituent ces structures. Les protéines de type *HMG-like* ont également la capacité de tordre l'ADN au niveau de leur site de fixation, c'est pourquoi elles sont appelées *bending proteins* (voir Généralités). Dans ce cas, les acides aminés responsables de l'interaction à l'ADN se fixent dans le petit sillon de l'ADN. La trop faible accessibilité fait que la protéine agrandit ce petit sillon, courbant ainsi l'ADN d'un angle variable selon la taille du domaine d'interaction à l'ADN de chaque protéine de la famille. Nous avons donc voulu déterminer si le domaine de liaison à l'ADN de la protéine c-Abl humaine possédait toutes les caractéristiques d'interaction à l'ADN communes aux protéines *HMG-like*.

1. Structure de type *four-way junction DNA*

Afin de vérifier tout d'abord si la protéine c-Abl humaine possède également la capacité d'interagir avec des structures tordues de l'ADN, des expériences de retard en gel ont été réalisées en utilisant des sondes de type *four-way junctions* (Figure R7) (von Kitzing *et al.*, 1990 ; Lilley and Clegg, 1993). Ces structures particulières de l'ADN sont constituées de quatre brins et forment une disposition de type cruciforme ouverte. Ces structures, encore appelées *Holliday junctions*, sont similaires à celles rencontrées dans la cellule au cours des événements de réplication de l'ADN ou de recombinaison (Kallenbach *et al.*, 1983 ; Lilley, 1994). Deux sondes de ce type ont été construites, l'une correspond à la structure préalablement décrite par Ferrari *et al.* (1992) mais prolongée en 5' et 3' de manière à obtenir 4 oligonucléotides de 38 bases pouvant s'apparier ensemble (appelée 4Wa), l'autre sonde de type *four-way junction* dérive de la première, puisqu'elle contient les mêmes bases aux extrémités des oligonucléotides qui constituent cette sonde, mais diffère par la présence du site consensus de fixation à l'ADN de c-Abl dans la zone de mésappariement et est appelée 4Wb (voir figure M2 du Matériel et Méthodes). Les deux sondes *four-way* sont marquées en

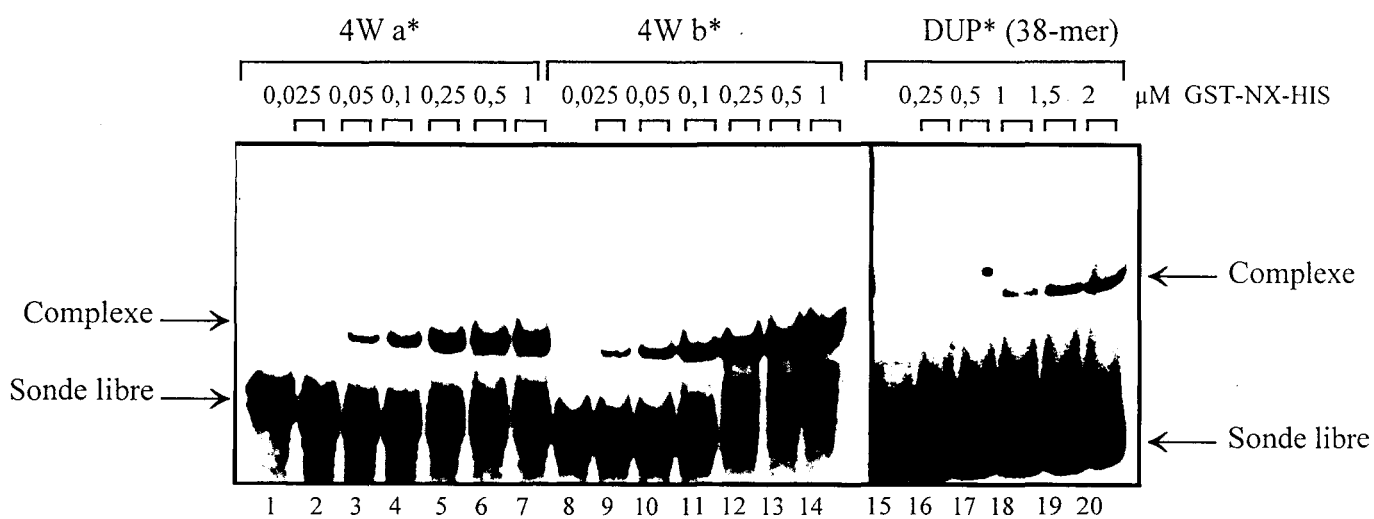


Figure R7 : Retard en gel avec les sondes à quatre brins.

Des concentrations croissantes de protéine GST-NX-HIS sont incubées avec les sondes 4Wa (pistes 1 à 7), 4Wb (pistes 8 à 14) ou DUP-38 mer (pistes 15 à 20) avant d'être séparées en gel.

5' de l'oligonucléotide commun avant l'hybridation afin d'obtenir la même radioactivité spécifique et de pouvoir comparer les affinités relatives du domaine de liaison à l'ADN de c-Abl pour ces structures. Le niveau d'interaction de la protéine GST-NX-HIS avec la sonde *four-way* contenant le site consensus de fixation a été comparé à celui pour l'oligonucléotide double brins linéaire de 38 pb (appelé DUP pour duplex et utilisé précédemment comme compétiteur dans la figure R5B). Cette sonde DUP est issue de l'hybridation de l'oligonucléotide 6 (contenant le site consensus et utilisé pour obtenir la sonde de quatre brins) avec un autre oligonucléotide (oligonucléotide 8 de la figure M2) de séquence complémentaire. Le marquage du brin commun avant hybridation a également été effectué afin de comparer les niveaux d'interaction. Le résultat des expériences de retard en gel est présenté sur la figure R7. La protéine GST-NX-HIS forme un complexe avec chacune des sondes 4W (pistes 1 à 7 et 8 à 14). L'affinité relative de la protéine GST-NX-HIS pour la sonde 4Wb contenant le site consensus n'est que d'environ 2 fois supérieure à celle pour la sonde 4Wa ne contenant pas ce site d'interaction spécifique, alors qu'elle est 20 à 40 fois plus forte que celle pour l'ADN linéaire (pistes 15 à 20). Le domaine de liaison à l'ADN de c-Abl interagit donc avec des structures de type *Holliday junctions*, ceci apparemment indépendamment des séquences qui constituent ces structures. La faible différence de fixation entre les sondes *four-way* peut s'expliquer par le fait que la sonde 4Wb contient plus de liaisons A-T au niveau de la jonction que la sonde 4Wa. Cette richesse en liaison A-T rend la jonction moins stable et peut autoriser une meilleure flexibilité des quatre bras de la structure, de manière à permettre une meilleure accessibilité des acides aminés du domaine de liaison à l'ADN de c-Abl au niveau de la structure cruciforme.

2. Interaction avec des structures contenant une boucle

Des ADN déformés par la présence d'une boucle non appariée ont également été utilisés en retard en gel avec la protéine GST-NX-HIS. Ces sondes correspondent à l'hybridation d'un oligonucléotide de 53 pb contenant une séquence centrale de 15 résidus cytosine avec un oligonucléotide de 56 bases complémentaires du précédant sauf pour la succession de cytosine remplacée par 18 pb contenant le site consensus de liaison à l'ADN de c-Abl et sont appelées sondes *bubble* en référence à la large bulle qu'elles présentent dans leur structure. Par comparaison à une sonde d'ADN linéaire de 56 pb correspondant à

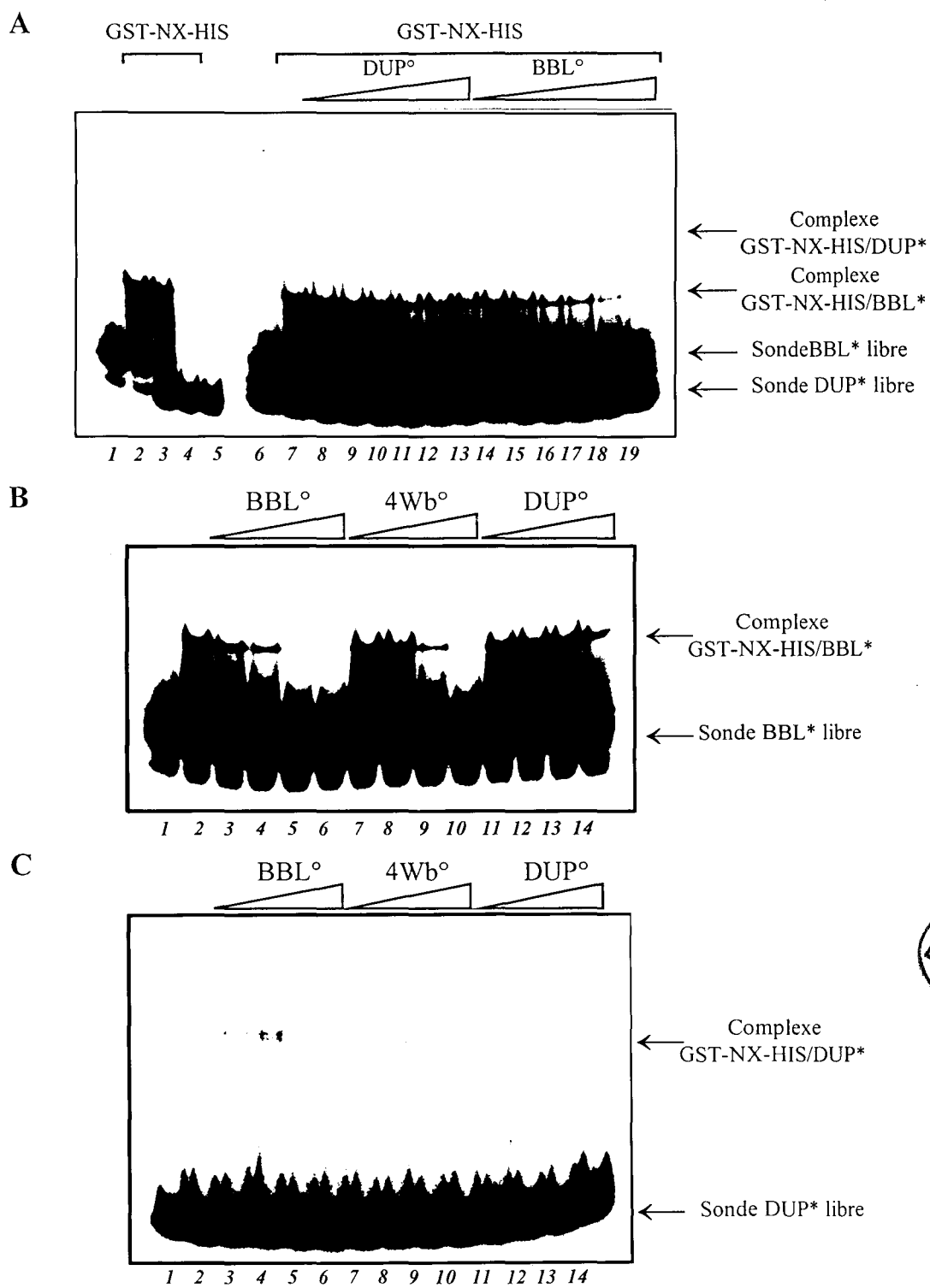


Figure R8 : Compétitions entre les sondes 4Wb, BBL et DUP-56mer.

Légende et graphes correspondant page suivante.

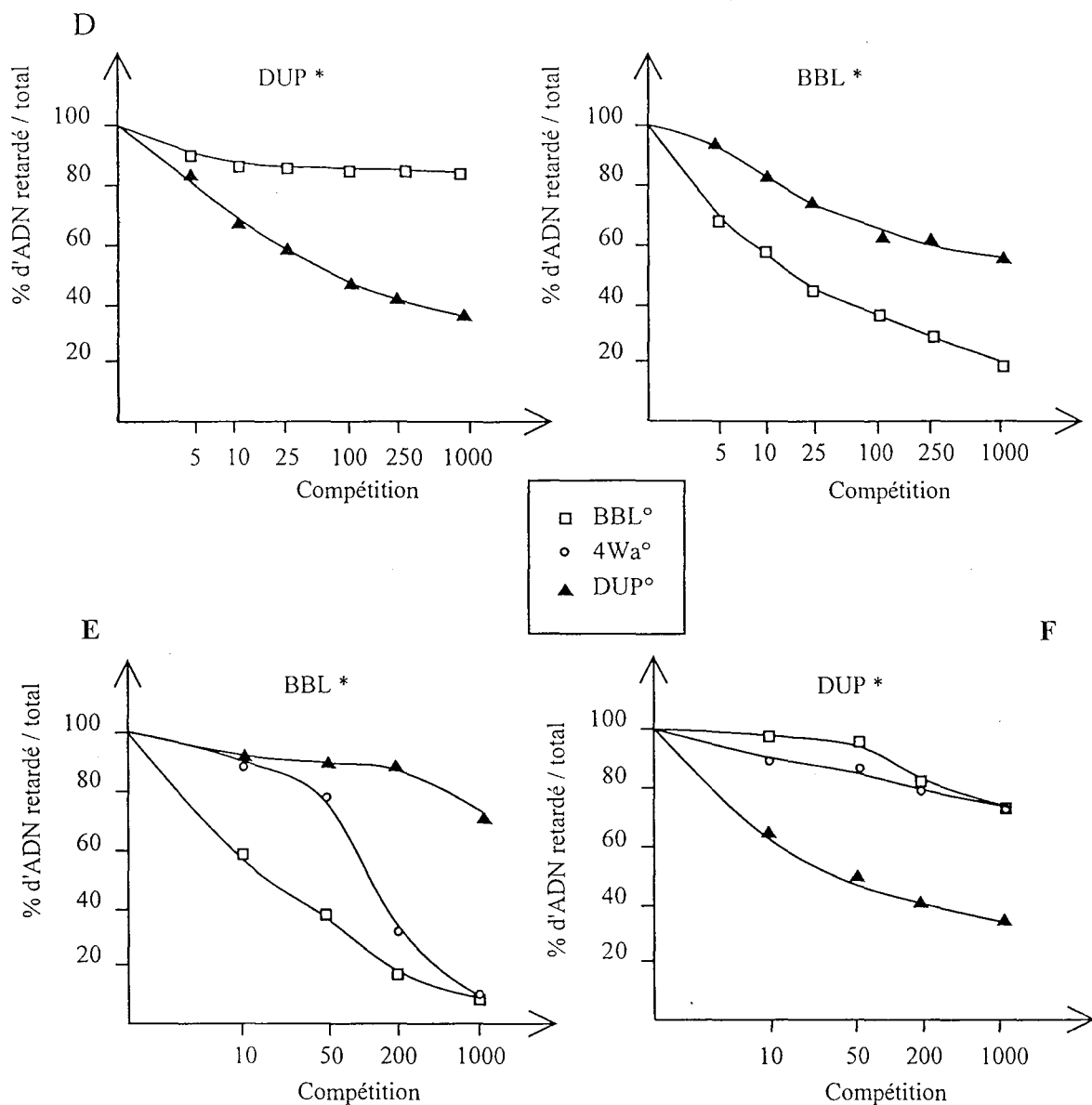


Figure R8 : Compétitions entre les sondes 4Wb, BBL et DUP-56mer.

A : 1 μ M de protéine GST-NX-HIS (pistes 2 à 4) sont incubées avec la sonde BBL seule (piste 3), DUP-56mer seule (piste 4) ou les deux sondes en même temps (pistes 3 et 7 à 19). Des compétitions sont effectuées avec des concentrations croissantes (pistes 8 et 14 : 5 fois ; pistes 9 et 15 : 10 fois ; pistes 10 et 16 : 25 fois ; pistes 11 et 17 : 100 fois ; pistes 12 et 18 : 250 fois et pistes 13 et 19 : 1000 fois) d'ADN non marquée DUP-56mer (pistes 8 à 13) ou BBL (pistes 14 à 19).

B et **C** : Les sondes BBL (**B**) ou DUP-56mer (**C**) sont incubées avec 1 μ M de protéine GST-NX-HIS (pistes 2 à 14) en présence de quantités croissantes (pistes 3, 7 et 11 : 10 fois ; pistes 4, 8 et 12 : 50 fois ; pistes 5, 9 et 13 : 200 fois ; pistes 6, 10 et 14 : 1000 fois) d'ADN BBL (pistes 3 à 6), 4Wb (pistes 7 à 10) ou DUP-56mer non marqués (pistes 11 à 14).

Les graphes **D**, **E** et **F** représentent les mesures des compétitions réalisées respectivement dans les gels **A**, **B** et **C**.

l'appariement de l'oligonucléotide de 56 bases contenant le site consensus pour c-Abl avec son complémentaire, les complexes formés entre la protéine GST-NX-HIS et la sonde *bubble* apparaissent pour une concentration en protéine plus faible que pour les complexes formés avec la sonde linéaire (Figure R8A). Ce résultat montre une nouvelle fois que la protéine GST-NX-HIS fixe beaucoup mieux des structures tordues de l'ADN que des séquences linéaires contenant son site consensus d'interaction. La protéine GST-NX-HIS montre la même affinité pour une sonde *bubble* ne contenant pas le site de fixation de c-Abl.

Afin de vérifier que l'interaction de la protéine avec les sondes *bubble* fait bien intervenir une fixation à des structures particulières et non pas une fixation à des séquences d'ADN simple brin, les oligonucléotides impliqués dans la formation de la sonde *bubble* contenant la séquence consensus et de la sonde linéaire de 56 pb ont été marqués et utilisés en retard en gel. La figure R9 montre que les oligonucléotides utilisés pour former la sonde *bubble* et contenant le consensus avec les bases AAC (pistes 1 à 4) ou contenant les 15 résidus cytosyle (non montré) ne sont pas reconnus par la protéine GST-NX-HIS, prouvant que l'interaction avec la sonde *bubble* fait intervenir les régions tordues à la limite du mésappariement de la région centrale et non pas la reconnaissance de séquences d'ADN simple brin. Il faut noter que l'oligonucléotide utilisé pour l'obtention de l'ADN double brin linéaire de 56 pb peut former un complexe avec la protéine GST-NX-HIS. Ce complexe est moins stable que celui formé avec les ADN linéaires et beaucoup moins stable encore que celui formé avec les ADN ayant des structures tordues. Cette fixation semble être due à des structures secondaires particulières de cet oligonucléotide simple brin qui forme des bandes plus retardées dans les pistes 5 à 8. L'hypothèse d'une fixation du domaine de liaison à l'ADN de c-Abl à des séquences simple brin contenant le site consensus du côté GTT ne peut être totalement écartée puisque, par expérience d'empreinte à la DNase I, un *footprint* avait pu être révélé sur le fragment double brins marqué du côté GTT mais pas sur celui marqué du côté AAC de la séquence 05 issue du *CASTing*.

Dans les expériences de compétition présentées sur la figure R8, le gel de la partie A montre que le niveau de migration du complexe protéine-ADN dépend de la sonde sur laquelle il est fixé. La migration du complexe protéine-*bubble* est moins affectée par la réticulation du gel que celle du complexe protéine-duplex linéaire. L'incubation de la protéine GST-NX-HIS avec à la fois les sondes BBL et DUP ne semble pas modifier l'affinité de l'un ou l'autre des complexes.

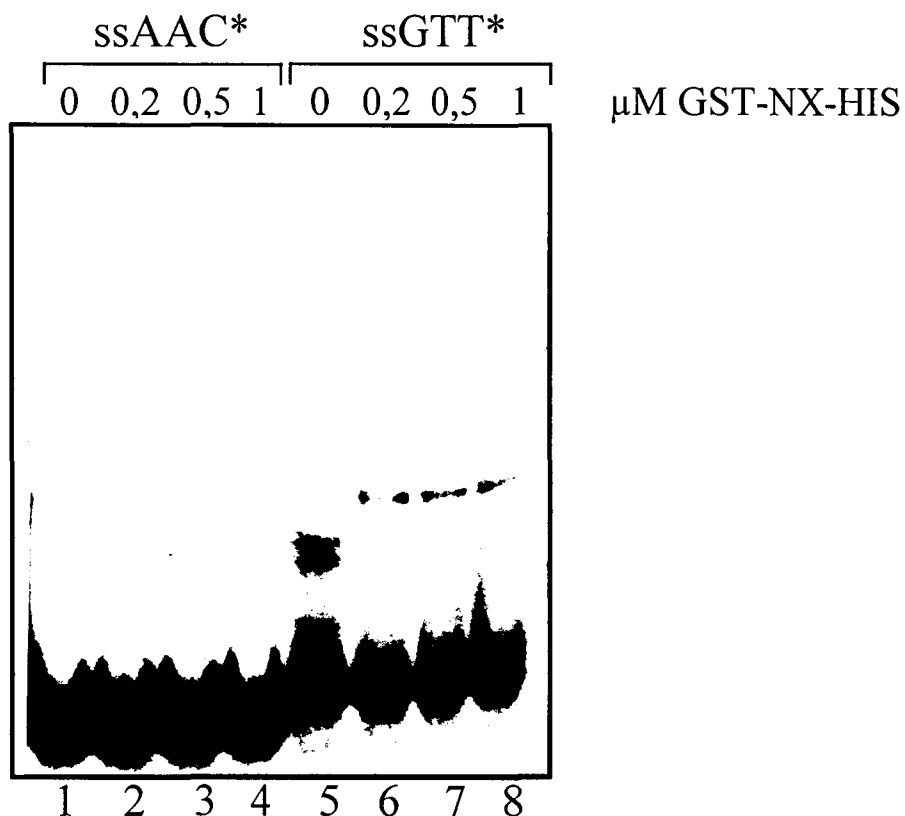


Figure R9 : Retard en gel avec sonde ADN simple brin.

Les oligonucléotides marqués 9 (ssAAC, pistes 1 à 4) et 10 (ssTTG, pistes 5 à 8) de 56 bases sont incubés avec des concentrations croissantes de protéine GST-NX-HIS (pistes 2 à 4 et 6 à 8). La bande retardée dans la piste 5 correspond à des structures secondaires de l'ADN simple brin alors que les bandes retardées supplémentaires dans les pistes 6 à 8 correspondent aux complexes GST-NX-HIS/ADN simple brin, liés probablement à la reconnaissance de la structure secondaire de l'oligonucléotide.

Dans les expériences de compétition, le complexe formé entre la protéine GST-NX-HIS et la sonde linéaire contenant le site consensus de fixation (complexe le plus retardé en gel) peut être déplacé par addition de quantité croissante de cette même sonde froide (Figure R8A, pistes 8 à 13) alors qu'une grande quantité de sonde *bubble* ne suffit pas à le déplacer (Figure R8A, pistes 14 à 19). Réciproquement, le complexe protéine-sonde *bubble* est déplacé par la sonde *bubble* froide (Figure R8A, pistes 14 à 19 et graphe figure R8D) mais n'est que très faiblement déplacé par de grande quantité de sonde linéaire (1000 X DUP°, figure R8A, pistes 8 à 13 et graphe figure R8D). De plus, l'oligonucléotide 4Wb est capable de déplacer le complexe protéine-*bubble** (Figure R8B, pistes 7 à 10 et figure R8E) de la même manière que l'oligonucléotide *bubble* non marqué déplace ce complexe (Figure R8B, pistes 3 à 6 et figure R8E) mais, tout comme l'oligonucléotide *bubble* (Figure R8C, pistes 3 à 6 et figure R8F), l'oligonucléotide 4Wb ne peut pas déplacer le complexe protéine-sonde linéaire (Figure R8C, pistes 7 à 10 et figure R8F).

Ce résultat met en évidence la présence de deux domaines distincts d'interaction avec l'ADN : l'un interagissant préférentiellement de manière structure-spécifique avec des séquences tordues de l'ADN (structure de type *Holliday* ou en boucle) alors que le second intervient dans la reconnaissance séquence-spécifique de l'ADN.

3. Etude sur d'autres types de structures tordues de l'ADN

D'autres types de séquence tordue de l'ADN ont été testées, telle qu'une sonde platinée (obtenue auprès de Dominique Payet). La fixation covalente d'un atome de platine au niveau de dimère G-G permet de courber l'ADN en éloignant les deux résidus guanyle impliqués dans la liaison au platine. Nous n'avons pas obtenu de compétition des sondes DUP ou BBL, suggérant que le domaine de liaison à l'ADN de c-Abl ne reconnaît pas ce type de structure tordue, contrairement à la protéine HMG1 (Pil and Lippard, 1992).

Un oligonucléotide en forme de V a également été utilisé dans des expériences de compétition. Cette structure est obtenue par hybridation de l'oligonucléotide 6 de 38 bases (utilisé précédemment pour obtenir la sonde d'ADN duplex linéaire contenant la large séquence consensus de c-Abl) avec un oligonucléotide de 40 bases complémentaire du premier mais contenant deux cytosines supplémentaires au milieu du site consensus, de manière à tordre la séquence en son milieu (voir figure M2 du Matériel et Méthodes). Cet

oligonucléotide déplace le complexe protéine-sonde linéaire de 56 pb mais pas celui formé avec la sonde *bubble*. Ceci suppose que l'interaction se fait au niveau des séquences spécifiques de liaison comprises dans le large site consensus de fixation et non pas sur la structure centrale tordue (résultat non montré).

4. Etude par dénaturation thermique.

Nous avons utilisé la technique de fusion de l'ADN pour l'étude de la fixation du domaine de liaison à l'ADN de c-Abl avec différents oligonucléotides. Pour cela, différents oligonucléotides ont été incubés avec ou sans la protéine GST-NX-HIS et soumis à une augmentation progressive de la température afin de déterminer si le point de fusion de l'ADN T_m , déterminé par la mesure en continu de la DO_{260} du mélange, est modifié en présence de la protéine.

Le tableau II montre le résultat des tests de fusion de l'ADN effectués.

Tableau II : Variation du point de fusion (ΔT_m) des oligonucléotides par la protéine GST-NX-HIS

	T_m		ΔT_m
	ADN	complexe ADN-protéine	
poly(dA-dT).(dA-dT)	41,0	42,0	1,0
poly(dI-dC).(dI-dC)	36,0	37,0	1,0
38-mer SK (contrôle)	57,0	59,0	2,0
38-mer AAC (duplex)	55,2	60,5	5,3
56-mer AAC (duplex)	57,4	69,0	11,6
4Wa	39,8	51,8	12,0
4Wb (AAC)	41,0	55,5	14,5
<i>bubble</i> contrôle	45,7	56,6	10,9
<i>bubble</i> (AAC)	45,0	61,1	16,1

Les valeurs de T_m et ΔT_m sont indiquées en °C et sont obtenues d'après la dérivée première des courbes d'absorption mesurée à 260 nm.

Ainsi, le domaine de liaison à l'ADN de c-Abl semble empêcher la dénaturation de l'ADN avec lequel il interagit. La présence de sérum albumine bovine utilisée comme contrôle ne modifie pas le point de fusion de l'ADN, montrant que sa dénaturation sous l'effet de l'augmentation de la température n'influence pas la mesure de fusion de l'ADN à 260 nm. Les plus fortes différences de température de fusion sont observées pour l'incubation de la protéine avec les ADN de type *bubble* et *four-way*, qu'ils contiennent ou non la séquence cible de reconnaissance de c-Abl déterminée par *CASTing*. L'absence de nécessité de la séquence cible pour la reconnaissance par la protéine GST-NX-HIS est donc en accord avec les expériences de retard en gel. La présence de la séquence consensus de fixation de c-Abl au sein des oligonucléotides linéaires est par contre indispensable à la stabilisation de l'ADN par la protéine, puisque la différence de T_m obtenue avec l'oligonucléotide 38-mer-AAC est de 5,3°C alors que celle obtenue avec l'oligonucléotide 38-mer-SK utilisé comme contrôle n'est que de 2°C. La spécificité de l'interaction ADN-protéine ne peut pas ici être établie par utilisation d'un compétiteur nucléotidique non-spécifique puisque celui-ci interférerait avec la mesure du T_m spécifique de l'oligonucléotide d'intérêt. La mesure de la différence de T_m a également été effectuée avec du poly(dI-dC).(dI-dC) ou du poly(dA-dT).(dA-dT) et montre une très faible modification de l'ordre de 1°C du T_m de ces oligonucléotides. Ce résultat montre la faible capacité d'interaction du domaine de liaison à l'ADN de c-Abl avec les séquences riches en AT du poly(dA-dT).(dA-dT) et suggère encore que la protéine c-Abl reconnaît avec une bien plus grande affinité les séquences contenant la séquence consensus que nous avons déterminée par *CASTing* plutôt que des séquences préférentiellement riches en AT comme décrit par Miao et Wang (1996).

5. Analyse de la fixation de protéines sur les oligonucléotides linéaires et tordus fixés sur des billes.

Nous ne disposions pas d'anticorps monoclonal anti-GST ou anti-poly-histidine utilisable en *supershift* afin de vérifier que le domaine de liaison à l'ADN de c-Abl reconnaissait bien, par retard en gel, à la fois des oligonucléotides linéaires et tordus et qu'il ne s'agissait pas de protéines différentes co-purifiées sur colonnes de nickel avec la protéine GST-NX-HIS. Pour contourner ce problème et répondre à la question, nous avons utilisé des colonnes d'affinité sur lesquelles nous avons fixé, de manière covalente, les oligonucléotides

bubble ou duplex linéaire de 56 pb. Celles-ci ont été incubées avec différentes protéines radioactives produites en lysat de réticulocytes et la capacité de rétention de ces protéines aux colonnes contenant les séquences 56-mer duplex ou *bubble* a été étudiée face à des lavages par des tampons de concentrations salines croissantes de la même manière que pour les billes de DNA-cellulose. Les billes contrôles sont obtenues en préparant les colonnes de la même manière mais sans ajouter d'oligonucléotide. La protéine luciférase a été utilisée comme contrôle négatif de la fixation aux oligonucléotides et est effectivement éluée à 93 % par le tampon d'éluion à 40 mM NaCl et à 99,5 % après éluion par le tampon à 100 mM NaCl. Les protéines X1A1 et BBdelApa sont quant à elles retenues de manière significative à la fois par les billes fixant les oligonucléotides linéaires et tordus alors qu'elles ne sont pas retenues par les billes contrôle. En effet, environ 35 % des protéines X1A1 totales se retrouvent dans la fraction d'éluion à 100 mM et environ 20 % des protéines BBdelApa sont retrouvées dans la fraction d'éluion à 100 mM alors que 10 à 15 % d'entre elles subsistent encore dans la fraction à 300 mM.

Ce résultat montre que le domaine de liaison à l'ADN, qu'il soit exprimé en système bactérien sous forme de protéine GST-NX-HIS ou en lysat de réticulocytes, reconnaît des structures tordues de l'ADN ainsi que des oligonucléotides contenant la séquence consensus déterminée par *CASTing*.

6. Mise en évidence de l'interaction directe par *South-Western blotting*.

Afin de vérifier directement que les deux complexes protéine-ADN, migrant de manière distincte en gel, contiennent bien la protéine GST-NX-HIS et que cette interaction est directe, nous avons réalisé des expériences de *South-Western blotting*. Pour cela, la protéine GST-NX-HIS a été séparée sur gel dénaturant pour être soit colorée directement au bleu de Coomassie afin de visualiser l'ensemble des protéines (Figure R10A), soit transférée sur membrane de nitrocellulose et révélée par un anticorps polyclonal anti-GST obtenu chez le lapin pour vérifier l'identité de la protéine GST-NX-HIS (Figure R10B), soit encore transférée sur membrane et incubée avec la sonde *XbaI-XhoI* contenant la séquence 05 issue du *CASTing* (résultat non montré) ou la sonde 4Wb (Figure R10C). L'identité de la protéine GST-NX-HIS est révélée par l'anticorps anti-GST (Figure R10B). La protéine GST-NX-HIS est la seule qui

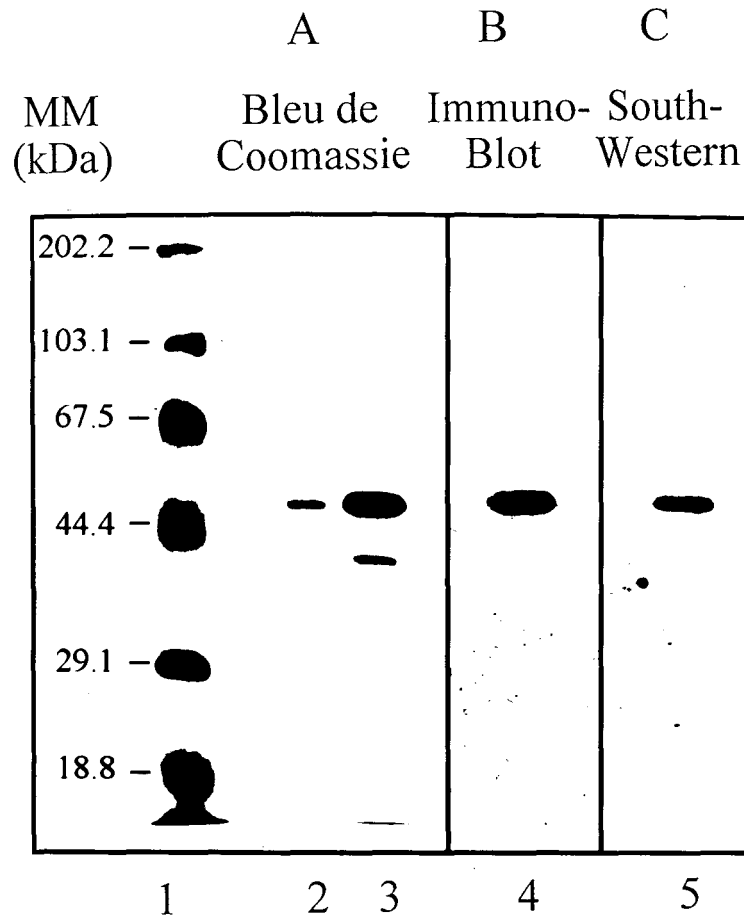


Figure R10 : Etude de l'interaction par South-Western blot.

Dans la piste 1 sont déposés les marqueurs de taille protéiques, la piste 2 correspond au dépôt de 5 µg de protéine GST-NX-HIS alors que 20 µM de protéine GST-NX-HIS sont déposés dans les pistes 3, 4 et 5. Les protéines des pistes 1 à 3 sont colorées au bleu de Coomassie permettant de visualiser les protéines et de vérifier la masse moléculaire apparente de la protéine GST-NX-HIS. Les protéines des pistes 4 et 5 sont transférées sur une membrane de nitrocellulose avant d'être incubées avec un sérum polyclonal anti-GST (piste 4) ou avec la sonde 4Wb (piste 5). L'incubation avec la sonde 05-*Xba*I-*Xho*I permet la visualisation de l'interaction au même niveau de migration que la protéine GST-NX-HIS comme avec la sonde 4Wb de la piste 5.

retienne la sonde 4Wb de même que la sonde *XbaI-XhoI*-05 mais avec une moindre affinité. Le *South-Western blot* prouve donc que l'interaction de la protéine GST-NX-HIS avec chacune des deux sondes est directe et qu'aucune autre protéine contaminante n'interagit directement avec les sondes testées. La différence de migration en gel des deux complexes n'est donc pas due à la présence de protéines de masse moléculaire apparente différente mais à une influence plus faible sur la migration d'une protéine complexée à un ADN tordu plutôt qu'à un ADN linéaire.

C. c-Abl ne tord pas son site de fixation séquence-spécifique

La reconnaissance de structures tordues de l'ADN ne fait pas de la protéine c-Abl une *bending-protein*. Ce type de protéine a la particularité d'interagir non seulement passivement avec des structures tordues mais également de tordre de manière active les séquences d'ADN linéaires qu'elle reconnaît.

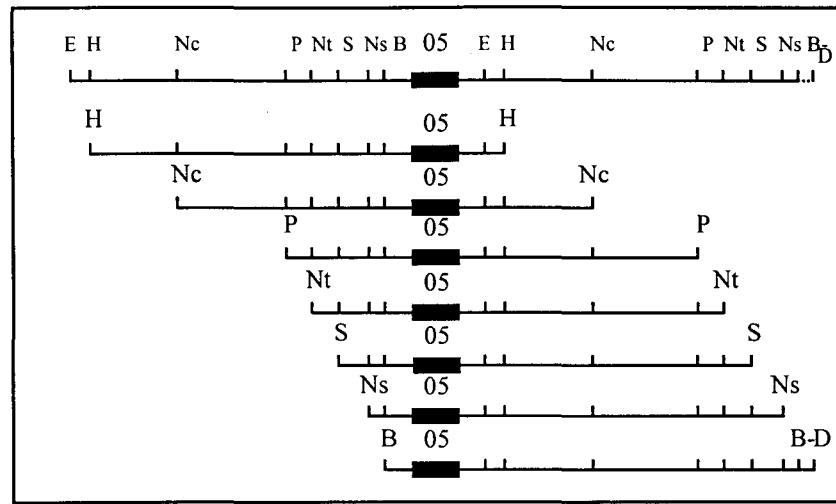
Afin de déterminer si une protéine tord l'ADN, trois types d'expérience peuvent être réalisées : le test de permutation circulaire, celui de circularisation de l'ADN et l'étude de la relaxation de l'ADN par la topoisomérase I.

1. Test de permutation circulaire

Ce test est basé sur la différence de migration en gel d'un fragment d'ADN tordu par une protéine en fonction de la position de la torsion de l'ADN, centrale ou aux extrémités (Wu and Crothers, 1984 ; Thompson and Landy, 1988). Ainsi, un fragment d'ADN tordu en son centre sera plus sensible à la réticulation du gel de polyacrylamide et donc migrera moins vite qu'un fragment de même taille tordu par la protéine en une position plus proche des extrémités. Ce test a été utilisé pour déterminer les angles de torsion des facteurs SRY et LEF1 de 85° et 120°, respectivement (Ferrari *et al.*, 1992 ; Giese *et al.*, 1992 ; Love *et al.*, 1995 ; Read *et al.*, 1995).

Afin d'obtenir une série de fragments d'ADN contenant en différentes positions une séquence cible de fixation pour le domaine de liaison à l'ADN de c-Abl, le vecteur pBEND-05 est construit comme décrit dans la partie Matériel et Méthodes. Différents fragments de même taille (141 pb) sont obtenus par digestion au niveau des sites de restriction placés en

A



B

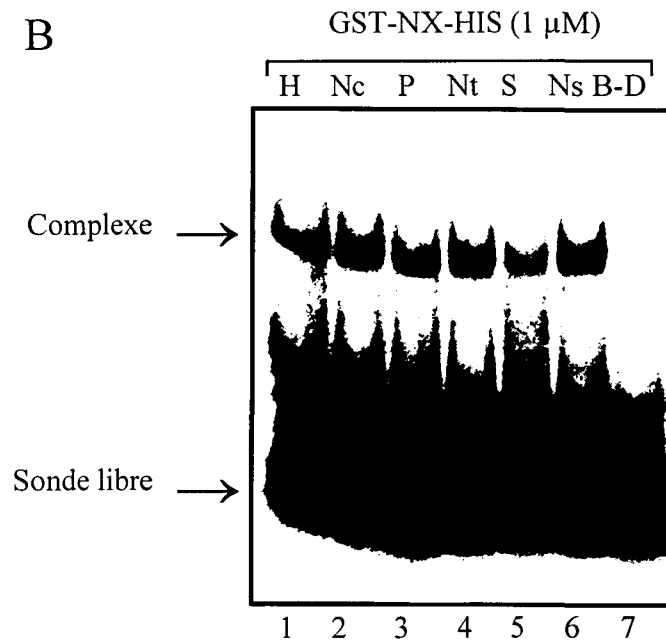


Figure R11 : Test de permutation circulaire.

La partie A représente en premier lieu le fragment d'ADN cloné dans le vecteur pBEND-05 et, en dessous, les différentes sondes marquées en 5' et incubées avec la protéine GST-NX-HIS (1 μ M) dans l'expérience de retard en gel de la partie B. Les différents sites de restriction utilisés sont *HpaI* (H, piste 1), *NcoI* (Nc, piste 2), *PstI* (P, piste 3), *NotI* (Nt, piste 4), *SphI* (S, piste 5), *NsiI* (Ns, piste 6) et *BamHI* associé à *DraII* (B-D, piste 7) et permettent d'obtenir des fragments de même taille et de même composition globale en paire de bases mais contenant 1 site de fixation 05 en diverses positions au sein du fragment d'ADN utilisé comme sonde.

tandem autour des séquences 05 (Figure R11A). Ils sont marqués puis incubés avec la protéine GST-NX-HIS (1 μ M). Les complexes sont séparés par retard en gel (Figure R11B). Quelle que soit la position de la séquence de fixation au sein des fragments testés, le complexe protéine-ADN migre au même niveau, suggérant que la protéine GST-NX-HIS ne tord pas l'ADN lorsqu'elle fixe la séquence cible 05. La bande correspondant au complexe formé avec la sonde B-D (piste 7) est moins intense que celle des complexes formés avec les autres sondes (pistes 1 à 6). Cette interaction plus faible est probablement liée au fait que l'extrémité de la séquence 05 se situe alors à seulement 6 pb de l'extrémité 3' rentrante du site *Bam*HI. Cette distance est trop faible pour permettre la stabilisation des complexes comme précédemment observée pour les sondes *Eco*RI-*Bam*HI-05 vs *Xba*I-*Xho*I-05.

2. Test de circularisation de l'ADN

Cette seconde technique permet également de déterminer si une protéine tord la séquence d'ADN qu'elle reconnaît (Shore *et al.*, 1981 ; Bailly *et al.*, 1996a). Elle est basée sur l'incapacité d'un fragment d'ADN de taille inférieure à 150 pb à former des mini-cercles, par ligation des deux extrémités du même fragment par l'ADN ligase. Toutefois, ce fragment d'ADN peut se circulariser sous l'action d'une protéine tordant l'ADN au niveau de son site de fixation présent au milieu de la séquence d'ADN.

Nous avons testé la torsion éventuelle de la protéine GST-NX-HIS en l'incubant avec un fragment d'ADN *Xho*I-*Xho*I de 121 pb contenant la séquence 05 et obtenu comme décrit dans la section Matériel et Méthodes. Après incubation en présence de l'ADN ligase du phage T4, la moitié du mélange et soumis à une digestion à l'exonucléase III qui attaque l'ADN à partir des extrémités 3' et ne peut donc pas digérer l'ADN sous forme circulaire. La piste non digérée à l'exonucléase III a révélé plusieurs bandes mais aucune d'entre elles n'a résisté à la digestion par l'exonucléase III, montrant ainsi l'absence de formation d'ADN circulaire (gel non montré). Ce résultat suggère que la protéine GST-NX-HIS ne tord pas ou pas suffisamment le fragment d'ADN de 121 pb pour permettre aux deux extrémités de se rejoindre.

Un fragment d'ADN plus long a alors été utilisé afin de déterminer s'il y avait une augmentation ou non de la formation d'ADN circulaire en présence de concentrations croissantes de protéine GST-NX-HIS. Le fragment de 192 pb utilisé correspond à la digestion

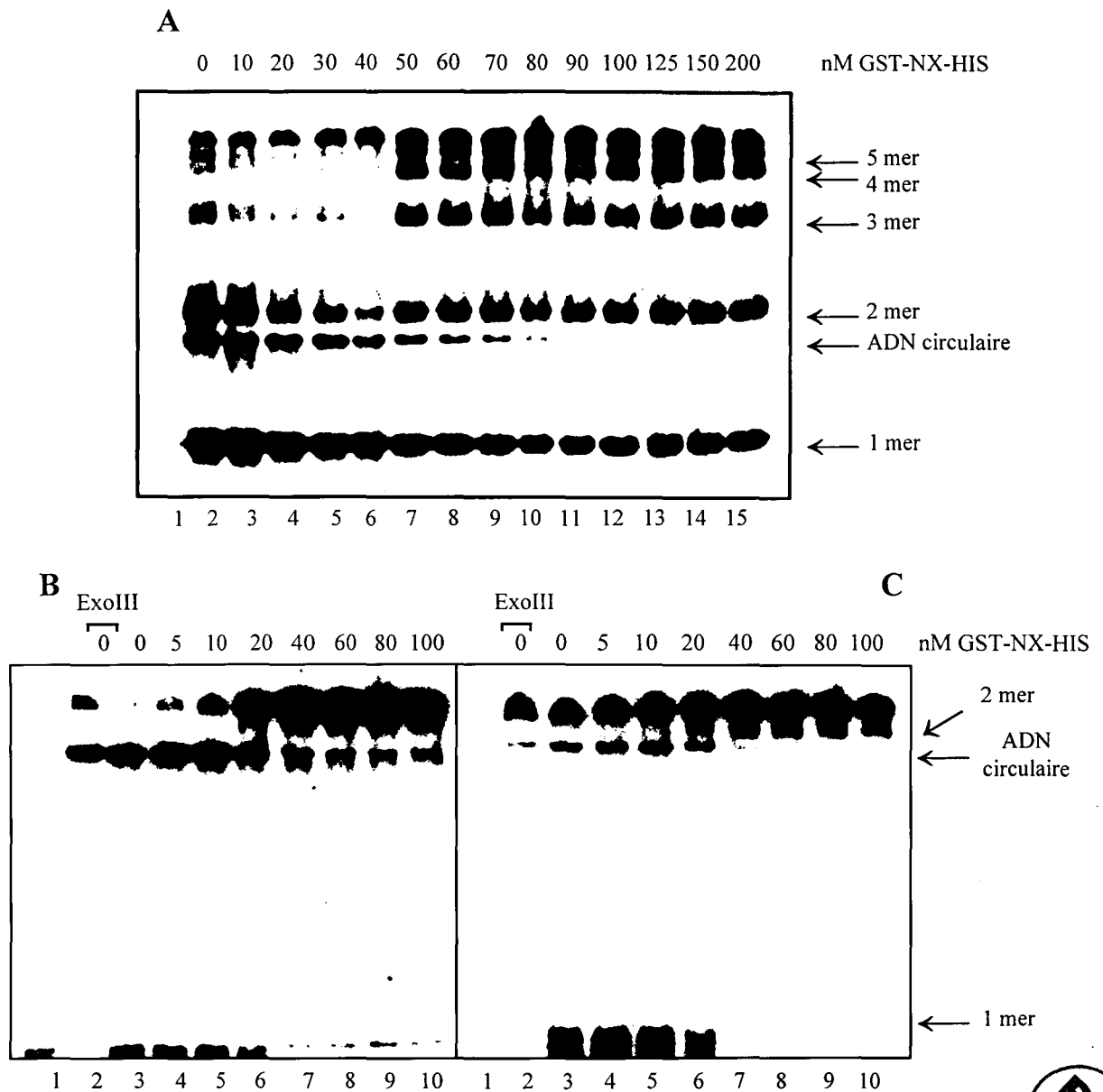


Figure R12 : Expérience de circularisation de l'ADN.

Les fragments d'ADN de 192 (partie A), 246 (partie B) et 302 pb (partie C) obtenus par digestion *Bss*HII du vecteur pBS_{II}SK-05 (partie A), pBS_{II}SK-05m (partie B) et pBEND-05 (partie C) sont incubés avec l'ADN ligase du phage T4 seul (piste 2 du gel A et pistes 2 et 3 des parties B et C) ou après incubation avec des concentrations croissantes de protéine GST-NX-HIS (pistes 3 à 15 du gel A et pistes 4 à 10 des gels B et C). La présence de l'ADN circulaire est visualisé par digestion à l'exonucléase III (ExoIII) dans les pistes 2 des parties B et C.

par l'enzyme de restriction *Bss*HII du vecteur pBS_{II}SK-05 et peut se circulariser de lui-même (Figure R12A, piste 2). La figure R12A montre qu'en présence du fragment de 192 pb et d'ADN ligase, l'augmentation de la concentration en protéine GST-NX-HIS (pistes 3 à 15) est corrélée à une diminution de la quantité d'ADN circulaire formé. Le même résultat a été obtenu avec la protéine NX-HIS. Le domaine de liaison à l'ADN de *c-Abl* semble donc ne pas tordre l'ADN mais au contraire empêcher la circularisation possible du fragment d'ADN de 192 pb. Des fragments d'ADN plus longs ont alors été testés. Les figures R12B et R12C présentent la même expérience avec des fragments d'ADN de 246 et 302 pb respectivement. Les pistes 2 des figures B et C montrent la position de l'ADN circulaire restant après digestion des ADN linéaires par l'exonucléase III. Dans les deux cas, l'augmentation de la concentration en protéine GST-NX-HIS inhibe la formation d'ADN circulaire. Afin de déterminer si cette inhibition de la formation d'ADN circulaire est due à une ou plusieurs fixations sur les fragments testés, des expériences de retard en gel ont été réalisées. La protéine GST-NX-HIS n'interagit pas avec les séquences du *polylinker* du vecteur pALTER-EX1 clonées pour permettre l'obtention des fragments d'ADN de 246 et 302 pb comme décrit dans la section Matériel et Méthodes. Par retard en gel dans des conditions d'incubation identiques à celles utilisées pour l'expérience de circularisation de l'ADN, des concentrations de 20, 80 et 200 nM de protéine GST-NX-HIS ne permettent de former qu'un seul complexe avec la sonde de 192 pb utilisée dans l'expérience de la figure R12A (résultat non montré). Ce résultat suggère qu'il n'y a pas d'autre site de fixation pour la protéine sur le fragment de 192 pb autre que la séquence 05. Toutefois, les conditions de migration des complexes dans le gel pourraient altérer les interactions de basse affinité qui existeraient dans les expériences de circularisation de l'ADN.

Cette expérience montre une nouvelle fois concrètement que la protéine GST-NX-HIS n'a pas d'activité de torsion de l'ADN, malgré le fait qu'elle interagisse avec des structures tordues de l'ADN.

3. Expérience de relaxation de l'ADN par la topoisomérase I

Dans le but de visualiser les activités de torsion ou détorsion de l'ADN, le test de relaxation de l'ADN par la topoisomérase I a été utilisé. Cette enzyme possède la capacité de cliver l'ADN sur un brin et de le religaturer ensuite. Le clivage réalisé pendant ce court laps

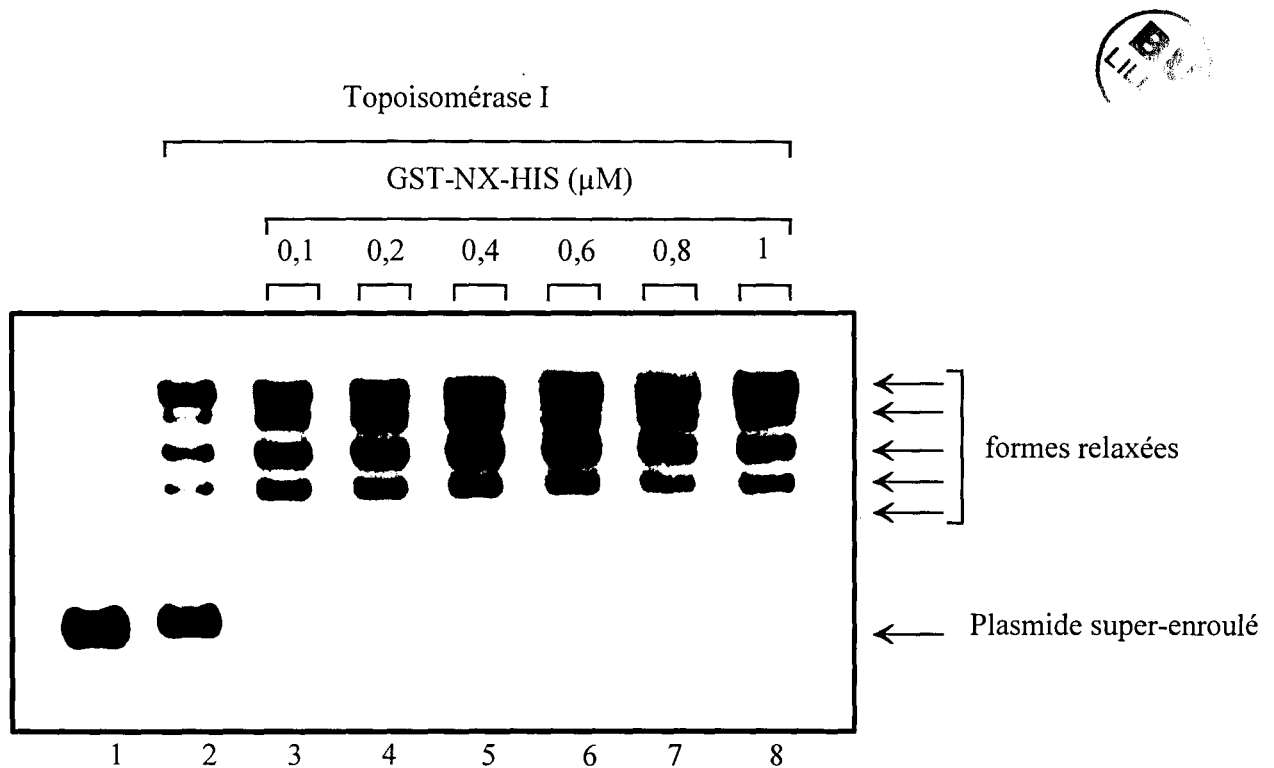


Figure R13 : Test de relaxation de l'ADN induite par la topoisomérase I.

Le plasmide pBEND-05 superenroulé ($0,02 \mu\text{M}$, piste 1) est incubé en présence de topoisomérase seule induisant la formation de différentes formes relaxées de l'ADN (piste 2) ou de topoisomérase I et de concentrations croissantes de protéine GST-NX-HIS (pistes 3 à 8). Le rapport protéine/ADN est de 5/1 (piste 4), 10/1 (piste 5), 20/1 (piste 5), 30/1 (piste 6), 40/1 (piste 7) et 50/1 (piste 8).

de temps permet la relaxation d'un ADN super-enroulé par les seules contraintes générées par le superenroulement. Le clivage permet également à un ADN circulaire d'être enroulé sur lui-même par l'action de *bending proteins*, telles que les protéines de la famille HMG (Payet and Travers, 1997). Pour cette expérience réalisée en collaboration avec Christian Bailly, le plasmide pBEND-05 sous forme super-enroulée (Figure R13, piste 1) a été incubé en présence ou non de topoisomérase I et de concentrations croissantes de protéine GST-NX-HIS (Figure R13, pistes 2 à 8). La relaxation partielle du plasmide super-enroulé par la topoisomérase I génère l'apparition de nombreux topoisomères correspondant chacun à un plus ou moins grand nombre d'enroulements du plasmide sur lui-même, jusqu'à la formation de plasmide circulaire totalement relaxé qui migre le moins vite en gel d'agarose (piste 2). La formation de topoisomères de moins en moins super-enroulés est corrélée à l'augmentation de la concentration en protéine GST-NX-HIS de 0,1 à 1 μM , signe d'une relaxation de l'ADN augmentée en présence de cette protéine. Dès l'ajout de 0,1 μM de GST-NX-HIS (piste 3), la disparition quasi totale de la présence de plasmide sous forme super-enroulée montre que le niveau de relaxation du plasmide est fortement augmenté par rapport à la relaxation induite uniquement par la topoisomérase I (piste 2).

Cette expérience suggère un rôle du domaine de liaison à l'ADN de c-Abl dans la relaxation de l'ADN. La protéine GST-NX-HIS incubée seule avec le plasmide super-enroulé ne montre pas d'activité de relaxation du plasmide fermé. Le domaine de liaison à l'ADN de c-Abl n'a donc pas d'activité de clivage de l'ADN et il est nécessaire que le plasmide soit préalablement ouvert par la topoisomérase pour permettre à ce domaine d'augmenter la relaxation de l'ADN.

4. Le domaine de liaison à l'ADN de c-Abl déstabilise la double hélice d'ADN.

Un des moyens permettant à la protéine c-Abl d'empêcher la circularisation de l'ADN et de favoriser la relaxation de l'ADN induite par la topoisomérase I serait que son domaine de liaison à l'ADN facilite la séparation des deux brins de l'ADN après fixation sur sa séquence cible. Nous avons montré par technique de dénaturation thermique de l'ADN que le domaine de liaison à l'ADN de c-Abl avait tendance à stabiliser l'ADN, montrant ainsi la spécificité de l'interaction. Toutefois, il faut noter que cette expérience a été réalisée dans un

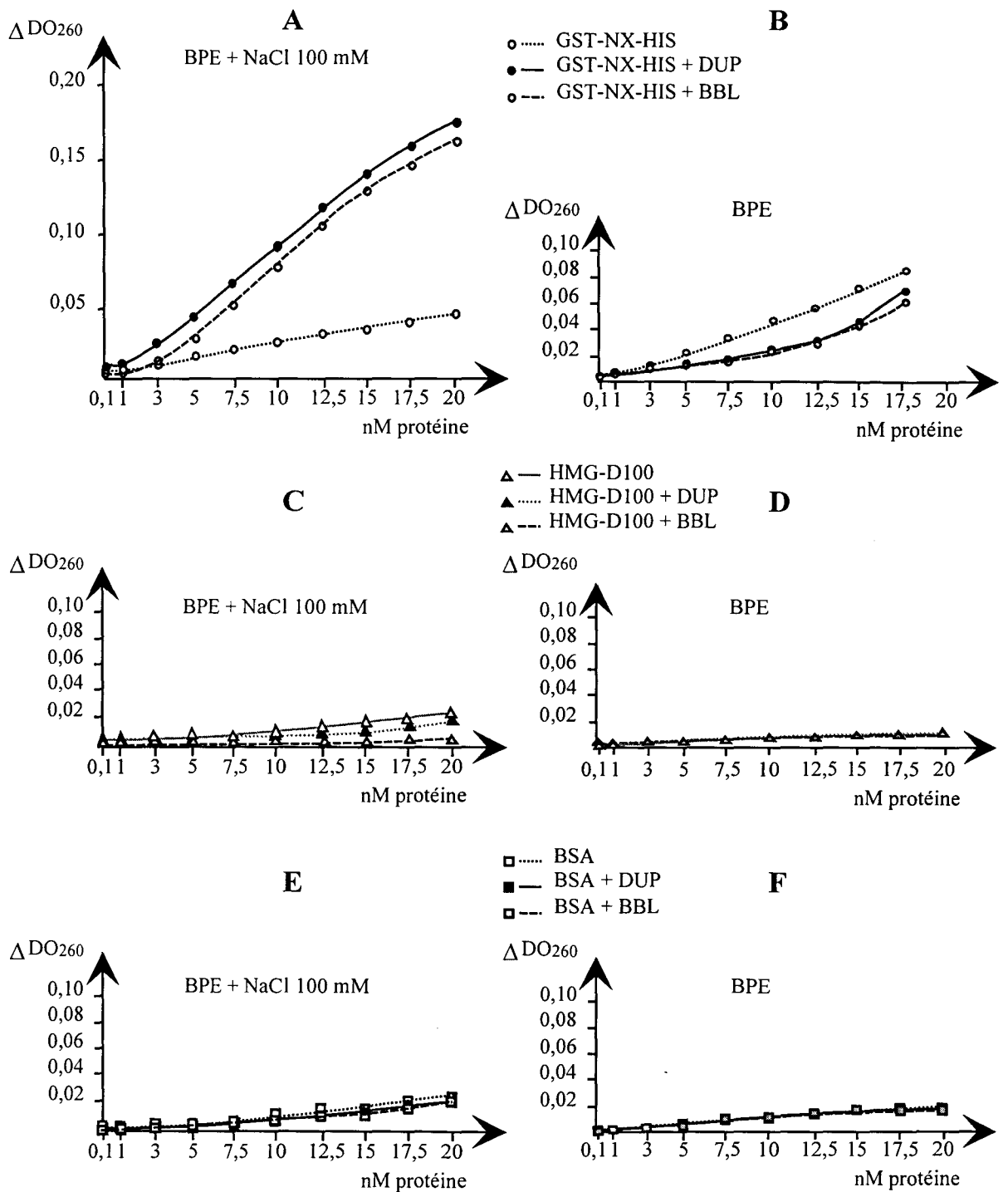


Figure R14 : Mesure de la dénaturation de l'ADN induite par la protéine GST-NX-HIS.

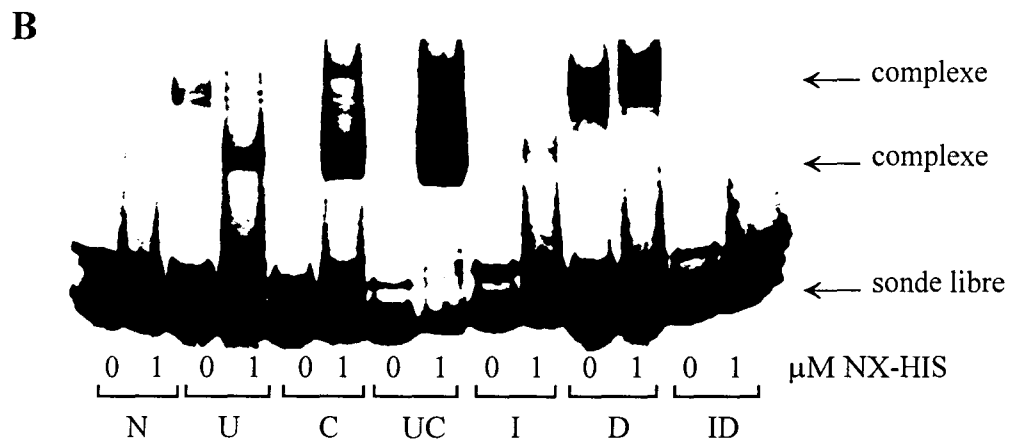
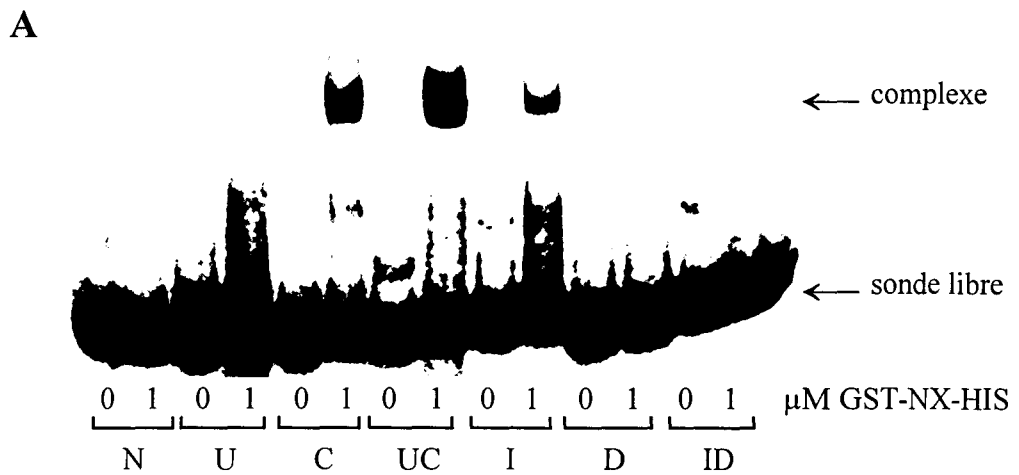
Les différents graphes représentent les variations de la DO_{260} mesurées lors des incubations de quantités croissantes de protéine GST-NX-HIS (graphes A et B), HMG-D100 (graphes C et D) ou BSA (graphes E et F) de 0,1 à 20 nM en présence ou non des oligonucléotides DUP-56mer ou BBL-56mer (correspondant à une DO_{260} initiale de 0,07) et dans les tampons BPE seul (graphes B, D et F) ou BPE additionné de 100 mM NaCl (graphes A, C et E).

tampon très peu salin (tampon BPE, voir section Matériel et Méthode) et donc éloigné des conditions physiologiques du noyau. Cette même expérience a été réalisée avec la protéine HMG1 à la fois dans un tampon de type BPE et dans un tampon de force ionique plus proche des conditions physiologiques. Butler *et al.* (1985) montrent ainsi que, sans NaCl, la protéine HMG1 stabilise la double hélice en rendant plus élevée la température de dénaturation de l'ADN, alors que sous une concentration de 100 à 120 mM NaCl, la température de dénaturation de l'ADN est plus basse en présence qu'en absence de la protéine HMG1, signe que la protéine HMG1 induit une détorsion de l'ADN selon son axe (*unwinding*). Nous avons donc réalisé la même expérience avec la protéine GST-NX-HIS mais les résultats se sont révélés être ininterprétables à cause de la présence de multiples pics probablement liés à un changement de structure de la protéine en plus d'un changement de la nature de l'ADN. Nous avons alors incubé des quantités croissantes de protéines GST-NX-HIS, HMG-D100 (correspondant à la protéine HMG-D, homologue chez la Drosophile de la protéine HMG1, mais déletée de son extrémité acide, obtenu par Dominique Payet), BSA (de 0,1 à 20 μ M) ou de tampon D (dans lequel sont diluées les différentes protéines et utilisé comme contrôle) avec ou sans la sonde DUP-56mer ou BBL à 25°C dans le tampon BPE seul ou additionné de 100 mM NaCl. La protéine HMG-D100, correspondant à l'homologue chez la Drosophile de la protéine HMG1 humaine, est déletée de son domaine acide en C-terminal agissant comme un domaine de régulation négative de l'interaction à l'ADN. Les variations de la DO_{260} sont présentées sur la figure R14. Ainsi, les protéines HMG-D100 et BSA n'augmentent pas la DO_{260} et n'induisent donc pas la séparation des brins d'ADN DUP ou BBL à la fois dans le tampon BPE (Figure R14 D et F) et le tampon BPE + NaCl 100 mM (Figure R14 C et E). Par contre, l'incubation de la protéine GST-NX-HIS avec les oligonucléotides DUP et BBL dans le tampon BPE + NaCl 100 mM (Figure R14A) induit une très nette augmentation de la DO_{260} , signe de la déstabilisation de l'hélice d'ADN puisque la DO_{260} d'une quantité d'ADN dénaturé est plus élevée que celle d'une même quantité d'ADN hybridé. Lorsque l'incubation a lieu dans le tampon BPE seul (Figure R14B), la protéine GST-NX-HIS semble au contraire induire une légère stabilisation des fragments DUP et BBL comme précédemment démontré par augmentation de la température de fusion (Tableau II).

D. Fixation sur le fragment d'ADN TyrT normal ou modifié

Le fragment d'ADN TyrT utilisé est la séquence comprise entre les sites de restriction *EcoRI* et *AvaI* du gène codant l'ARN de transfert de la tyrosine d'*Escherichia coli* (Drew *et al.*, 1985). Différentes sondes modifiées ont été obtenues auprès de Christian Bailly. Ces sondes contiennent une ou deux modifications introduites par PCR linéaire parmi les changements A→D (DAP pour diamino-purine), T→U, Cytosine→Cytosine méthylée (C), G→I (Inosine) avant d'être appariées avec l'ampligène complémentaire. Les bases modifiées D et I correspondent respectivement à l'ajout ou la perte d'un résidu du côté petit sillon de l'ADN alors que les bases modifiées C et U ont respectivement un encombrement plus ou moins important dans le grand sillon de l'hélice d'ADN (voir figure R6).

Chacune de ces sondes a été testée par retard en gel en présence de la protéine GST-NX-HIS ou de la protéine NX-HIS (Figure R15A et B). Ces deux protéines fixent de manière identique les sondes modifiées ou normale hormis que la protéine NX-HIS semble se fixer sur deux sites de la séquence TyrT alors que la protéine GST-NX-HIS ne semble reconnaître qu'un seul site de fixation. Ceci peut être expliqué par le fait que la protéine GST-NX-HIS a un encombrement stérique plus important que la protéine NX-HIS de par la présence du domaine GST de 26 kDa qui l'empêche de fixer en même temps les deux sites reconnus par la protéine NX-HIS plus petite. Il faut noter que le domaine de liaison à l'ADN de c-Abl reconnaît la séquence TyrT avec une plus faible affinité que sa séquence consensus déterminée précédemment par *CASTing* et que nous n'avons pas pu obtenir d'empreinte à la DNase I des protéines GST-NX-HIS ou NX-HIS sur la sonde TyrT normale et donc localiser ses sites précis de reconnaissance. Les résultats du retard en gel (Figures R15 et R16) montrent que les protéines GST-NX-HIS et NX-HIS ont une affinité plus forte pour la sonde I que pour la sonde normale N, suggérant que l'augmentation d'accessibilité au petit sillon facilite la fixation des protéines, mais montrent qu'elles ne reconnaissent que très peu les sondes D et ID dans lesquelles le petit sillon de l'ADN est obturé par le groupement du DAP. Ces deux observations suggèrent que le domaine de liaison à l'ADN de c-Abl interagit par le petit sillon de l'ADN, comme montré précédemment. Le même résultat a été montré par d'autres auteurs pour la protéine HMG (Bailly *et al.*, 1996b). Les modifications U, C et UC de la séquence TyrT sont toutes reconnues de manière plus forte que la sonde N par les protéines GST-NX-HIS et NX-HIS. Ainsi, l'augmentation ou la diminution de l'encombrement du



C

5'-	AATT CCGGTACCT	TTAATC -3'	(Watson primer)	
5'-	AATT CCGGTACCT	TTAATCCGTT	ACGGATGAAA	ATTACGCAAC
	0 10	20	30	40
3'-	GGCCAATGGA	AATTAGGCAA	TGCCTACTTT	TAATGCGTTG
	CAGTTCATTT	TTCTCAACGT	AACACTTTAC	AGCGGCGCGT
	50	60	70	80
	GTCAAGTAAA	AAGAGTTGCA	TTGTGAAATG	TCGCCGCGCA
	CATTGATAT	GAAGCGCCCC	GCTTCCCGAT	AAGGGAGCAG
	90	100	110	120
	GTAAACTATA	CTTCGCGGGG	CGAAGGGCTA	TTCCCTCGTC
	GCCAGTAAA	AGCATTACCC	CGTGGTGGGG	GTTC-3'
	130	140	150	158
	CGGTCATTTT	TCGTAATGGG	GCACCACCCC	CAAGGGCT -5'
	(Crick primer)	3'-GG	GCACCACCCC	CAAGGGCT -5'

Figure R15 : Interaction des protéines de fusion avec les sondes TyrT normales ou modifiées.

Les sondes TyrT normales (N, séquence présentée dans la partie C) ou modifiées (U, C, UC, I, D et ID) sont incubées avec ou sans 1µM de protéine GST-NX-HIS (partie A) ou NX-HIS (partie B) avant d'être séparées par retard en gel. Les bandes retardées spécifiques de l'interaction des protéines GST-NX-HIS (un complexe) ou NX-HIS (deux complexes) sont repérées par les flèches.

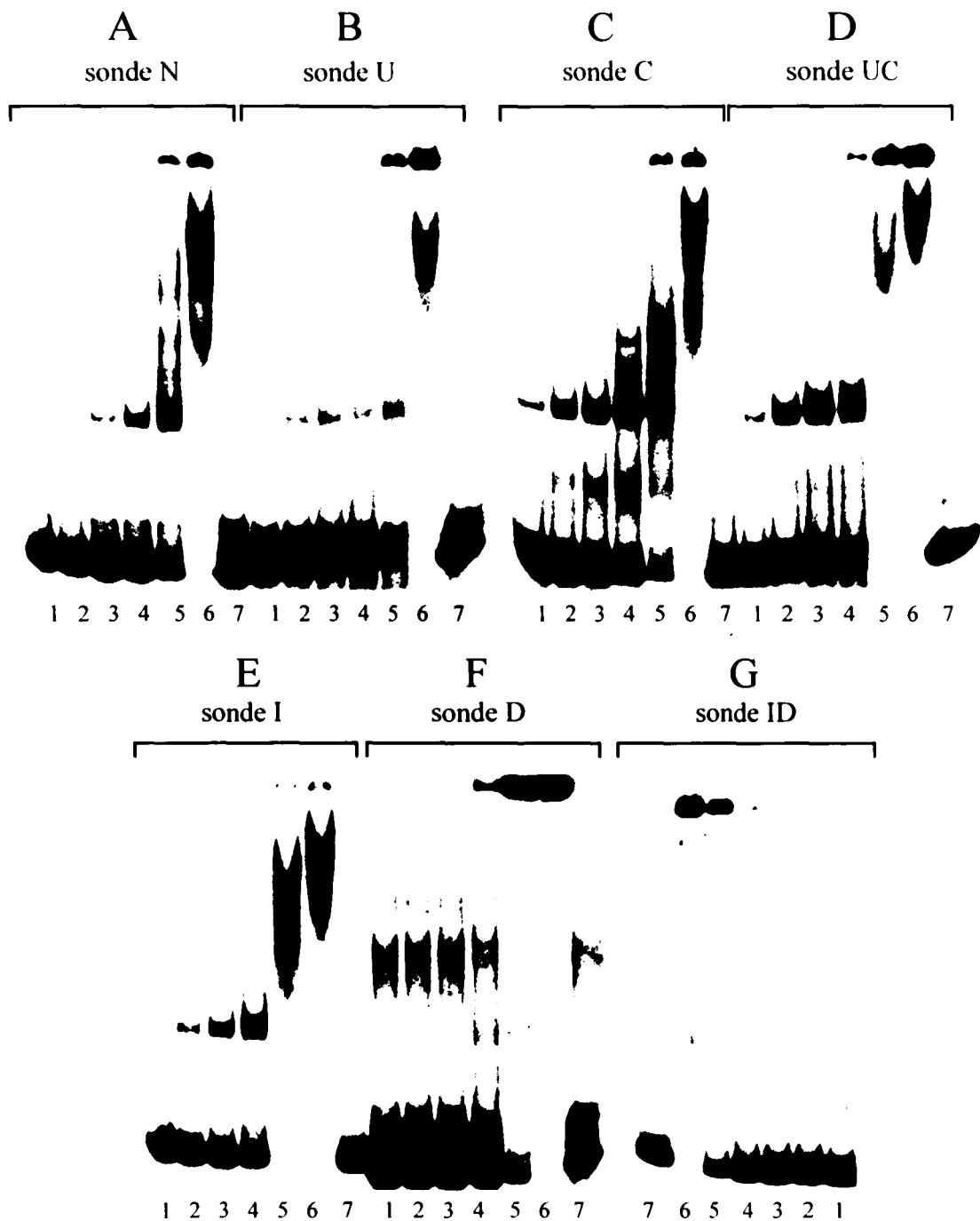


Figure R16 : Interaction de quantités croissantes de protéine GST-NX-HIS avec les sondes Tyrt normales ou modifiées.

Les différentes sondes (gels A à G) sont incubées seules (pistes 7) ou avec des concentrations croissantes de protéine GST-NX-HIS : 0,1 μM (pistes 1), 0,25 μM (pistes 2), 0,5 μM (pistes 3), 1 μM (pistes 4), 1,5 μM (pistes 5) et 2 μM (pistes 6) dans les conditions d'étude par retard en gel.

grand sillon de l'hélice ne semble pas intervenir directement dans la reconnaissance de l'ADN par c-Abl. Nous avons testé la fixation de la protéine HMG-D100 sur les sondes TyrT N, U, C et UC (Figure R15C). De la même manière que c-Abl, HMG-D100 a plus d'affinité pour les sondes U et UC que pour la sonde N mais a beaucoup moins d'affinité pour la sonde C, contrairement aux résultats obtenus pour le domaine de liaison à l'ADN de c-Abl.

Afin de déterminer si la protéine c-Abl a réellement une affinité préférentielle pour de l'ADN méthylé, nous avons comparé son interaction avec la sonde DUP-38 mer et avec une sonde dérivée par méthylation des trois cytosines du site consensus. Ces deux sondes sont reconnues avec la même affinité par la protéine GST-NX-HIS, suggérant que c-Abl n'a pas de préférence réelle pour de l'ADN méthylé à la manière des histones (McArthur and Thomas, 1996). Il faut cependant noter que la méthylation sur les cytosines que nous avons utilisée ne correspond pas à la méthylation des îlots CpG rencontrée *in vivo* puisque chacune des cytosines est dans notre cas suivie d'une adénine dans le site consensus de liaison à l'ADN de c-Abl.

Nous avons également testé la capacité de c-Abl à reconnaître de l'ARN afin d'expliquer l'importance de la modification T→U de la séquence TyrT. Pour cela, une sonde ARN dérivée de TAR du VIH (obtenu auprès de Laurent Dassonneville) a été incubée avec la protéine GST-NX-HIS ou avec la protéine HMG-D100. Si la protéine HMG-D100 interagit effectivement avec la sonde ARN, aucun complexe n'est visualisé avec la protéine GST-NX-HIS. Ainsi, c-Abl n'a pas d'affinité préférentielle avec de l'ARN contrairement à la protéine HMG-D. L'augmentation de l'affinité pour les sondes U serait probablement due à la diminution de l'encombrement du grand sillon sur lequel des forces liées à celui du petit sillon pourraient agir de manière à réduire l'espace du grand sillon et augmenter ainsi l'accessibilité du petit sillon.

Des expériences de compétition à la nétropsine ont alors été entreprises avec les différents sondes modifiées reconnues par la protéine de fusion (Figure R17). Le complexe retardé avec les sondes N, U, I et ID est déplacé par des concentrations croissantes en nétropsine, montrant encore que la fixation de la protéine se fait par le petit sillon de l'ADN. Par contre, les complexes formés avec les sondes C et UC ne sont que peu ou pas influencés par la présence croissante de nétropsine.

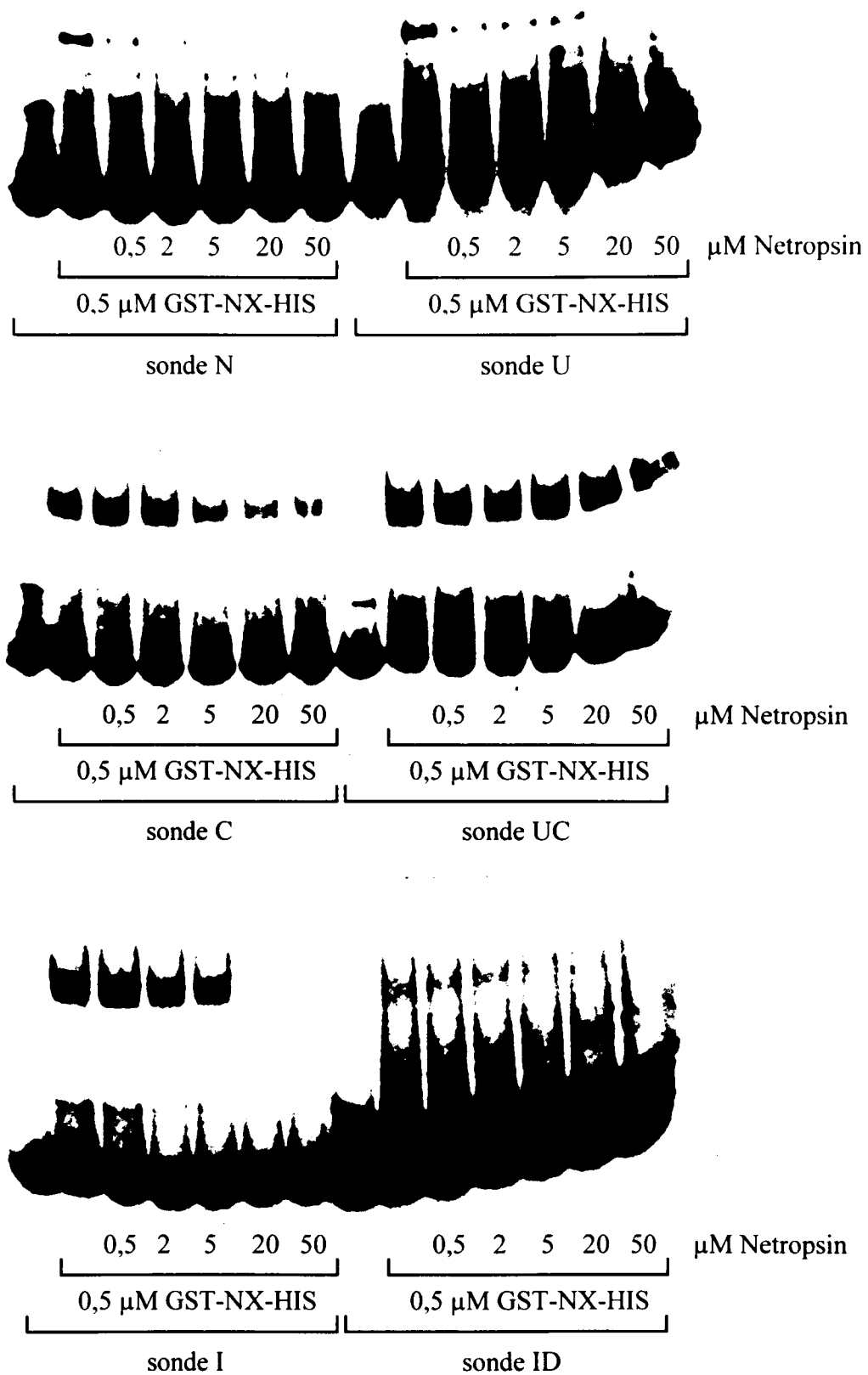


Figure R17 : Compétition à la nétropsine.

Les différentes sondes TyrT normales ou modifiées sont incubées avec une quantité fixe de protéine GST-NX-HIS (0,5 μM) à laquelle sont ajoutées ou non des concentrations croissantes de nétropsine de 0,5 à 50 μM.

E. Influence de la protéine GST-NX-HIS sur la fixation de la protéine HMG-D sur l'ADN.

1. Etude par retard en gel.

Au vu des modalités communes de liaison à l'ADN des protéines c-Abl et HMG, nous avons voulu vérifier s'il existait une possible compétition pour la cible entre les domaines de liaison à l'ADN de ces protéines. Pour cela, des quantités croissantes d'une protéine ont été incubées avec une quantité fixe de l'autre protéine et de la sonde duplex linéaire de 56 pb contenant la séquence cible de fixation de c-Abl et les complexes formés sont séparés par retard en gel. Comme présenté sur la figure R18, l'incubation d'une quantité croissante de protéine HMG-D100 (de 0,01 à 1 μ M) avec une concentration fixe de protéine GST-NX-HIS (0,5 μ M) montre une augmentation logique de la fixation de la protéine HMG-D100 sur la sonde DUP alors que la bande correspondant au complexe retardé avec la protéine GST-NX-HIS fixé sur la sonde ne varie pas en intensité. L'expérience inverse est réalisée avec l'incubation d'une quantité fixe de protéine HMG-D100 (0,5 μ M) avec des concentrations croissantes de protéine GST-NX-HIS (de 0,1 à 1 μ M). Comme révélé par retard en gel, l'intensité du complexe GST-NX-HIS/DUP retardé augmente proportionnellement à la quantité de protéine GST-NX-HIS incubée. Par contre, contrairement au résultat précédent, la fixation de la protéine HMG-D100 sur la sonde DUP-56 augmente, elle aussi, proportionnellement à l'augmentation de la concentration en protéine GST-NX-HIS. Ainsi, il n'apparaît pas de compétition entre les deux protéines pour la fixation à l'ADN mais le domaine de liaison à l'ADN de c-Abl semble augmenter la capacité de fixation à l'ADN de la protéine HMG-D100.

La même expérience a été réalisée avec les sondes dérivées de la séquence TyrT. Dans chacun des cas, l'augmentation de la quantité de protéine HMG-D100 ne modifie pas la capacité de liaison à l'ADN de la protéine GST-NX-HIS (résultat non montré). Comme dans le cas de la sonde DUP-56, l'augmentation de la concentration en protéine GST-NX-HIS augmente la capacité de fixation de la protéine HMG-D100 aux sondes N et C (Figure R19 A et B) alors qu'elle diminue la fixation de HMG-D100 sur les sondes modifiées U et UC (Figure R19 C et D).

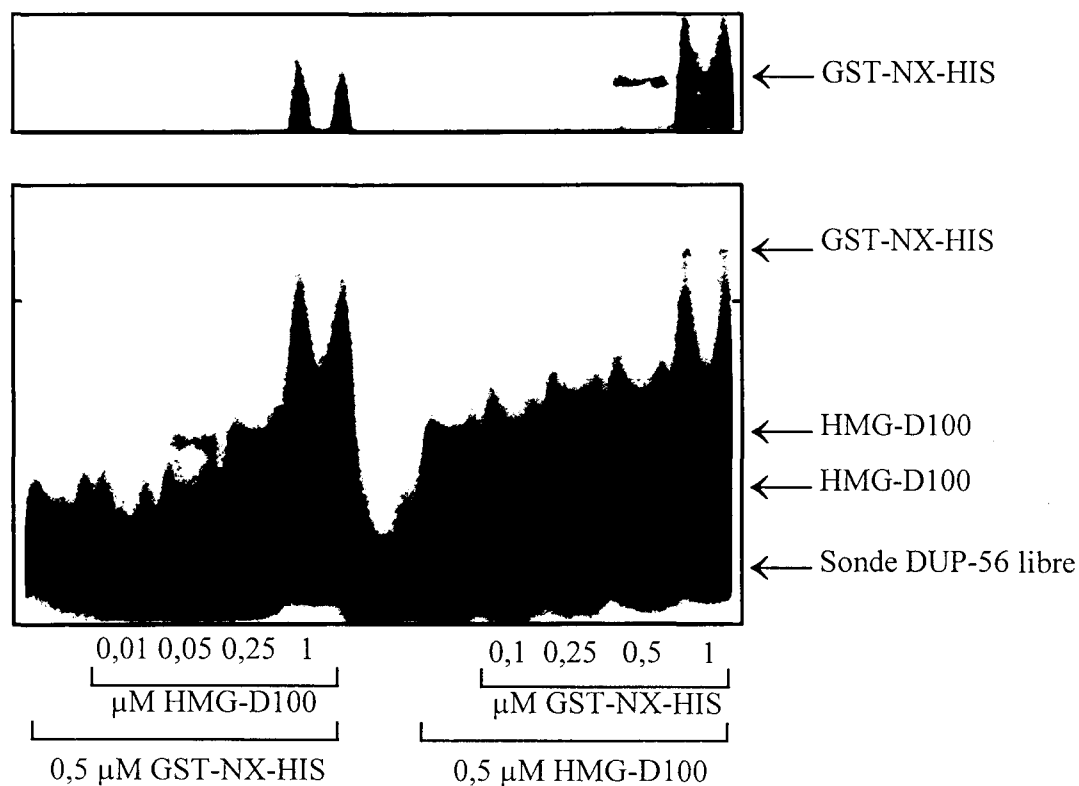


Figure R18 : Influence de la protéine GST-NX-HIS sur l'interaction de la protéine HMG-D100 à la sonde DUP-56mer.

La sonde DUP-56mer est déposée seule ou, d'une part, en présence de 0,5 μM de protéine GST-NX-HIS et de quantités croissantes de protéines HMG-D100 de 0,01 à 1 μM et, d'autre part, en présence d'une quantité fixe de protéine HMG-D100 (0,5 μM) auxquelles sont ajoutées ou non des quantités croissantes de protéine GST-NX-HIS de 0,1 à 1 μM. La partie haute correspond à une augmentation du contraste de la bande correspondant au complexe GST-NX-HIS/sonde DUP-56mer plus faiblement visualisé dans la partie basse. GST-NX-HIS comme avec la sonde 4Wb de la piste 5.

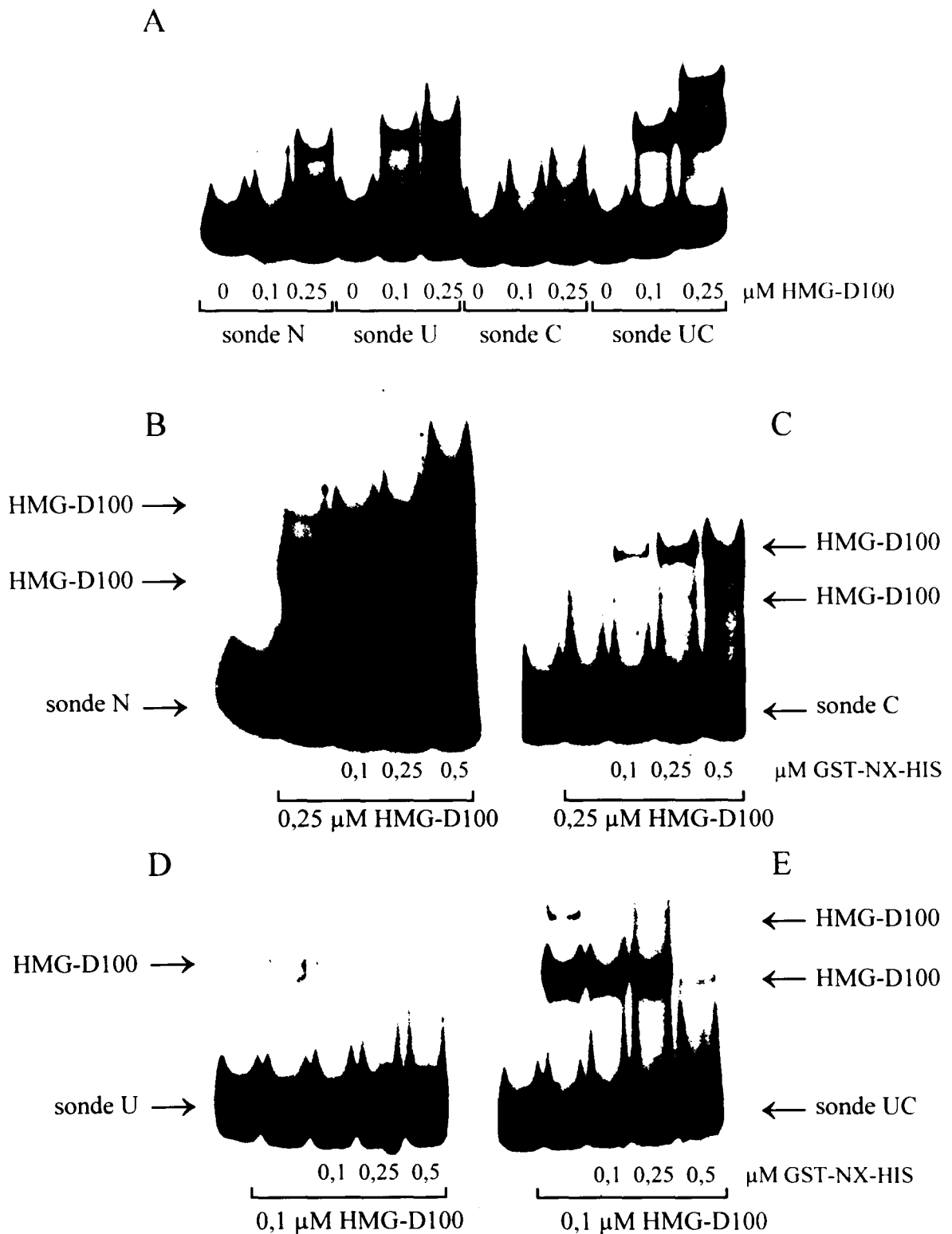


Figure R19 : Influence de la protéine GST-NX-HIS sur l'interaction de la protéine HMG-D100 aux sondes TyrT normales ou modifiées.

Le gel A correspond à l'incubation de la protéine HMG-D100 (0,1 ou 0,25 μM) avec les sondes TyrT normales N ou TyrT modifiées U, C et UC.

Les parties B, C, D et E correspondent à l'interaction d'une quantité fixe de protéine HMG-D100 (0,25 μM pour les gels B et C ou 0,1 μM pour les gels D et E) en présence de quantité croissantes de protéine GST-NX-HIS de 0,1 à 0,5 μM avec les sondes TyrT normales (gel B), C (gel C), U (gel D) ou UC (gel E).

2. Etude par la technique de circularisation de l'ADN.

Les protéines HMG sont capables de circulariser de petits fragments d'ADN (aussi petit que 66 pb pour la protéine HMG-1). Nous avons tout d'abord vérifié cette capacité chez la protéine HMG-D100. Afin d'obtenir des fragments d'ADN de taille courte et aux extrémités compatibles, nous avons cloné le fragment d'ADN de 76 pb compris entre les sites de restriction *Xba*I et *Bam*HI du vecteur pcDNA3 entre les mêmes sites de restriction du vecteur pBS_{II}SK-05 et du vecteur pBS_{II}SK-3A contenant un oligonucléotide constitué de trois répétitions de 6 A séparées de 5 pb et possédant la capacité intrinsèque de se courber. Par digestion de ces vecteurs par les enzymes de restrictions *Eco*RI et *Eco*RV, des fragments de 84, 74, 68 et 58 pb sont obtenus. Aucun de ces fragments n'est capable de se circulariser seul (Figure R20A pistes 2, 5, 8 et 11) mais le peut en présence de 50 nM de protéine HMG-D100 (pistes 1, 4, 7 et 10). De même, la protéine HMG-D100 augmente la formation d'ADN circulaire à partir du fragment de 121 pb contenant la séquence 05 et obtenu par digestion sur les sites *Xho*I utilisé précédemment en incubation avec la protéine GST-NX-HIS. Ce fragment forme très peu de cercles en présence d'ADN ligase seule mais peut former des cercles de dimères d'ADN (Figure R20B, pistes 2 et 3). Une quantité croissante de protéine HMG-D100 induit l'augmentation de la quantité de cercles en monomères (pistes 7 à 10) dont l'identité est révélée par digestion à l'exonucléase III (piste 11).

Le fragment de 68 pb a également été incubé en présence de 25 nM de protéine HMG-D100 seule ou avec des quantités croissantes de protéine GST-NX-HIS avant d'être incubé avec l'ADN ligase. La figure R21 montre, d'une part, que ce fragment de 68 pb forme une grande quantité d'ADN circulaire en présence de la protéine HMG-D100 (pistes 4 et 5) alors qu'il n'en formait pas en absence de cette protéine (pistes 2 et 3) et, d'autre part, que la quantité d'ADN circulaire induit par HMG-D100 diminue avec l'augmentation de la concentration en protéine GST-NX-HIS présente dans le mélange (pistes 6 à 11). Le même résultat est obtenu pour des mêmes quantités de protéines HMG-D100 et GST-NX-HIS avec les sondes de 121 pb *Xho*I-*Xho*I, de 74 pb *Eco*RV-*Eco*RV et de 58 pb *Eco*RI-*Eco*RI contenant toutes les trois la séquence 05 (non montré). Paull et collaborateurs (1993) avaient montré que la protéine HMG1 était capable de permettre la circularisation de fragment d'ADN de taille supérieure ou égale à 66 pb. La protéine HMG-D100 utilisée dans nos expériences semble

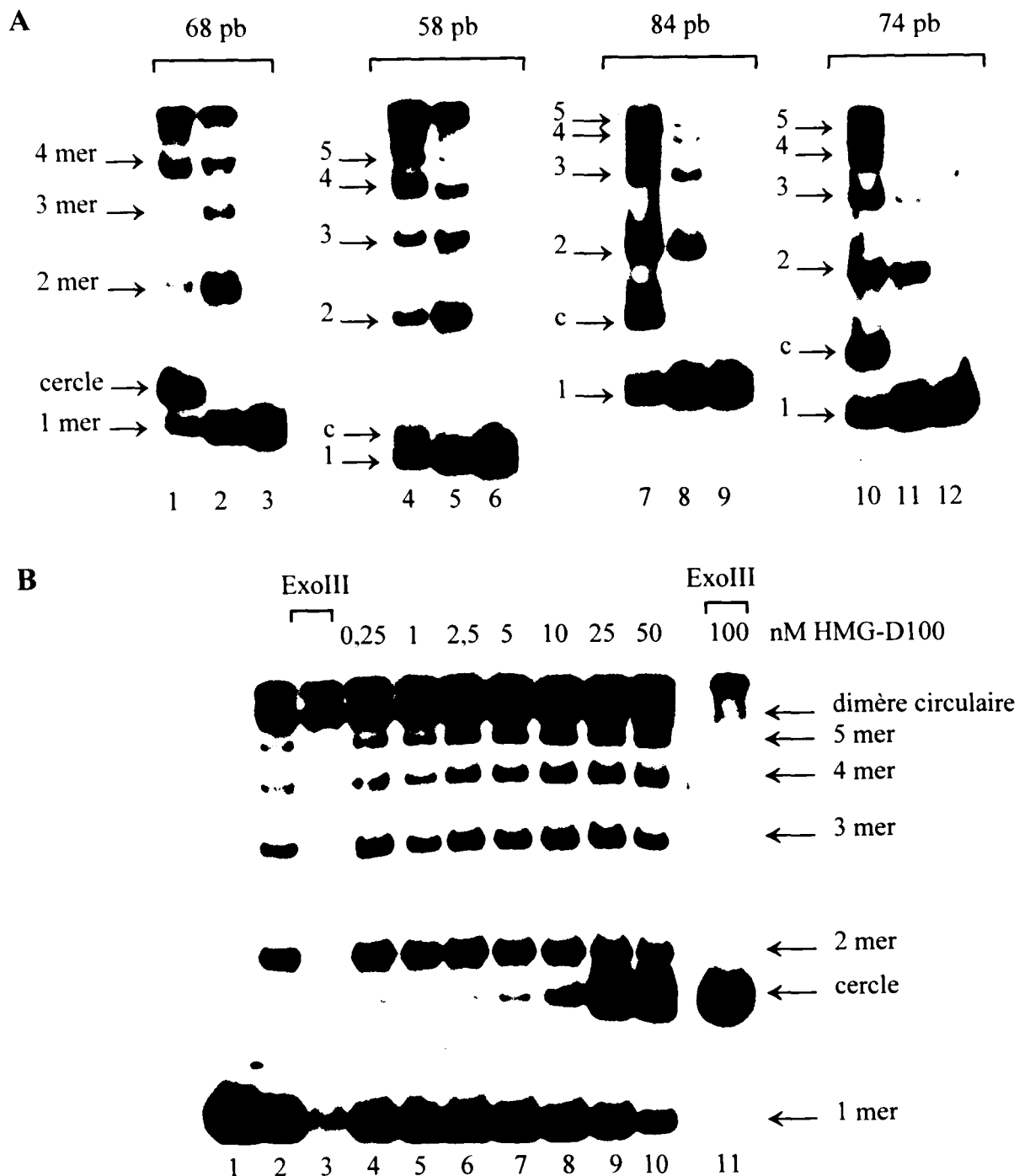


Figure R20 : Mise en évidence de la circularisation de l'ADN par la protéine HMG-D100.

A : Des fragments d'ADN de différentes tailles sont déposés seuls dans les pistes 3, 6, 9 et 12 ou incubés sans (pistes 2, 5, 8 et 11) ou avec 50 nM de protéine HMG-D100 (pistes 1, 4, 7 et 10) avant ajout de la ligase du phage T4. Les fragments d'ADN sont issus de la digestion par les enzymes de restriction *EcoRI* et *EcoRV* du vecteur pBS_{II}SK-05 (fragments de 58 et 74 pb, respectivement) et du vecteur pBS_{II}SK-3A contenant un oligonucléotide constitué de trois répétitions de 6 A séparées de 5 pb (fragments de 68 et 84 pb, respectivement).

B : Le fragment d'ADN de 121 pb contenant la séquence 05, obtenu par digestion au niveau des sites *XhoI* (voir Matériel et Méthodes), est déposé seul (piste 1) ou incubé avec la ligase (pistes 2 à 11) seule ou après incubation avec des concentrations croissantes de protéine HMG-D100 (pistes 4 à 11). La digestion des ADN linéaires est effectuée par l'exonucléase III (ExoIII) dans les pistes 3 et 11 et révèle l'existence des ADN circulaires sous forme monomère (cercle) ou dimère.

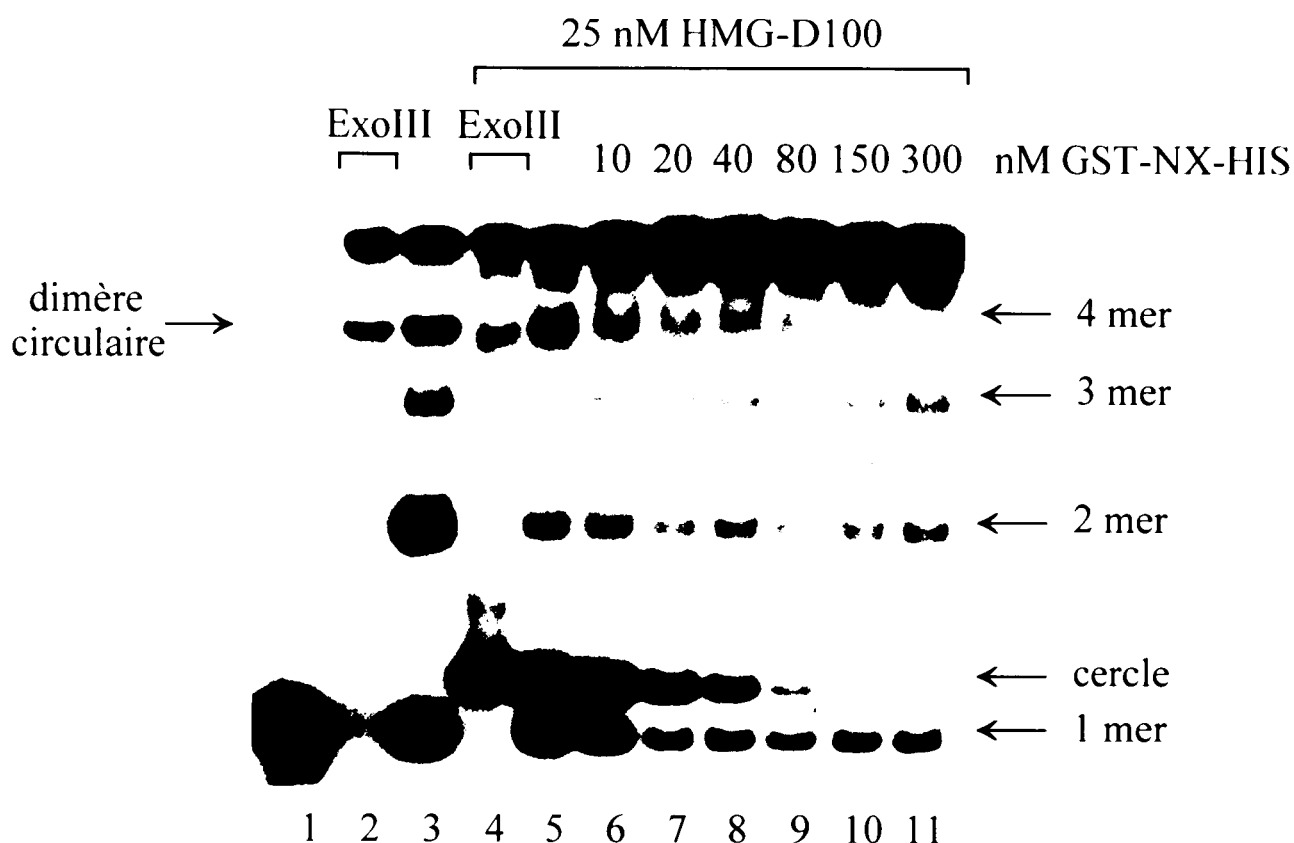


Figure R21 : Test de circularisation de l'ADN en présence à la fois des protéines GST-NX-HIS et HMG-D100.

Le fragment de 68 pb issu de la digestion *EcoRI* du vecteur pBS_{II}SK-3A est incubé avec 25 nM de protéine HMG-D100 seule (pistes 4 et 5) ou avec des quantités croissantes de protéine GST-NX-HIS (pistes 6 à 11) avant d'être incubé avec l'ADN ligase (pistes 2 à 11). L'ADN circulaire sous forme de monomère ou de dimère est révélé par sa résistance à la digestion par l'exonucléase III (pistes 2 et 4).

donc avoir la même capacité de torsion de l'ADN que son homologue HMG1 puisqu'elle permet la circularisation de fragment d'ADN de 68 pb.

Ces expériences de circularisation de l'ADN associées à celles de retard en gel montrent que les protéines HMG-D100 et GST-NX-HIS ont des actions opposées sur la torsion de l'ADN alors même qu'elles ne sont pas en concurrence pour la fixation à leur séquence cible. De plus, elles montrent que l'augmentation de la capacité de liaison à sa cible de la protéine HMG-D100 par la protéine GST-NX-HIS ne permet pas de voir la seule capacité de circularisation de l'ADN induite par HMG-D100, puisque les concentrations de protéine GST-NX-HIS induisent la détorsion de l'ADN pouvant se circulariser en présence de protéine HMG-D100 (Figure R21) ou de fragments d'ADN suffisamment longs pour pouvoir se circulariser seuls (Figure R12), sont du même ordre (20 à 60 nM GST-NX-HIS).

II. Coopération entre les protéines c-Myb et NF-M pour la régulation de l'enhancer du virus HBV.

A. L'élément EP du Virus de l'Hépatite B

Le virus de l'hépatite B (HBV) est un membre de la famille des *Hepadnaviridae*. Ce virus est porté par 200 millions d'individus à travers le monde et est responsable d'hépatites chroniques ou aiguës pouvant évoluer en carcinome cellulaire primaire (CCH) chez l'homme. Il est constitué d'une capsidie icosaédrique de 30 à 34 nm entourée d'une enveloppe lipidique dans laquelle sont insérées les protéines antigéniques. Il contient un ADN circulaire partiellement double brin de 3,2 kb, ainsi que sa propre ADN polymérase pour la réplication (pour revue voir Tiollais *et al.*, 1985). Bien que ce virus soit hépatotropique, des formes libres et intégrées de son ADN ont également été détectées dans les cellules de la moëlle osseuse et les cellules mononucléaires du sang circulant, cellules pouvant agir comme réservoir du virus et faciliter sa transmission par voie sanguine (Romet-Lemonne *et al.*, 1983 ; Elfassi *et al.*, 1984 ; Noonan *et al.*, 1986). Le génome du virus HBV contient 4 phases ouvertes de lecture, dont certaines sont chevauchantes, permettant la synthèse des protéines S, C, P et X (Figure R22). Les gènes S et C codent les protéines structurales : la protéine S se localise dans l'enveloppe du virus et contient le déterminant antigénique, alors que la protéine C sert à la construction de la capsidie virale. Le gène P code quant à lui l'ADN polymérase virale à activité *reverse transcriptase* (pour revue voir Schaller and Fischer, 1991). Enfin, le gène X code une protéine transactivatrice indispensable à la réplication du virus qui interagit avec la TATA-*box* via la TBP (Qadri *et al.*, 1995) et la protéine CREB (Williams and Andrisani, 1995). La protéine X augmente également l'activité signalétique de Ras par la cascade des MAP-Kinases essentielle à l'activation de AP-1 (Benn and Schneider, 1994 ; Doria *et al.*, 1995) et stimule l'activité NF- κ B par action sur ses inhibiteurs cytoplasmiques (Su and Schneider, 1996). Chacune de ces phases ouvertes de lecture est transcrite sous le contrôle d'un promoteur spécifique. Le promoteur Cp sert à la régulation de l'expression de l'ADN pré-génomique, en plus de celle de l'ARNm codant la protéine C, grâce à l'action coordonnée des séquences promotrices et de séquences *enhancer* I et II.

L'*enhancer* I (position 1043-1266 dans le sérotype *ayw* ; Ben-Levy *et al.*, 1989) est situé entre les phases ouvertes de lecture des gènes S et X et chevauche partiellement le

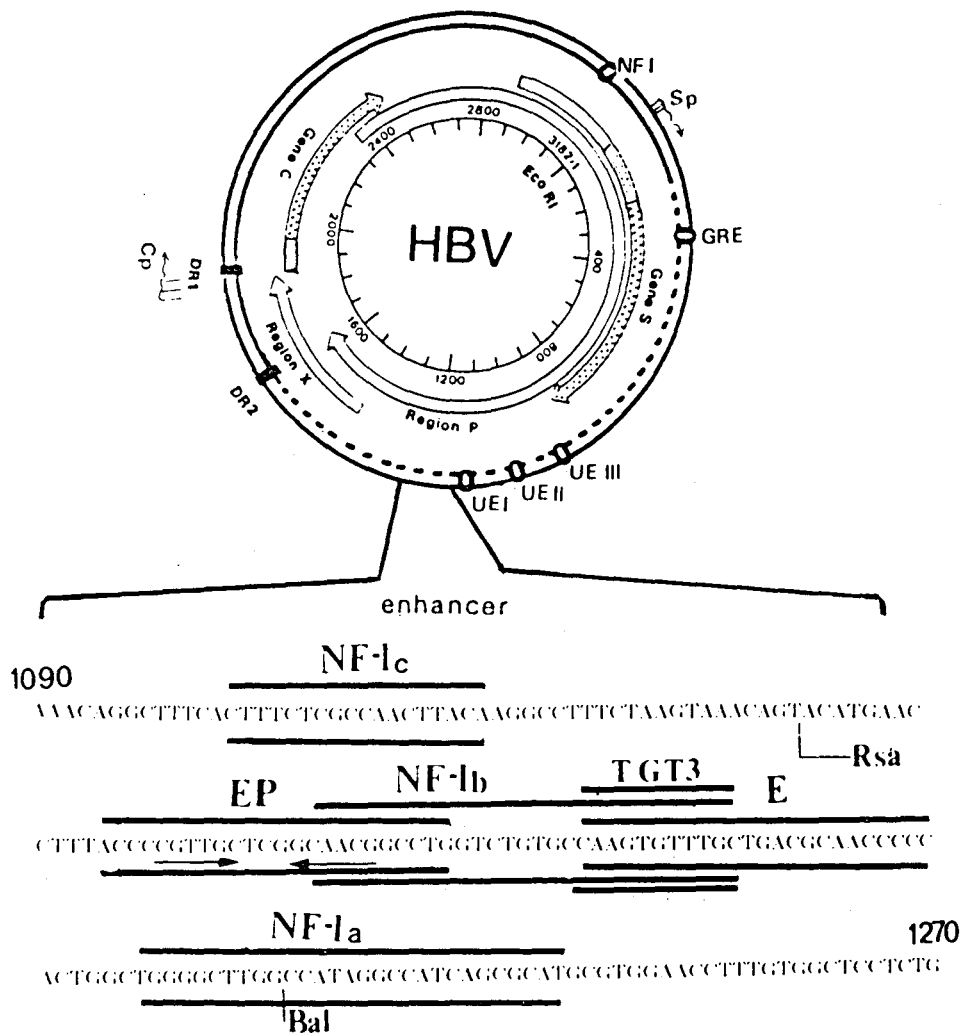


Figure R22 : Le virus HBV et la localisation de l'élément EP au sein de l'enhancer.

Les différentes régions codantes sont représentées par des flèches épaisses.
 Les flèches sous la séquence indiquent la localisation du palindrome (d'après Ben-Levy *et al.*, 1989).

promoteur du gène X (Shaul *et al.*, 1985 ; voir figure R23A), alors que l'*enhancer* II (position 1687-1774 du sérotype *ayw*) est localisé dans la phase ouverte de lecture du gène X et chevauche en partie le promoteur du gène C (Yee, 1989 ; Yuh and Ting, 1993). L'*enhancer* II apparaît avoir une activité spécifique du foie puisqu'il a une très forte activité *enhancer* sur le promoteur SV40 dans les cellules hépatiques mais pas d'action dans les cellules non-hépatiques telles que les HeLa (Yee, 1989). Cet *enhancer* II est régulé par des protéines fortement exprimées dans le foie telles que les protéines HNF-1, HNF-3, HNF-4 et C/EBP (Yuh and Ting, 1993 ; Li *et al.*, 1995). Par contre, la fonction exacte de l'*enhancer* I reste matière à controverse puisque certains auteurs ont suggéré qu'il avait une activité restreinte aux cellules du foie (Honigwachs *et al.*, 1989) alors que de nombreuses autres études tendent à prouver que cet *enhancer* est actif dans de nombreux types cellulaires (Elfassi *et al.*, 1984 ; Elfassi, 1987 ; Karpen *et al.*, 1988 ; Vannice and Levinson, 1988). Il contient de nombreux éléments régulateurs tels que les éléments EP, E, GB, TGT3, NF-1a, NF-1b, NF-1c et différents sites de fixation pour la protéine C/EBP (Figure R22). L'élément E a un rôle crucial dans l'activité de l'*enhancer* I d'HBV (Shaul and Ben-Levy, 1987). Il est reconnu par plusieurs protéines dont le facteur de transcription C/EBP, facteur très exprimé dans les cellules hépatiques, adipeuses et hématopoïétiques (voir Généralités, paragraphe III E), la protéine c-Jun et le facteur CREB (pour *cAMP Responsive Element Binding protein*) (Dikstein *et al.*, 1990b ; Faktor *et al.*, 1990). A forte concentration, la protéine C/EBP interagit également avec les éléments NF-1b et EP où elle a alors un rôle inhibiteur sur l'*enhancer* I, probablement en déplaçant les complexes actifs sur ces derniers éléments (Dikstein *et al.*, 1990b). Les sites NF-1a, NF-1b et NF-1c sont reconnus par la protéine NF-1 (Patel *et al.*, 1989), le site TGT3 par une protéine encore inconnue (Ben-Levy *et al.*, 1989) et le site GB par les facteurs de transcription HNF-4, RXR et COUP-TF (Garcia *et al.*, 1993). L'élément EP a quant à lui un rôle important pour moduler l'activité d'autres éléments de l'*enhancer* I comme l'élément E (Dikstein *et al.*, 1990a). Il agit également en coopération avec l'élément GB (Garcia *et al.*, 1993). Il est constitué de deux séquences de 6 pb identiques en position inverse et séparées de 3 pb. L'élément EP semble être reconnu par le même complexe protéique que les éléments MIF-1 (*Myc Intron-binding Factor*) du premier intron du gène *c-myc* (Zajak-Kaye *et al.*, 1988) et EF-C de l'*enhancer* du Polyomavirus (Ostapchuk *et al.*, 1989). Cet élément EP a d'abord été pressenti comme étant la cible du proto-oncogène c-Abl (Dikstein *et al.*, 1992 ; 1996) avant d'être identifié par de nombreux auteurs comme étant la

cible de la protéine RFX1 (Siegrist *et al.*, 1993 ; Reinhold *et al.*, 1995 ; Blake *et al.*, 1996). Cette protéine reconnaît une séquence cible palindromique GTNRC^C/_N-N₍₀₋₃₎-RGYAAC (Emery *et al.*, 1996) sur laquelle elle se fixe en monomère ou en homo- ou hétéro-dimère avec les protéines de la famille RFX (Siegrist *et al.*, 1993 ; Reith *et al.*, 1994c). La fixation de RFX1 en hétérodimère sur l'élément EP correspond à une inhibition de la transactivation contrairement à l'action de la protéine RFX1 agissant en monomère (Katan *et al.*, 1997). La protéine RFX1 a d'abord été identifiée comme étant une protéine transactivatrice des gènes du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II en reconnaissant la séquence X du promoteur de ces gènes (Reith *et al.*, 1994a, 1994b ; Durand *et al.*, 1994). La protéine RFX1 se fixe à l'élément EP en complexe avec la protéine MIBP1 (*Myb Intron-Binding Protein 1*) (Reinhold *et al.*, 1995 ; Blake *et al.*, 1996).

Arcinas *et al.* (1994) ont par ailleurs montré par CAT assays que l'activation de l'élément EP-like du promoteur du gène *c-myc*, ainsi que celle de l'*enhancer* du virus HBV via l'élément EP, était indépendante de la fixation de la protéine c-Abl sur ces éléments de régulation. Cette activation apparaît être indépendante de la présence du domaine de liaison à l'ADN de c-Abl, alors qu'au moins son domaine tyrosine kinase serait impliqué.

Ainsi, pour l'activation du promoteur de *c-myc*, la protéine c-Abl agirait en phosphorylant différents substrats, tel que le *C-terminal domain* (CTD) de la sous-unité 2 de l'ARN polymérase II (Baskaran *et al.*, 1993, 1996). Pour Arcinas *et al.* (1994), la localisation de c-Abl à proximité du promoteur de *c-myc* impliquerait une liaison indirecte à l'ADN via une protéine à activité de liaison à l'ADN avec laquelle elle pourrait interagir.

L'élément EP est un site palindromique de 15 pb constitué de deux séquences de 6 pb répétées et inversées qui sont séparées par 3 pb (Figure R23A). La distance qui sépare ces deux parties identiques et inversées est importante pour la transactivation de l'*enhancer* d'HBV (Ostapchuk *et al.*, 1989), suggérant la fixation de protéine en homo- ou hétéro-dimère sur l'élément EP. Une distance trop grande empêche la coopération des protéines fixées de part et d'autre, les protéines se retrouvant à des positions trop éloignées sur l'une ou l'autre face de la double hélice d'ADN. La diminution de cet espace conduit aussi à l'inhibition de l'action de l'élément EP. Toutefois, l'intercalation de 11 pb supplémentaires entre les deux séquences palindromiques de l'élément EP aboutit au retour de la fonction activatrice de l'élément EP. Dans ce cas, un tour de spire de l'ADN sépare les deux facteurs qui se retrouvent dans les mêmes positions respectives que sur l'élément EP original.

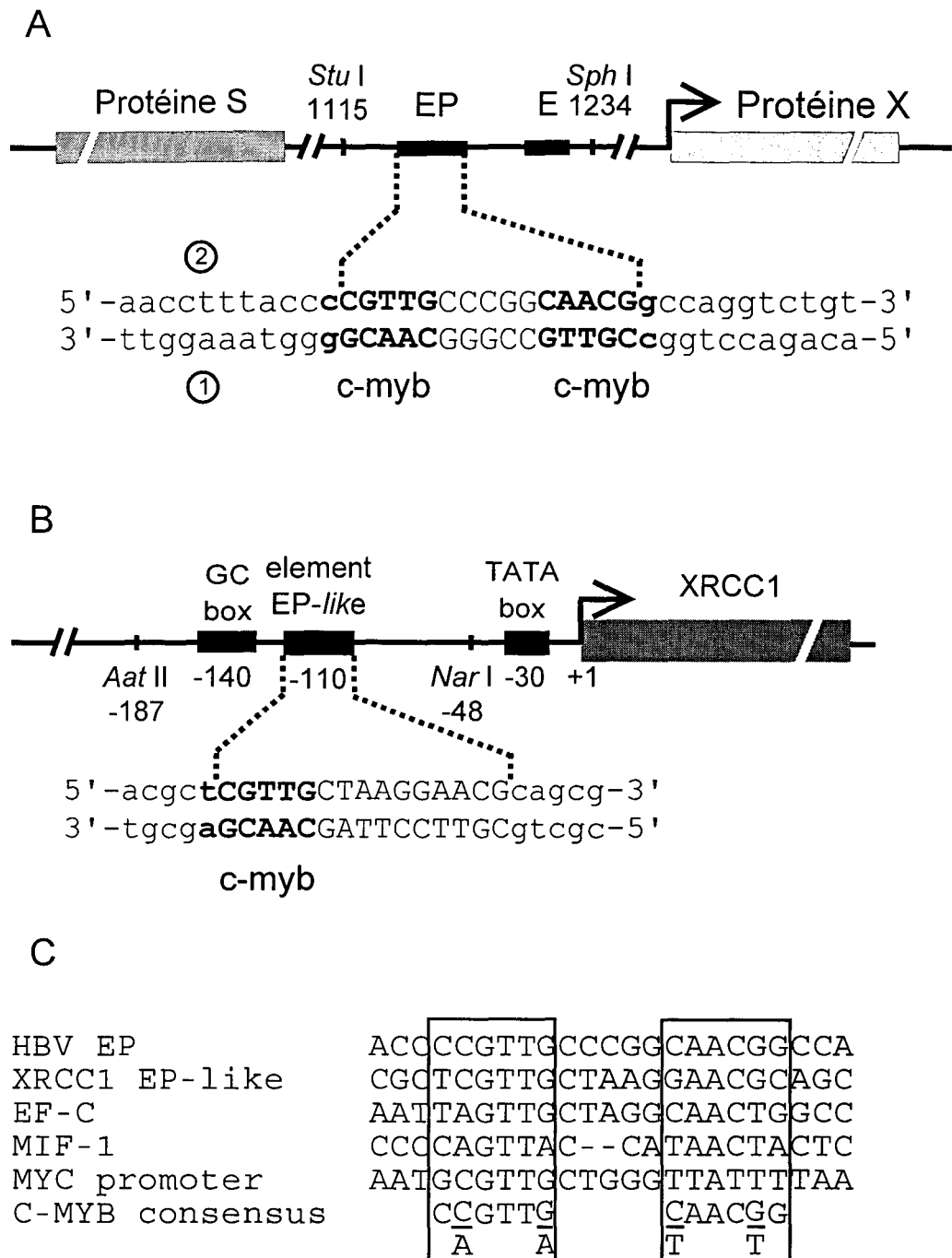


Figure R23 : Localisation des éléments EP et EP-like.

La partie A représente la séquence et la localisation de l'élément EP au sein de la séquence du virus HBV. Les sites *Sph*I et *Stu*I sont ceux utilisés pour le clonage de l'enhancer d'HBV dans le vecteur pBLCAT2. De même, la partie B montre la localisation de l'élément EP-like au sein du promoteur du gène *XRCC1*. Les alignements de séquences des différents sites homologues à EP et la localisation du site consensus pour c-Myb au sein de leur séquence sont présentés dans la partie C.

Nous avons donc entrepris d'identifier les protéines interagissant avec la séquence EP de HBV sachant que ce n'était pas la protéine c-Abl. Nous avons comparé la séquence EP avec celle des sites consensus de fixation pour des facteurs de transcription connus.

En tenant compte d'une base supplémentaire de chaque côté de l'élément EP, l'analyse a révélé la présence de deux sites consensus pour la protéine c-Myb : ${}^c/_T AAC^G/_T G$ (Figure R23A et R23C).

B. Vérification de l'expression de l'ARNm de c-myb dans une lignée hépatique

La protéine c-Myb est fortement exprimée dans les cellules hématopoïétiques et est donc présente dans les lignées sanguines potentiellement infectables par le virus HBV.

Nous avons d'abord voulu vérifier que le gène *c-myb* était effectivement activé dans les cellules hépatiques afin d'exprimer la protéine c-Myb. Nous avons testé la présence d'ARNm de *c-myb* dans la lignée humaine HepG2 issue d'un hépatocarcinome primaire. Les ARN totaux obtenus à partir de cette lignée ainsi que des lignées myéloïdes K562 et HL60 et de la lignée HeLa ont été soumis à une RT-PCR afin d'amplifier spécifiquement les séquences de l'ARN de *c-myb* et vérifier ainsi leur présence dans les différentes lignées. La rétrotranscription des ARNm en ADNc simple brin a été réalisée en utilisant des oligonucléotides spécifiques de l'ARN de *c-myb* ou de *c-abl* (utilisé ici comme témoin positif de RT-PCR). Une fraction du mélange est alors soumise à une PCR de 35 cycles en présence de couple d'oligonucléotides spécifiques de chaque ADNc.

La figure R24 montre l'amplification de l'ADNc de *c-myb*, après séparation des ampligènes sur gel d'agarose à 2 % et coloration du gel au BrEt. Comme attendu, les lignées hématopoïétiques montrent une forte expression de l'ARNm de *c-myb* (pistes 5 et 6) alors que les lignées HepG2 (piste 7) et HeLa (piste 4) présentent des taux d'ampligènes moins importants mais expriment quand même l'ARNm de *c-myb*. Les contrôles négatifs de RT-PCR (piste 3) et de PCR (piste 2) ne montrent pas d'amplification.

L'identité des ampligènes *c-myb* est vérifiée par digestion enzymatique au niveau des sites de restriction *Sma*I (position 637) et *Pvu*II (position 687) compris dans la séquence amplifiée de *c-myb*. Les produits de digestion sont séparés sur gel de polyacrylamide puis colorés au BrEt (résultat non montré). Le profil de digestion correspond exactement à la taille

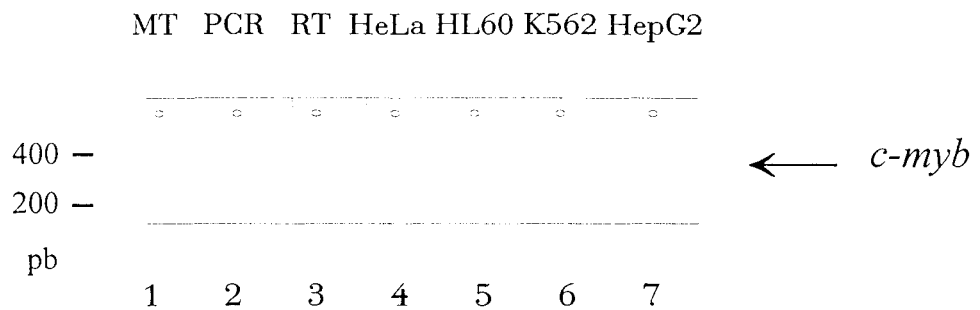


Figure R24 : Détection des ARNm de *c-myb*.

Les ARNm obtenus à partir des cellules HeLa, HL60, K562 et HepG2 sont soumis à une transcription inverse suivie d'une PCR avant d'être déposés dans les puits 4 à 7 d'un gel d'agarose à 2%. Les témoins de PCR et de *reverse transcription* sont déposés respectivement dans les pistes 2 et 3. Le marqueur de taille est visualisé dans la piste 1. La flèche indique la position de l'ampligène spécifique de *c-myb*.

des fragments d'ADN attendus, montrant que l'ampligène correspond bien aux séquences rétrotranscrites à partir de l'ARNm de *c-myb*.

Ainsi, les cellules de la lignée hépatique HepG2 expriment l'ARNm de *c-myb*. L'expression de c-Myb dans les deux lignées dans lesquelles est retrouvé le virus HBV suppose la possibilité d'une fonction commune de c-Myb dans l'infection par le virus HBV, peut-être via son interaction sur l'élément EP.

Nous avons donc vérifié, par retard en gel et empreinte à la DNase I, la réalité de la reconnaissance de l'élément EP par la protéine c-Myb, avant d'étudier son action sur l'élément EP dans la cellule par CAT *assays*.

C. Le domaine de liaison à l'ADN de c-Myb interagit avec l'élément EP

Le peptide R2R3 correspondant au domaine minimal de liaison à l'ADN, purifié après production en système bactérien, a été utilisé pour l'analyse de l'interaction de la protéine c-Myb avec l'ADN. Le fragment [*SphI-StuI*] de l'*enhancer* du virus HBV a été incubé avec le peptide R2R3 et les complexes sont séparés par retard en gel (Figure R25). Le peptide R2R3 forme ainsi un complexe retardé avec la sonde [*SphI-StuI*], montrant que le domaine de liaison à l'ADN de c-Myb interagit au niveau d'une séquence comprise dans ce fragment de l'*enhancer* d'HBV. Un oligonucléotide de 45 pb contenant l'élément EP montre la même interaction avec le peptide R2R3 (Figure R27A, piste 2). Des expériences de compétition par retard en gel ont alors été réalisées avec le peptide R2R3 complexé à la sonde oligonucléotidique *mim1A* (correspondant à un site fort d'interaction à l'ADN de la protéine c-Myb dans le promoteur du gène *mim1*). Ce complexe est déplacé par la sonde homologue *mim1A* non marquée mais aussi par la sonde EP de 45 pb (Figure R25). L'augmentation progressive de la quantité de compétiteur spécifique permet de montrer que l'affinité relative du peptide R2R3 pour l'oligonucléotide EP est 4 à 5 fois plus faible que pour l'oligonucléotide *mim1A*. Cette affinité demeure très forte et est donc en adéquation avec la possibilité d'une fonction physiologique de la protéine c-Myb sur l'*enhancer* HBV, via l'élément EP.

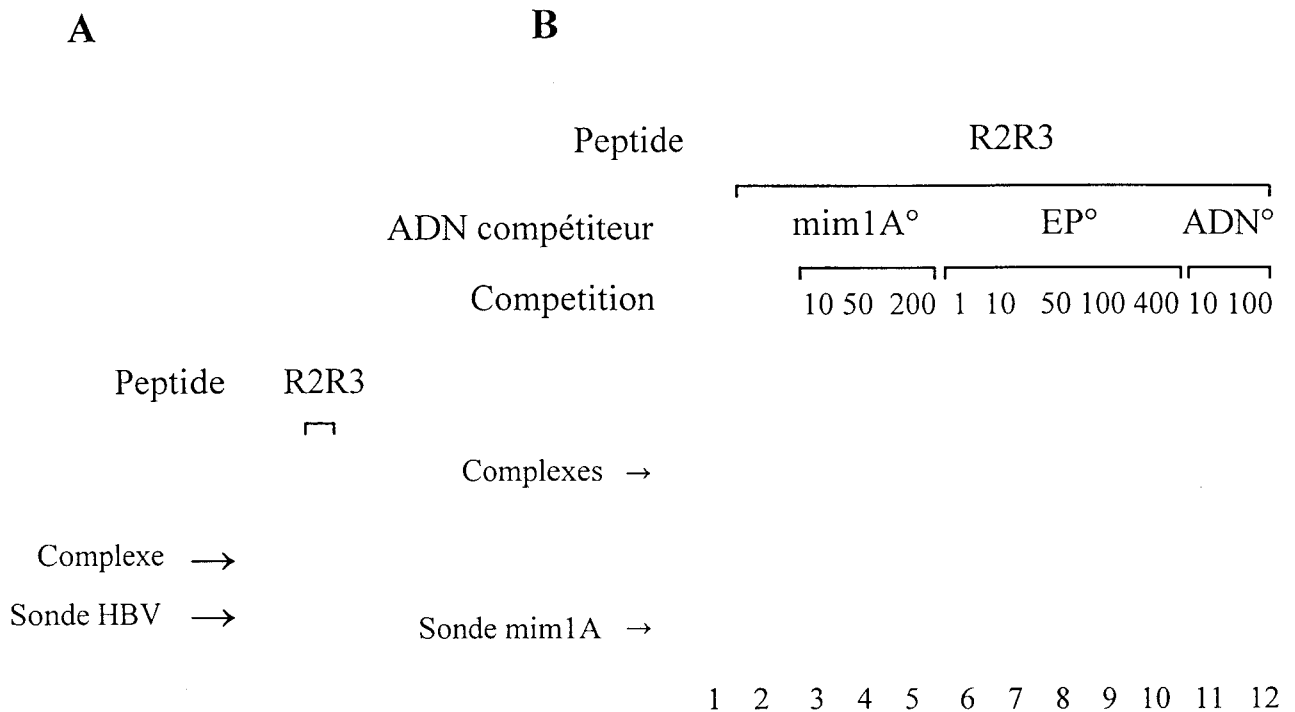


Figure R25 : Etude par retard en gel de l'interaction entre le peptide R2R3 et la séquence EP.

La partie **A** montre l'interaction spécifique du peptide R2R3 (4 ng) avec le fragment [*Stu*I-*Sph*I] de l'*enhancer* d'HBV (10.000 CPM) en présence de poly(dI-dC)(dI-dC) et de BSA. La partie **B** présente les expériences de compétition du complexe R2R3/mim1A par des concentrations croissantes d'oligonucléotides mim1A, EP ou d'ADN de sperme de hareng préalablement soumis aux ultra-sons et utilisé comme compétiteur non spécifique.

D. Reconnaissance d'un seul des deux sites consensus

L'expérience de retard en gel entre la sonde [*SphI-StuI*] et le peptide R2R3 ne révèle qu'un seul complexe (Figure R25, piste 2). Celui-ci semble correspondre à la fixation du peptide R2R3 de manière exclusive à l'un ou l'autre des deux sites potentiels de fixation sur l'élément EP, mais probablement pas à la fixation du peptide sur les deux sites en même temps puisque, dans ce dernier cas, l'expérience de retard en gel aurait dû révéler la présence de deux complexes retardés, correspondant l'un à la fixation d'une molécule de peptide R2R3 par molécule d'ADN, et l'autre à la fixation de deux molécules de peptide par oligonucléotide EP au niveau de chacun des deux sites potentiels de reconnaissance.

Afin de déterminer si la protéine c-Myb reconnaît indifféremment l'un ou l'autre des deux sites potentiels sur l'élément EP, des expériences d'empreinte à la DNase I ont été réalisées. Le fragment [*SphI-StuI*] de l'*enhancer* HBV a été marqué à l'une ou l'autre des extrémités avant d'être incubé ou non avec 0,4 µg de peptide R2R3 et soumis à une digestion modérée à la DNase I. La figure R26 révèle que le peptide R2R3 interagit au niveau d'une région correspondant à un site consensus de fixation pour c-Myb mais ne semble pas fixer l'autre site. Ce second site est celui reconnu par la protéine RFX1 quand celle-ci se fixe en monomère à la séquence EP (Siegrist *et al.*, 1993).

Nous avons alors utilisé une sonde oligonucléotidique EP de 45 pb mutée au niveau des bases AA du consensus reconnu (appelée EPm). Le peptide R2R3 ne donne alors pas de complexe retardé (Figure R27A, piste 4). Cependant, en augmentant fortement la quantité de peptide R2R3, un faible complexe apparaît, suggérant que l'interaction sur l'autre site peut avoir lieu mais avec une affinité très faible. La mutation du site reconnu par RFX1, qui chevauche le site consensus non reconnu par c-Myb, a été effectuée en parallèle. Cette mutation EP_{RFX1m} ne modifie pas la fixation du peptide R2R3 (résultat non montré).

L'ensemble de ces expériences suggèrent que la protéine c-Myb interagit fortement avec l'un des sites consensus. L'interaction très faible au niveau de l'autre site montre l'importance des bases adjacentes au site consensus déterminé pour la protéine c-Myb. Il faut par ailleurs noter que si les deux sites potentiels correspondent à la séquence consensus $C_{-1}AAC^G_{+1}G$, seul le site effectivement reconnu par c-Myb correspond à la séquence consensus

Figure R26 : Empreinte à la DNase I.

Les expériences d'empreinte à la DNase I du peptide R2R3 (0,4 µg) sur l'*enhancer* HBV (40.000 CPM) sont présentées dans la partie A. Les pistes 1, 2, 4 et 5 correspondent aux contrôles digérés par des concentrations différentes de DNase I, alors que les pistes 3 et 6 correspondent à l'incubation de l'ADN marqué sur l'un ou l'autre des deux brins d'ADN avec le peptide R2R3. La piste 7 correspond au G-track utilisé pour repérer la séquence. L'empreinte est représentée en caractère gras, les sites potentiels de reconnaissance par c-Myb en italique et la localisation de l'élément EP est représentée entre crochets. La partie B montre la localisation de l'empreinte (larges crochets) chevauchant l'un des sites potentiels de reconnaissance pour c-Myb (petits crochets et majuscules) au sein de l'élément EP (encadré).

élargie $C_{1/1}AAC^G_{1/1}GHH$ décrite par Weston (1992) alors que les deux résidus H (pour A, C ou T) sont remplacés par des résidus G pour le site de fixation au monomère RFX1.

E. Reconnaissance par la protéine c-Myb des éléments EP-like

La séquence EP de l'*enhancer* du virus HBV possède de grandes homologies de séquence avec d'autres éléments régulateurs tels que l'élément EF-C du virus du polyome, l'élément MIF-1 (pour *c-myc intron binding factor 1*), mais aussi avec un site EP-like du promoteur du gène humain *XRCC1* (pour *X-ray cross complementary 1*) à 70 pb en amont de la TATA-box et 15 pb en aval de la boîte GC (Figure R23B) (Thompson *et al.*, 1990 ; Caldecott *et al.*, 1992), ainsi qu'avec un autre site du promoteur de *c-myc*.

La comparaison de ces différents éléments au site consensus de c-Myb est présentée dans la figure R23C.

Ainsi, tous ces éléments, hormis celui du promoteur de *c-myc*, présentent une structure palindromique sur 5 à 7 pb, au niveau des séquences présentant des homologies avec le site consensus de fixation à l'ADN de c-Myb. Chacun de ces éléments a été testé par retard en gel pour sa capacité à interagir avec le peptide R2R3. La figure R27B montre que l'élément EP de l'*enhancer* du virus HBV est celui pour lequel le peptide R2R3 est le plus affiné (piste 5). Le peptide R2R3 reconnaît de manière moins forte l'élément EP-like du promoteur du gène *XRCC1* (avec une affinité 5 fois moindre que celle pour l'élément EP de HBV, pistes 6 et 7) mais beaucoup moins bien l'élément EF-C du virus du polyome (environ 30 à 50 fois moins, pistes 8 à 10), moins fortement encore l'élément EP-like du promoteur de *c-myc* (pistes 11 à 13) et quasiment pas l'élément MIF-1 (pistes 14 à 16).

Lorsqu'il y a interaction entre le peptide R2R3 et les éléments EP-like, un seul complexe est visualisé et a un niveau de migration semblable à celui formé entre le peptide R2R3 et l'élément EP de HBV (piste 5), suggérant cette fois encore qu'une seule fixation du peptide R2R3 n'est possible par molécule de ces éléments.

L'expérience d'empreinte à la DNase I sur le fragment compris entre les sites de restriction *AatII* (-187) et *NarI* (-48) du promoteur du gène *XRCC1* et contenant l'élément EP-like révèle que le peptide R2R3 ne reconnaît une nouvelle fois qu'un seul des deux sites consensus de fixation pour la protéine c-Myb (Figure R28 A et B).

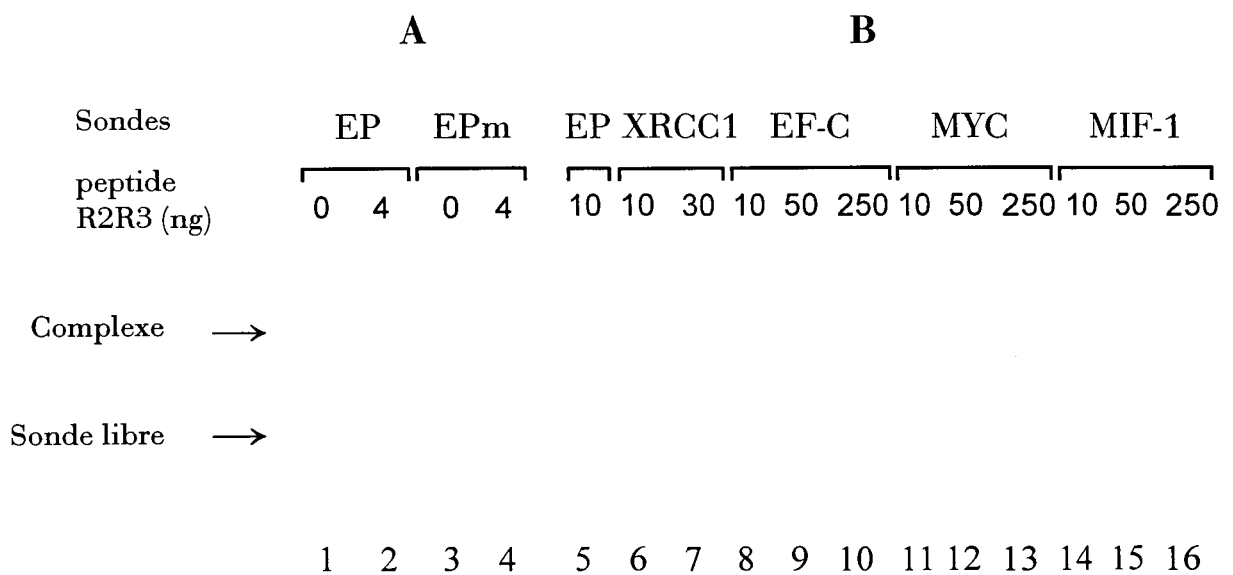


Figure R27 : Etude par retard en gel de l'interaction avec les éléments EP muté ou EP-like.

La partie **A** montre la formation d'un complexe entre R2R3 et la sonde EP (piste2) mais pas avec la sonde EP mutée (EP_m, piste 4) alors que la partie **B** présente les résultats obtenus avec des quantités croissantes de peptide R2R3 incubées avec les différents éléments homologues à EP.

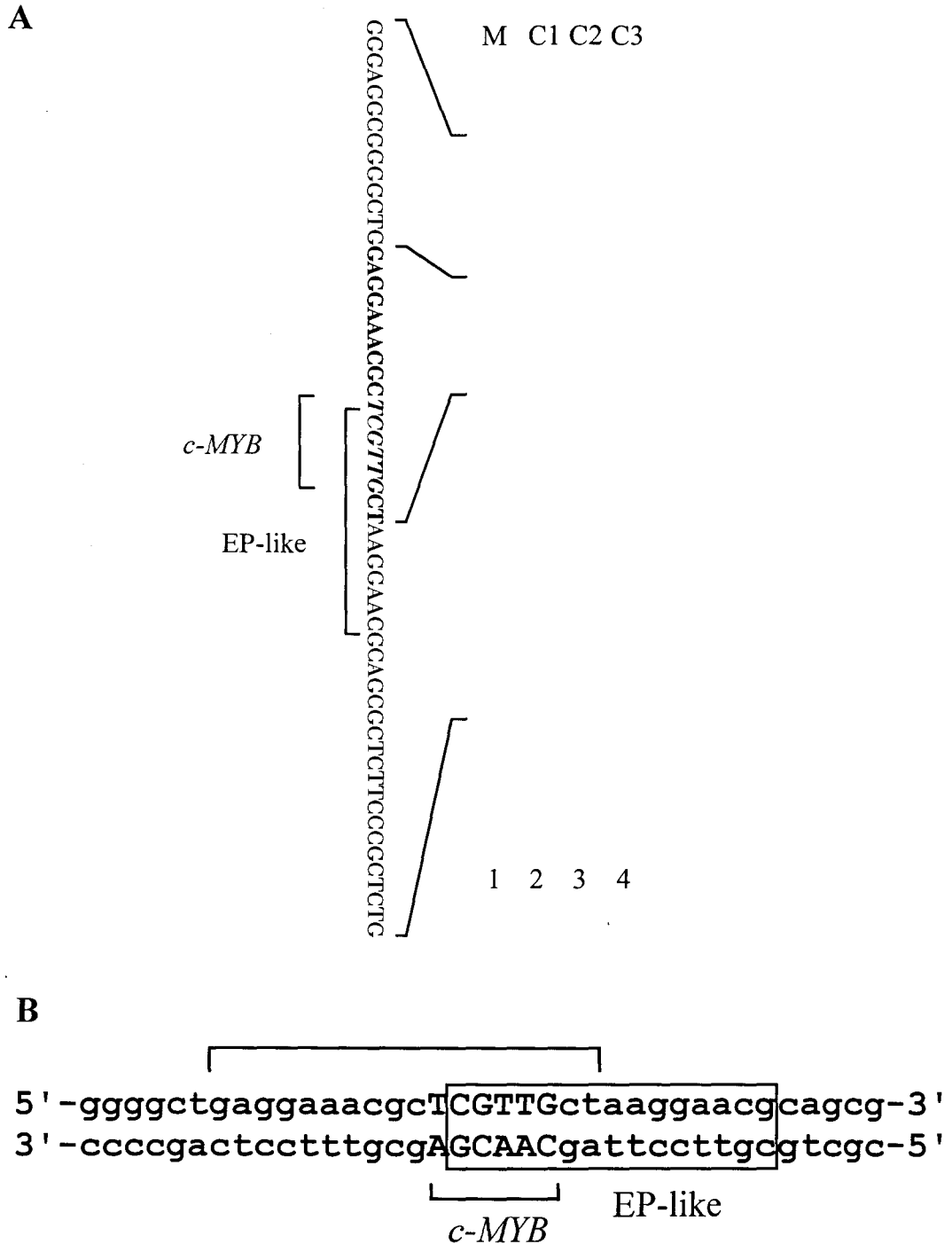


Figure R28 : Empreinte à la DNase I sur l'élément EP-like du gène XRCC1.

Les pistes 2, 3 et 4 de la partie A correspondent aux contrôles avec la BSA alors que la piste 1 présente le résultat de la digestion de la séquence d'ADN en présence du peptide R2R3 (0,4 µg). L'empreinte est représentée en caractère gras. La partie B montre la localisation de l'empreinte (large crochet) sur une partie de l'élément EP-like (encadré) de XRCC1 chevauchant le site consensus de fixation par c-Myb (caractères majuscules).

Ainsi, les deux éléments EP et EP-like de *XRCCI* sont reconnus par la protéine c-Myb que sur une moitié de l'élément, suggérant une fonction importante de la protéine c-Myb dans la régulation des éléments de type EP.

Il faut noter qu'aucun des deux sites potentiels de fixation de c-Myb dans l'élément EP-like de *XRCCI* ne correspond à la séquence consensus de reconnaissance de c-Myb mais qu'une mutation est présente dans chacun d'eux sans que cela ne gêne l'interaction du domaine de liaison à l'ADN de c-Myb avec sa cible déterminée par empreinte à la DNase I. Ainsi, le site de liaison de c-Myb ne peut pas être restreint au site consensus minimal $^c/_T AAC^G/_T G$ ni au site élargi de Weston $^c/_T AAC^G/_T GHH$ (1992) mais dépend certainement aussi du contexte global de la séquence d'ADN.

F. Etude de l'interaction entre la protéine c-Myb et l'élément EP par CAT assays

Afin de vérifier la fonctionnalité de la protéine c-Myb sur l'élément EP de l'*enhancer* du virus HBV, la technique de *CAT assays* a été utilisée (voir Matériel et Méthodes). Cette technique consiste à transfecter, de manière transitoire, des plasmides contenant le gène *reporter cat* placé sous le contrôle du promoteur minimal de la thymidine kinase et de séquences régulatrices à étudier. Ces vecteurs *reporter* peuvent être introduits seuls dans les cellules ou en même temps qu'un vecteur d'expression eucaryotique contenant l'ADNc codant la protéine d'intérêt dont l'action potentielle sur les éléments régulateurs introduits dans le vecteur *reporter* doit être testée. Ces différents vecteurs sont transfectés en utilisant la lipofectamine dans les lignées cellulaires adhérentes COS-7 et HepG2 mais sont introduits par électroporation dans les cellules hématopoïétiques K562.

La fonction activatrice de l'*enhancer* du virus HBV a tout d'abord été vérifiée. Pour cela, chacun des trois types cellulaires est transfecté avec soit le vecteur contrôle pBLCAT2, soit le vecteur pBLCAT-HBV ou soit le vecteur pBLCAT-HBV-EPm muté au niveau du site de fixation de la protéine c-Myb à l'élément EP (séquence GCAACG changée en GCGCGC comme préalablement testé par retard en gel dans la figure R27A). La figure R29A montre la compilation d'au moins trois expériences effectuées en double ou triple points dans chacune des lignées étudiées. La séquence de l'*enhancer* de HBV est activatrice de la transcription

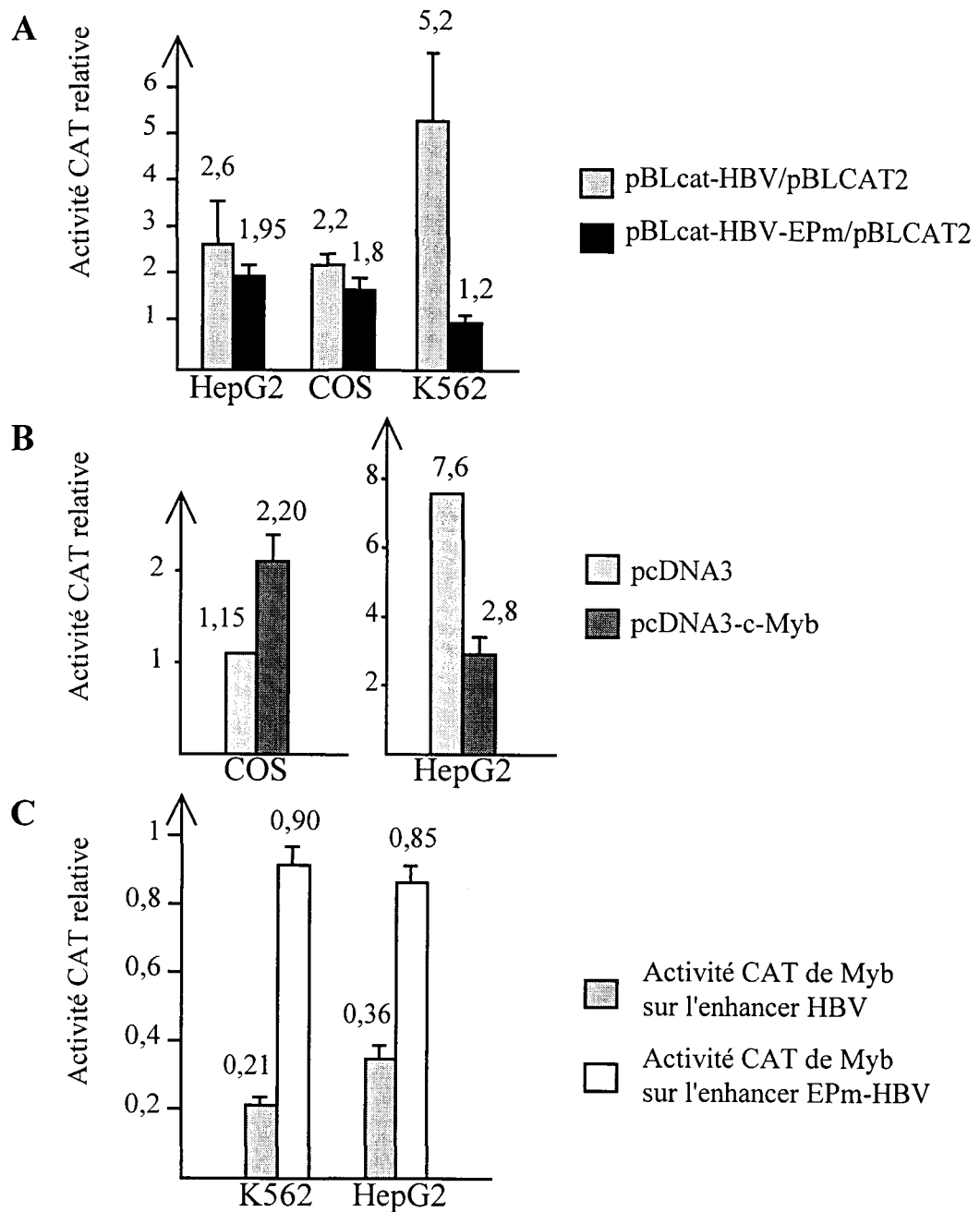


Figure R29 : Etude par CAT assays.

Les activités CAT relatives pour les différents types cellulaires sont présentées en ordonnée des différents graphes. Le graphe A montre la transactivation de l'enhancer d'HBV normal ou muté au niveau du site de reconnaissance par c-Myb au sein de l'élément EP. Les cellules COS et HepG2 sont transfectées en utilisant 2 µg de vecteur et 20 µL de lipofectamine alors que les cellules K562 sont électroporées en présence de 4 µg de vecteur. Le graphe B montre l'action de la protéine c-Myb sur l'enhancer d'HBV en utilisant les mêmes quantités de vecteurs *reporter* que précédemment et 4 µg de vecteurs d'expression. Le graphe C montre l'action de la protéine c-Myb sur l'enhancer d'HBV normal ou muté. Dans les cellules HepG2, 4 µg de vecteur d'expression sont transfectés en présence de 2 µg de vecteur *reporter* alors que les cellules K562 sont électroporées avec 8 µg de vecteurs d'expression et 4 µg de vecteurs *reporter*. Toutes les transfections sont réalisées en triple points et correspondent à la moyenne de 3 à 8 expériences indépendantes. La barre d'erreur représente les valeurs extrêmes.

dans chaque type cellulaire (jusqu'à 5,2 fois plus activatrice dans les cellules K562, par rapport au contrôle pBLCAT2). Le site précis de fixation à l'ADN de la protéine c-Myb participe à cette activation de l'*enhancer* puisqu'une diminution de l'activité transcriptionnelle est observée dans chacune des lignées lorsque le site de c-Myb est muté. Le rapport d'activation passe de 5,2 à 1,2 dans le cas des cellules K562, soit une inhibition quasi totale de la transactivation induite par l'*enhancer* d'HBV, suggérant que les deux bases mutées dans le vecteur pBLCAT-HBV-EPm sont essentielles à l'activité régulatrice de l'*enhancer* dans les cellules K562.

Nous avons ensuite co-transfecté les vecteurs d'expression contenant ou non l'ADNc du gène *c-myb* avec les vecteurs *reporter* testés. Les résultats des expériences de CAT *assays* sont présentés figure R29B et varient selon le type cellulaire transfecté. Ainsi, la protéine c-Myb active la transcription de l'*enhancer* HBV dans les cellules COS-7 (activation de la transcription d'un facteur 2,2 par rapport au vecteur vide pcDNA3 d'un facteur 1,15). Cependant, dans les cellules HepG2, la protéine c-Myb régule négativement la transcription d'un facteur 2,7 (2,8 par rapport à 7,6 pour le vecteur contrôle). Cette inhibition de la transcription à partir de l'*enhancer* HBV par la protéine c-Myb est également retrouvée lors des transfections dans la lignée K562, le rapport étant de 4,65 (Figure R30C).

Afin de déterminer si l'action inhibitrice de la protéine c-Myb sur l'*enhancer* HBV se fait directement via le site de fixation déterminé au sein de l'élément EP ou indirectement par action sur d'autres facteurs de transcription régulant l'*enhancer* HBV, des expériences de co-transfection ont été réalisées en utilisant le vecteur *reporter* pBLCAT-HBV-EPm et en comparant les résultats de l'action de la protéine c-Myb sur la transcription de celui-ci avec son action sur la transcription du vecteur pBLCAT-HBV, ceci à la fois dans la lignée hématopoïétique K562 et la lignée hépatique HepG2. La figure R29C montre les résultats obtenus dans trois expériences indépendantes effectuées en double ou triples points. La mutation du site de fixation pour la protéine c-Myb dans l'élément EP aboutit à la perte quasi totale de la fonction inhibitrice de c-Myb sur la transcription de l'*enhancer* HBV. Cette action de c-Myb sur l'inhibition de la transcription est donc due à une interaction directe de la protéine avec son site de liaison à l'ADN dans l'élément EP de l'*enhancer* HBV. L'inhibition résiduelle très faible (0,95 et 0,85 dans respectivement les lignées cellulaires K562 et HepG2) peut être expliquée par l'affinité très faible de la protéine c-Myb avec le second site consensus présent au sein de l'élément EP, comme déterminé précédemment par retard en gel.

G. Coopération entre les facteurs c-Myb et NF-M pour la régulation de l'enhancer HBV

Le fragment *SphI-StuI* cloné dans le vecteur pBLCAT-HBV contient, en plus de l'élément EP, d'autres éléments impliqués dans la régulation de l'enhancer HBV tel que l'élément E. Cet élément régule la transcription en coopération avec l'élément EP (Dikstein *et al.*, 1990a) et est reconnu par différents facteurs de transcription dont le facteur C/EBP β (Dikstein *et al.*, 1990b) et les facteurs c-Jun et CREB (Faktor *et al.*, 1990).

Le facteur C/EBP β a tout particulièrement retenu notre attention puisqu'il peut coopérer avec la protéine c-Myb pour réguler la transcription à partir des promoteurs du gène *mim1* (Burk *et al.*, 1993 ; Ness *et al.*, 1993 ; Kowenz-Leutz *et al.*, 1995 ; Mink *et al.*, 1996 ; Oelgeschläger *et al.*, 1995, 1996a), du gène du lysozyme (Ness *et al.*, 1993) ainsi que du gène de la *neutrophil elastase* (Oelgeschläger *et al.*, 1996b ; Nuchprayoon *et al.*, 1997).

Des expériences de CAT *assays* ont donc été réalisées avec des triples transfections de vecteur *reporter* pBLCAT-HBV ou pBLCAT2, de vecteur d'expression de la protéine c-Myb ou de son contrôle pcDNA3, ainsi que de vecteurs contenant l'ADNc de la protéine NF-M (l'homologue chez le poulet de la protéine C/EBP β , Katz *et al.*, 1993) dans son orientation sens exprimant la protéine ou anti-sens utilisé comme contrôle.

L'action de la protéine NF-M sur le fragment cloné de l'enhancer HBV a tout d'abord été testée par double transfection. Dans les trois lignées cellulaires étudiées, la protéine NF-M entraîne une inhibition de la transcription sur l'enhancer HBV, d'un facteur 1,5 dans les lignées HepG2 et COS-7 et d'un facteur 3,15 dans la lignée K562. Cette inhibition peut s'expliquer de différentes manières : (i) d'une part, la protéine utilisée est la protéine NF-M de poulet et non pas son homologue humain. Bien que ces deux protéines soient très homologues, il est possible que la protéine NF-M de poulet interagisse moins bien que la protéine humaine avec les facteurs du complexe transcriptionnel de base dans les lignées humaines HepG2 et K562, ou que son homologue simien dans la lignée COS-7. (ii) D'autre part, la transfection du vecteur codant la protéine NF-M entraîne une augmentation de la quantité totale de protéine de la famille de C/EBP β au sein de la cellule et cette protéine a été montrée pouvant interagir, de manière hiérarchique, avec trois éléments différents présents dans le fragment cloné de l'enhancer HBV (Dikstein *et al.*, 1990b). Ainsi, la protéine C/EBP β se fixe tout d'abord sur l'élément E, mais interagit aussi à plus forte concentration avec

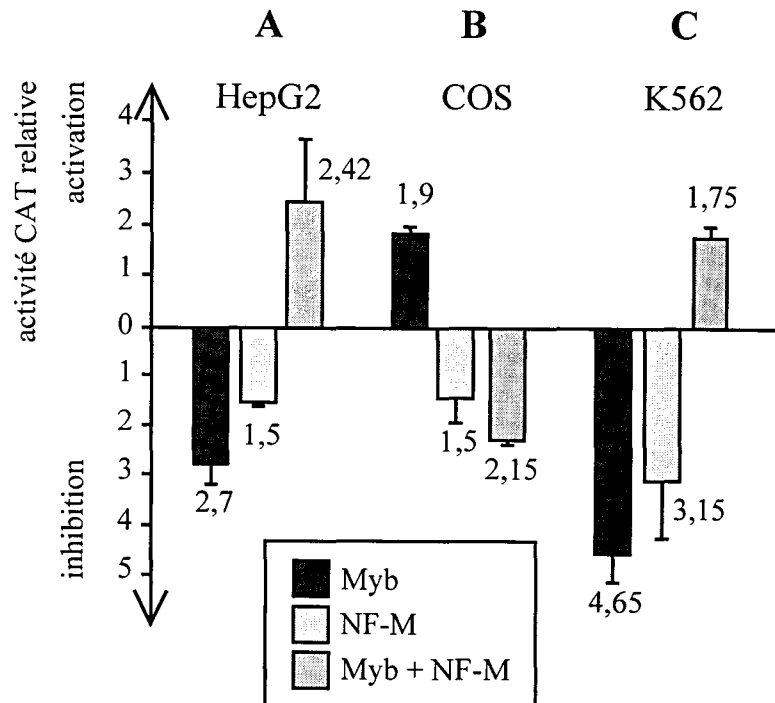


Figure R30 : Etude de la coopération entre c-Myb et NF-M pour la régulation de l'enhancer du virus HBV.

Les cellules HepG2 et COS sont transfectées par lipofection en présence de 2 μg de vecteur *reporter* et 4 μg de chaque vecteur d'expression alors que les cellules K562 sont électroporées avec respectivement 4 μg et 8 μg de ces vecteurs. Les diagrammes indiquent les activités CAT relatives des protéines c-Myb et NF-M exprimées seules ou ensemble (Myb + NF-M). Les expériences sont réalisées de trois à cinq fois en triple points. La barre d'erreur représente la variation entre les valeurs extrêmes.

l'élément NF-1b (site localisé entre les éléments E et EP dans l'*enhancer* HBV), de même que, à plus forte concentration encore, avec l'élément EP. La fixation à faible concentration sur le seul élément E aboutit à une activation de l'*enhancer* HBV, alors que la fixation de C/EBP β sur les sites de basse affinité NF-1b et EP permet de déplacer les protéines qui reconnaissent et régulent aussi ces éléments, aboutissant à une inhibition de la transcription à partir de l'*enhancer* HBV en empêchant la fonction normale des facteurs déplacés. Ainsi, les protéines C/EBP β cellulaires pourraient déjà être présentes en quantité suffisante pour saturer les éléments E. L'augmentation de la quantité de protéines, provoquée par la transfection du vecteur pcDNA3-NF-M sens, permettrait de saturer aussi les autres sites et d'induire alors l'inhibition de la transcription observée dans chacune des lignées.

Les expériences de triple transfection montrent une coopération entre les facteurs c-Myb et NF-M pour activer la transcription dans les cellules HepG2 et K562, alors que chacun de ces facteurs seul inhibait la transcription (Figure R30 A et C). Cet effet inverse dans la régulation de la transcription de l'*enhancer* HBV n'est pas observé dans la lignée cellulaire COS-7, où l'inhibition induite par la protéine NF-M ne semble pas être annihilée par l'activation induite par la protéine c-Myb seule (Figure R30 B). Une action synergique de ces deux facteurs pour l'activation de l'*enhancer* HBV est donc observée ici dans les deux types cellulaires potentiellement infectables par le virus de l'hépatite B. Cette synergie est semblable à celle préalablement observée par d'autres équipes pour l'activation des promoteurs des gènes *mim1*, du *lysozyme* et de la *neutrophil elastase*.

Le fait que cette coopération n'existe pas dans les cellules COS-7 suggère (i) que l'interaction entre c-Myb et NF-M n'est pas directe mais nécessite la participation d'un facteur supplémentaire pour permettre de joindre les deux protéines c-Myb et NF-M, ce facteur étant présent dans les lignées K562 et HepG2 mais pas dans la lignée COS-7 ; (ii) cependant une autre hypothèse serait que les protéines c-Myb et NF-M exogènes sont surexprimées dans les cellules COS-7 par rapport à leur expression dans les cellules HepG2 et K562, puisque les cellules COS-7 expriment l'antigène T du virus SV40 qui agit sur l'origine de réplication de SV40 présente dans les vecteurs d'expression dérivés du plasmide pcDNA3. Cette surexpression de c-Myb et NF-M pourrait être trop élevée pour autoriser une coopération entre ces deux facteurs comme l'ont déjà montré Burk *et al.* (1993).

Un facteur de pontage éventuel entre c-Myb et NF-M a été déterminé comme étant la protéine CBP pour la coopération entre les facteurs c-Myb et NF-M dans l'activation du

promoteur du gène *mim1* (Oelgeschläger *et al.*, 1996a). La présence de la protéine CBP complexée à la protéine c-Myb empêche l'action inhibitrice sur l'activité de liaison à l'ADN de c-Myb induite par phosphorylation par la caséine kinase II de différentes sérines présentes dans le domaine de liaison à l'ADN.

Le facteur de transcription GABP a également un rôle important dans la coopération entre c-Myb et C/EBP β pour l'activation du promoteur du gène de la *neutrophil elastase* (Nuchprayoon *et al.*, 1997).

La recherche du facteur intervenant dans la coopération de c-Myb et NF-M pour la régulation de l'*enhancer* HBV serait très important pour la compréhension du mécanisme d'activation observée dans les cellules hématopoïétiques K562 et hépatiques HepG2.

CONCLUSIONS-PERSPECTIVES

Lors de cette étude, nous avons pu montrer que l'élément EP de l'*enhancer* du virus HBV, s'il n'était pas reconnu par la protéine c-Abl, l'était par la protéine c-Myb. Nous avons montré la fixation du domaine de liaison à l'ADN de c-Myb sur une partie de l'élément EP au niveau d'un seul des deux sites consensus de fixation pour la protéine c-Myb (Figures R26 et R27). Ce même type de fixation sur un site du palindrome a été montré pour l'élément EP-like, localisé à proximité de la TATA-box du promoteur du gène *XRCC1* humain (Figure R28). Le rôle de cet élément pour la transcription à partir du promoteur de *XRCC1* reste inconnu et il serait intéressant d'en étudier l'importance par *CAT assays* et de montrer le rôle de la protéine c-Myb sur la transcription du gène *XRCC1*. Le domaine de liaison à l'ADN de c-Myb semble également interagir avec d'autres éléments homologues à EP, suggérant un rôle général de c-Myb dans la régulation de ces éléments de type EP (Figure R27B). Il faut noter que le site reconnu par le domaine de liaison à l'ADN de c-Myb dans l'élément EP correspond au site consensus YAACKGHH défini par Weston (1992) (où Y=C/T, K=G/T et H=A/C/T) alors que celui qui n'est pas reconnu contient deux bases G à la place des deux bases H. Cependant, le site reconnu dans l'élément EP-like de *XRCC1* ne correspond pas à ce consensus décrit par Weston puisqu'il contient un dinucléotide CT à la place du dinucléotide DC dans la séquence réciproque DDCMGTTR (où D=A/G/T, M=C/A et R=A/G). Ainsi, la fixation de la protéine c-Myb ne se limite pas à la reconnaissance de sa séquence consensus stricte, même élargie au consensus défini par Weston (1992). La fixation nécessite toujours le motif central AAC/GTT (position 2 à 4) et la base G/T (en position 6) alors que les bases adjacentes sont plus variables et dépendent d'un contexte global de la séquence d'ADN.

Nous avons également montré que la protéine c-Myb coopérait avec le facteur de transcription NF-M interagissant avec l'élément E de l'*enhancer* HBV, à la fois dans la lignée hépatique HepG2 et la lignée hématopoïétique K562. Cette coopération pourrait avoir un rôle crucial pour la régulation de l'expression du virus dans le foie et les cellules du sang qui servent de réservoir au virus et facilitent sa transmission entre individus (Romet-Lemonne *et al.*, 1983). Il serait intéressant de déterminer quel co-facteur agit dans cette coopération et de quelle manière l'élément EP coopère avec l'élément GB de l'*enhancer* HBV.

La recherche de la séquence cible spécifique de la protéine c-Abl nous a tout d'abord amené à délimiter son domaine d'interaction à l'ADN (Figure R1). Celui-ci chevauche le domaine de liaison à l'ADN déterminé chez la protéine c-Abl de souris par Kipreos *et al.* (1992). Les études par différentes techniques ont montré que le domaine de liaison à l'ADN

de la protéine c-Abl humaine reconnaît à la fois une séquence consensus de fixation contenant un motif central AAC (Tableau I) et des structures tordues de l'ADN (Figures R7 et R8) et que ces deux types de fixation dépendent probablement de deux parties relativement indépendantes au sein du domaine de liaison à l'ADN délimité. Les expériences de délimitation du domaine de liaison à l'ADN, via l'interaction à la DNA-cellulose, ne nous ont pas permis de réduire à un domaine plus petit la partie de la protéine responsable de l'interaction aux séquences de l'ADN. Ceci suggère que les domaines interagissant spécifiquement avec certaines séquences ou structures de l'ADN se chevauchent et que les interactions dépendent de la reconnaissance spécifique de certains acides aminés pour des structures tordues de l'ADN alors que d'autres acides aminés sont responsables de la reconnaissance spécifique de la séquence nucléotidique. Nous avons également déstabilisé une à une chacune des trois hélices alpha potentielles du domaine de liaison à l'ADN par mutation ponctuelle de certains acides aminés des hélices. Cependant, chacun des mutants a montré une même capacité de rétention sur les billes de DNA-cellulose que la protéine normale, suggérant que ces acides aminés et l'organisation des hélices n'ont pas un rôle déterminant dans l'interaction à l'ADN linéaire.

Le site consensus de liaison à l'ADN $A^A/cAACAA^A/c$ de la protéine humaine diffère de celui identifié pour la protéine c-Abl de souris comme étant une séquence riche en paires de bases A ou T sans préférence pour une succession particulière de pb (Miao and Wang, 1996). Il faut noter que la cible de la protéine c-Abl murine a été identifiée en utilisant des extraits cellulaires totaux incubés avec un mélange d'oligonucléotides contenant une séquence centrale de paires de bases aléatoires. Les oligonucléotides complexés à la protéine c-Abl murine ont ensuite été récupérés par un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine c-Abl murine fixé à une colonne. Il est donc possible que les oligonucléotides sélectionnés le soient par leur forte affinité pour une protéine interagissant avec la protéine c-Abl, empêchant la sélection préférentielle des séquences réellement reconnues par le domaine de liaison à l'ADN de c-Abl murin. En utilisant une protéine correspondant au domaine de liaison à l'ADN de la protéine c-Abl murine produite en bactérie ou en baculovirus, les auteurs ont vérifié que la protéine c-Abl murine reconnaissait les différentes séquences cibles directement mais il reste possible que, si une interaction est effectivement observée, les séquences reconnues ne soient pas les plus affines pour le domaine de liaison à l'ADN de c-Abl. Dans nos expériences, nous avons opté pour la production d'une protéine purifiable afin d'éviter les formations de

complexes protéiques lors du *CASTing*. La protéine c-Abl humaine entière étant trop grande pour être exprimée correctement en bactérie, nous avons utilisé le domaine de liaison à l'ADN seul mais il est également possible que le fait d'utiliser un domaine isolé de la protéine ne permette pas d'obtenir le même consensus de fixation qu'avec la protéine entière. Il serait donc judicieux d'utiliser un autre mode d'expression de la protéine c-Abl pour obtenir une protéine purifiable en grande quantité. Nous avons tenté de produire la protéine c-Abl humaine entière en baculovirus mais la recombinaison homologue entre le vecteur exprimant la protéine et l'ADN viral n'a pas eu lieu, peut-être à cause d'un problème de toxicité de la protéine pour les cellules d'insecte. Une autre hypothèse expliquant la différence de séquence cible des protéines c-Abl humaine et murine pourrait être que leurs domaines de liaison à l'ADN ne reconnaissent pas les mêmes séquences, ce qui ne peut être exclu puisque ces domaines ne correspondent pas à ceux les plus homologues parmi les différents domaines fonctionnels de c-Abl, suggérant que ce domaine puisse avoir une plus grande variété fonctionnelle. Pour répondre à cette question, la production du domaine de liaison à l'ADN de c-Abl murin en bactérie serait indispensable pour vérifier sa capacité d'interaction préférentielle avec des séquences riches en paires de bases A ou T ou avec la séquence consensus définie pour la protéine c-Abl humaine.

Nous avons montré par différentes techniques que le domaine de liaison à l'ADN de la protéine c-Abl humaine interagissait avec sa séquence cible par le petit sillon de la double hélice (Figures R5) mais n'était pas capable de tordre cette séquence (Figures R11, R12 et R13), contrairement à de nombreuses autres protéines interagissant via le petit sillon telles que les protéines SRY, HMG1, LEF-1, PurR et TBP (Lee *et al.*, 1991 ; Kim *et al.*, 1993a, 1993b ; Read *et al.*, 1994 ; Schumacher *et al.*, 1994 ; van de Wetering and Clevers, 1992 ; Sauer, 1995 ; Sheridan *et al.*, 1995 ; Travers, 1995). Il est toutefois possible que la torsion de l'ADN nécessite la participation des autres parties de la protéine pour obtenir une conformation spatiale totalement fonctionnelle du domaine d'interaction à l'ADN. Toutefois, des études complémentaires de mise en évidence de la séparation des brins d'ADN en présence de quantités croissantes de protéine GST-NX-HIS suggèrent que le mode d'action du domaine de liaison à l'ADN serait de déstabiliser la double hélice d'ADN (Figure R14). Cette dénaturation de l'ADN par la protéine GST-NX-HIS permet d'expliquer comment celle-ci empêche la circularisation de longs fragments d'ADN pouvant former des cercles en l'absence de la protéine. En effet, la séparation des deux brins sur une certaine distance autorise le

rapprochement des deux parties non séparées aboutissant à un fragment raccourci en longueur (donc trop court pour se circulariser) et dont les deux brins désappariés, interagissant avec la protéine, gêneraient la torsion des deux parties appariées qui aurait pu compenser le raccourcissement du fragment d'ADN. Cette capacité de séparation permet également d'expliquer la plus faible affinité de la protéine GST-NX-HIS pour des fragments d'ADN courts par rapport à des séquences plus longues observée par retard en gel et dans les séquences sélectionnées par *CASTing*. En effet, la double hélice des fragments d'ADN courts serait complètement déstabilisée par le domaine de liaison à l'ADN de c-Abl qui interagit avec une très faible affinité avec de l'ADN simple brin ayant les séquences GTT (Figure R9). Il serait également crucial de déterminer la distance sur laquelle s'opère cette déstabilisation de la double hélice d'ADN. D'un point de vue structural, des expériences de cristallographie et de RMN permettraient de répondre à de nombreuses questions concernant le mode d'interaction du domaine de liaison à l'ADN avec sa séquence cible consensus ou avec des structures tordues de l'ADN, notamment la détermination des acides aminés impliqués dans chacune de ces reconnaissances de même que l'action de la protéine sur l'ADN que ce soient les modifications de la structure de l'ADN ou de l'agencement tridimensionnel du domaine de liaison à l'ADN lorsqu'il est complexé à sa séquence cible.

Miao et Wang (1996) avaient suggéré que la protéine c-Abl murine serait apparentée aux protéines de la famille HMG1, sur la base de la comparaison de leur séquence cible de fixation, de leur capacité à interagir avec des oligonucléotides contenant une large boucle non appariée et de leur séquence protéique montrant que le domaine de liaison à l'ADN de c-Abl murin contient potentiellement trois domaines de type HMG-*box*. Toutefois, l'ensemble de nos résultats tendent à montrer que c-Abl ne serait pas une protéine de la famille HMG. En effet, les alignements des séquences d'acides aminés de différents domaines HMG-*box* avec le domaine de liaison à l'ADN de c-Abl n'ont pas révélé d'homologie significative. En effet, ce dernier ne contient pas de résidu tryptophane et tyrosine conservé ni les résidus proline, et thréonine retrouvés dans certaines successions d'acides aminés importants dans les comparaisons de séquence protéique de différents domaines HMG-*box* des membres de la famille HMG1 (Figure M2). Il ne contient pas non plus la séquence SPKK typique des protéines HMG-I(Y) et n'a pas d'homologie avec les domaines d'interaction à l'ADN des protéines HMG-14/17. De plus, la structure secondaire potentielle des domaines HMG-*box* révèle la présence de larges hélices alpha, très différentes des petites hélices alpha séparées de

feuillet bêta de la structure secondaire potentielle du domaine de liaison à l'ADN de c-Abl (Figure R2). D'autre part, la séquence du domaine de liaison à l'ADN de c-Abl ne contient pas de motifs répétés homologues entre eux pouvant suggérer la redondance de trois domaines homologues comme décrits par Miao et Wang (1996). Ainsi, au niveau structural, il semble peu probable que la protéine c-Abl puisse être assimilée à une protéine HMG.

Au niveau fonctionnel, le domaine de liaison à l'ADN de c-Abl possède, tout comme les protéines *HMG-like* de type SRY, la capacité de reconnaître des séquences consensus ayant un même motif central par une fixation via le petit sillon de l'ADN et d'interagir avec des structures tordues de l'ADN. Cependant, c-Abl ne peut pas tordre sa séquence cible et semble avoir pour fonction de séparer les deux brins de l'ADN, fonction radicalement différente de celle commune aux protéines HMG. Elle n'interagit pas avec une forte affinité avec de l'ADN simple brin contrairement aux protéines HMG1/2 (Isackson *et al.*, 1979).

L'ensemble de ces résultats nous amènent donc à ne pas considérer la protéine c-Abl comme un membre de la super-famille des protéines HMG.

Par ailleurs, d'autres expériences de retard en gel ont montré que la présence du domaine de liaison à l'ADN de c-Abl augmente la capacité d'interaction à l'ADN de la protéine HMG-D100. Ceci peut être expliqué par la capacité de la protéine c-Abl à séparer les deux brins de la double hélice d'ADN. La protéine HMG-D100 pourrait dans ce cas interagir avec la structure tordue correspondant à l'endroit de l'ouverture de l'ADN ou avec de l'ADN simple brin pour lesquels elle a une affinité plus forte que pour de l'ADN linéaire double brin.

Ainsi, par l'intermédiaire à la fois de son domaine de liaison à l'ADN et de son domaine tyrosine kinase, la protéine c-Abl pourrait avoir un rôle dans différents mécanismes cellulaires. Tout d'abord, la protéine c-Abl est pressentie comme ayant un rôle dans la régulation de la transcription de différents gènes de par sa capacité à interagir avec l'ADN de manière spécifique de la séquence ou de la structure et à se localiser ainsi à proximité de l'ARN polymérase II dont elle phosphoryle les résidus tyrosine au niveau du domaine C-terminal de la sous-unité RBP2 (Baskaran *et al.*, 1993 ; 1996 ; Duyster *et al.*, 1995). Le rôle exact de cette phosphorylation reste inconnu. Elle pourrait agir en stimulant ou en inhibant la transcription. Des séquences contenant le motif AAC répété sont retrouvées dans les régions inter-géniques du gène du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I où elles ont un rôle d'inhibiteur de la transcription (Ozawa *et al.*, 1993 ; Tang *et al.*, 1995). Il serait

intéressant de tester la possibilité des protéines c-Abl humaine et murine de reconnaître ces séquences et de déterminer si elles sont responsables de cette inhibition de la transcription.

La protéine c-Abl a également un rôle dans la réparation de l'ADN via son interaction avec le complexe DNA-PK/Ku qui reconnaît les extrémités cassées de l'ADN ou via la protéine ATM. La capacité de la protéine c-Abl à reconnaître des séquences tordues de l'ADN telles que des séquences ouvertes de type *bubble* (rencontrées lors des mésappariements de l'ADN) ou de type jonction quatre-brins (rencontrées lors des recombinaisons générant les translocations) pourrait également être indispensable au mécanisme général de réparation de l'ADN. Toutefois, des souris invalidées pour le gène *c-abl* ont un développement embryonnaire normal hormis dans les lignées B et T (Schwartzberg *et al.*, 1991), suggérant que la protéine c-Abl n'a pas de rôle crucial dans la réparation de l'ADN même si elle y participe. Il est cependant possible que l'absence de protéine c-Abl dans ces souris soit compensé par une fonction redondante réalisée par une autre protéine comme la protéine Arg homologue de c-Abl (Kruh *et al.*, 1990). Il serait intéressant d'étudier s'il existe également un domaine de liaison à l'ADN dans la partie C-terminale de la protéine Arg et de déterminer ces modalités d'interaction à l'ADN. La protéine c-Abl pourrait ainsi participer au couplage entre les événements de transcription et de réparation de l'ADN.

Un autre mécanisme cellulaire crucial pour la cellule pourrait impliquer la protéine c-Abl. En effet, celle-ci pourrait être importante pour la réplication de l'ADN de par sa capacité à interagir avec des séquences tordues correspondant à la fourche de réplication (jonction à trois brins ou ADN ouvert en forme de bulle) et de par sa capacité à ouvrir la double hélice d'ADN à la manière des hélicases. Toutefois, aucune homologie de séquence n'a été retrouvée entre le domaine de liaison à l'ADN de c-Abl et celui des hélicases et le mode d'action semble différent puisque les hélicases agissent en présence d'ATP contrairement au domaine de liaison à l'ADN de c-Abl.

Enfin, la protéine c-Abl pourrait avoir un rôle de régulateur de la décompaction de l'ADN. D'une part, le domaine de liaison à l'ADN de c-Abl est actif pendant l'interphase mais est inactivé pendant la mitose par la cdc2 kinase comme celui de la protéine HMG1 et, d'autre part, nous avons montré que la protéine c-Abl semble augmenter la capacité de la protéine HMG-D100, homologue de HMG1 chez la *Drosophile* déléetée de la partie C-terminale de régulation négative, à interagir avec l'ADN (Payet and Travers, 1997). Les protéines de la famille HMG1/2 ont la capacité de déplacer les histones et de décompacter

ainsi l'ADN et c-Abl pourrait ainsi participer indirectement à la décompaction des chromosomes pendant l'interphase du cycle cellulaire. Une action directe via sa capacité à ouvrir la double hélice peut également être envisagée. Il serait intéressant de vérifier l'existence ou non de ces actions directes ou indirectes sur la décompaction de la chromatine en incubant la protéine GST-NX-HIS avec des nucléosomes reconstitués comme réalisé pour d'autres protéines tels que la protéine GAGA (Tsukiyama *et al.*, 1994 ; Tsukiyama and Wu, 1995), le complexe SWI/SNF chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Östlund Farrants *et al.*, 1997) et des protéines contenant un domaine de type *AT-hook* (Strick and Laemmli, 1995). Cette fonction de décompaction de la chromatine par c-Abl pourrait avoir un rôle important pour la réparation de l'ADN médiée par les protéines DNA-PK et Ku.

Dans la Leucémie Myéloïde Chronique, la formation du gène hybride *bcr-abl* ne laisse qu'un seul gène *c-abl* normal. Il serait intéressant de déterminer l'importance de la perte d'un allèle normal sur l'expression de la protéine c-Abl normale et donc les conséquences que cette diminution pourrait avoir sur l'évolution plus ou moins rapide de la maladie, notamment au travers de son rôle potentiel sur la réparation de l'ADN.

MATERIEL ET METHODES

I. Clonage, purification et analyse de l'ADN plasmidique

A. Séparation de l'ADN en électrophorèse

1. Préparation d'ADN en gel d'agarose

a. *Electrophorèse en gel d'agarose*

Le gel d'agarose est utilisé pour séparer, en migration horizontale et selon leur masse moléculaire, des fragments d'ADN linéaires de 200 pb à 50 kb. Selon la taille des fragments à séparer, la concentration en agarose du gel varie de 0,5 à 3 % (P/V) dans le tampon de migration TBE (Tris-HCl 135 mM ; acide borique 45 mM ; EDTA 2,5 mM ; pH 8,3) additionné de bromure d'éthidium (BrEt à 0,5 µg/mL). L'ADN à analyser est mélangé à une solution de BBΦ (Bleu de Bromophénol 0,25 % ; saccharose 40 % ; EDTA 1 mM ; pH 8,0), déposé dans les puits du gel et soumis à une migration sous une tension de 90 V durant 2 à 3 h dans le tampon TBE. L'ADN est ensuite visualisé grâce au BrEt, intercalant de l'ADN fluorescent sous UV (366 nm).

b. *Purification des fragments séparés en gel d'agarose*

→ Les fragments d'ADN de taille supérieure à 500 pb sont élués du gel par la technique du GeneClean II Kit (BIO 101 Inc). La partie du gel contenant le fragment d'ADN à récupérer est excisée sous UV, pesée pour en estimer le volume puis dissoute dans un tube Eppendorf par addition de 0,5 volume de solution saline TBE *modifier* et de 4,5 volumes de solution NaI et incubation 5 mn à 50°C. Après dissolution complète de l'agarose, l'ADN est capté par addition des billes de silice de la suspension *GLASSMILK* (5µL de suspension au minimum + 2 µL pour chaque microgramme supérieur à 5µg d'ADN à purifier) et incubation 15 mn dans la glace. Les billes sont ensuite lavées par trois fois 1 mL de solution de lavage *NEW WASH* et centrifugées pour éliminer le surnageant. Le culot est alors repris volume/volume par de l'eau déminéralisée et l'ADN est élué par incubation 10 mn à 50°C avant centrifugation 30 secondes à 5 500 g.

→ Les fragments d'ADN de taille comprise entre 200 et 500 pb sont quant à eux récupérés par insertion d'une membrane de DEAE-cellulose en aval de la bande d'ADN à

recupérer et migration à 90 V jusqu'à ce que le fragment soit transféré sur la membrane (15 mn). L'ADN adsorbé est élué de la membrane par incubation 15 mn à 68°C dans 400 µL de solution saline (NaCl 1,5 M ; Tris-HCl 20 mM pH 7,5 ; EDTA 1 mM). Il est précipité par 2,5 volumes d'éthanol absolu, centrifugé 15 mn à 12 000 g, rincé à l'éthanol 70 % et séché sous vide avant d'être repris dans 30 µL de TE (Tris-HCl 10 mM ; EDTA 1 mM ; pH 8,0) avant d'être dialysé sur microfiltre (porosité 0,025 µm, MILLIPORE) contre du TE.

2. Préparation d'ADN en gel de polyacrylamide

a. Electrophorèse en gel de polyacrylamide non dénaturant

Il est utilisé pour séparer, en migration verticale, des petits fragments d'ADN de 10 à 300 pb. Sa concentration varie de 3,5 à 20 % selon la taille des fragments à séparer. Le mélange acrylamide/bisacrylamide (29/1) est polymérisé dans le tampon TBE en présence de 0,1 % de TEMED et 0,1 % de persulfate d'ammonium. L'ADN est mélangé à la solution de BBΦ contenant du xylène cyanol (0,005 %) avant d'être soumis à une électrophorèse de 16 h à 30 V sous tampon TBE. L'ADN est ensuite visualisé sous UV après coloration du gel dans un bain de TBE contenant 0,5 µg/mL de BrEt.

b. Purification des fragments d'ADN séparés en gel de polyacrylamide

La partie du gel de polyacrylamide est excisée sous UV puis déposée avec une membrane de DEAE-cellulose dans le puits d'un gel d'agarose. L'ADN est alors élué comme précédemment décrit.

L'ADN peut également être élué du gel de polyacrylamide par broyage à sec de ce dernier à l'aide d'une baguette de verre et incubation dans du TE pendant 2 h à une nuit à 37°C. Après filtration par centrifugation dans un tube SPIN-X (filtre 0,22 µm, Costar), l'ADN est précipité à l'éthanol, rincé à l'éthanol 70 %, séché et repris dans un volume adéquat de TE.

B. Clonage moléculaire

1. Vecteurs de clonage

a. Vecteurs commercialisés

→ pBSIIISK+ (Stratagene) est le vecteur utilisé pour le clonage des ampligènes de PCR issus du *CASTing*. Ce phagemide contient un site multiple de clonage interrompant la portion du gène *Lac Z* et permettant l' α -complémentation. Ceci permet en théorie une sélection aisée par leur couleur des clones ayant intégré l'insert. Ce vecteur contient aussi, de part et d'autre de son large *polylinker*, les séquences complémentaires des *primers* T3, T7, M13 *forward* et M13 *reverse* permettant de séquencer les ampligènes clonés dans le site multiple de clonage.

→ pSELECTTM (Promega) : ce phagemide est utilisé pour la mutagenèse dirigée. Il contient entre autre un site multiple de clonage à l'intérieur des séquences codantes du gène exprimant le peptide α , permettant par α -complémentation d'obtenir une activité β -galactosidase fonctionnelle. Il contient également l'origine de répllication du phage f1 (pour la production, avec l'aide des phages *helper* R108 ou M13KO7, de l'ADN simple brin) ainsi que le gène de résistance à la tétracycline ainsi que celui de résistance à l'ampicilline mais rendu non fonctionnel par mutation ponctuelle.

→ pBLCAT2 (Luchow et Schutz, 1987). Ce vecteur contient le gène *cat* (Chloramphenicol Acetyl Transferase) sous le contrôle du promoteur basal du gène de la *thymidine kinase (tk)* du virus de l'herpès. Il est utilisé dans les expériences de co-transfections en cellules eucaryotes afin d'étudier les fonctions régulatrices de différentes protéines sur des séquences placées en amont du promoteur *tk* (voir figure M1).

→ pcDNA3 (InVitrogen) est le vecteur d'expression eucaryotique utilisé dans les études de co-transfection et pour l'expression de protéines en lysat de réticulocyte. Il contient les séquences du promoteur précoce du Cytomégalo virus (CMV) ainsi qu'un signal de polyadénylation (Figure M1).

→ Les plasmides pTRC-99A (Pharmacia Biotech), pALTER-EX1 (Promega), pGEX-3X et pGEX-2T (Pharmacia Biotech) sont utilisés pour la production de protéines en bactérie. Les séquences codantes sont insérées dans le site multiple de clonage placé en aval d'un site d'initiation de transcription et de séquences promotrices inductibles par l'IPTG. Le vecteur pGEX-2T ou pGEX-3X permet d'obtenir une protéine de fusion contenant en N-terminal les séquences GST (Glutathione-S-transférase). Ce peptide GST permet de purifier la protéine de fusion sur la base de son affinité pour des molécules de glutathion fixées de manière covalente à des billes de sépharose. Le vecteur pALTER-EX1 est également utilisé pour la production de protéines en lysat de réticulocyte.

b. Vecteurs dérivés

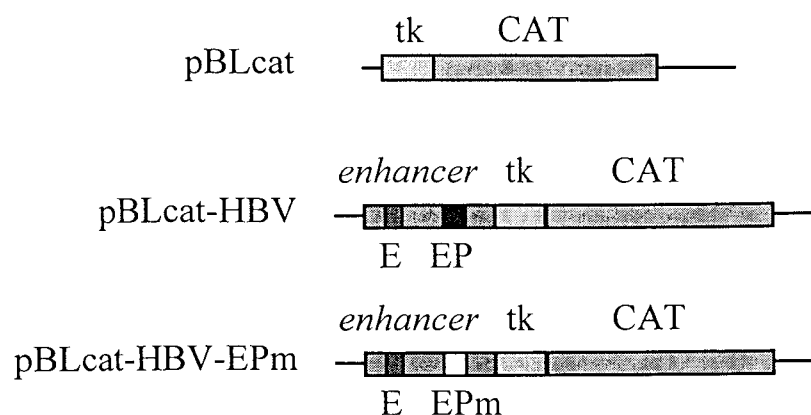
→ pSP65-CML : vecteur obtenu par le Dr Canaani (Israël) et contenant la séquence codant la protéine p210^{BCR-ABL} entre les sites *EcoRI* et *HindIII* du plasmide pSP65.

→ pBLCAT-HBV : ce vecteur reporter contient, en amont de son promoteur minimal, le fragment *SphI-StuI* de l'*enhancer* du virus de l'hépatite B, cloné entre les sites *SphI* et *XbaI* (rendu franc à la kleenow) du vecteur pBLCAT2 (Figure M1). Cette séquence *SphI-StuI* contient entre autres les éléments E et EP indispensables à la fonction de l'*enhancer* et est issue du vecteur pFC80 correspondant à quatre génomes du virus de l'hépatite B type *ayw* obtenu par le Pr. Tiollais (Paris) (Galibert *et al.*, 1979).

→ pcDNA3-c-Myb : ce vecteur permet d'exprimer la protéine c-Myb humaine entière dans les cellules eucaryotes. Il est obtenu par clonage du fragment [*NcoI* (position 226 de l'ADNc de c-Myb, rendu franc)-*XbaI* (du vecteur pSG5)] entre les sites *EcoRV* et *XbaI* du vecteur pcDNA3 (Figure M1).

→ pcDNA3-NF-M : ce vecteur permet l'expression de la protéine NF-M de poulet dans les cellules eucaryotes. Il est obtenu par insertion du fragment [*SmaI* (83)- *SmaI* (1245)] du vecteur pBS_{II}SK-NF-M (obtenu par le Dr A. Leutz, Berlin) dans le site *EcoRV* du vecteur pcDNA3. Le vecteur ayant intégré le fragment d'ADN dans l'orientation autorisant la production de la protéine a été appelé « vecteur sens », le vecteur « anti-sens » contenant

Vecteurs reporter :



Vecteurs d'expression:

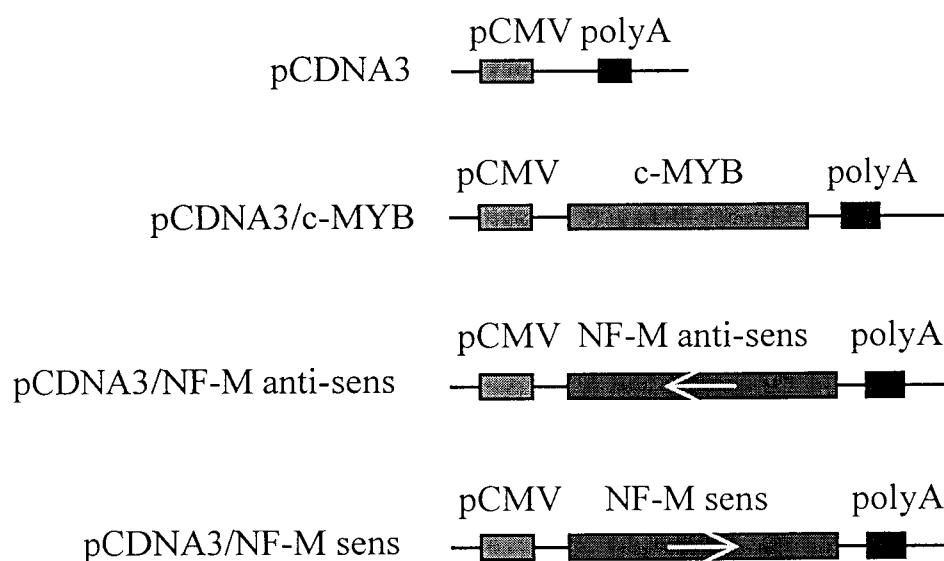


Figure M1 : Représentation schématique des vecteurs reporter et d'expression utilisés en CAT assays.

Le vecteur pBLCAT est utilisé comme contrôle par rapport aux vecteurs *reporter* pBLcat-HBV (contenant l'*enhancer* du virus HBV en amont du promoteur de la *thymidine kinase* (tk) contrôlant la transcription du gène *cat*) et pBLcat-HBV-EPm (contenant l'*enhancer* HBV avec une mutation ponctuelle au niveau du site de fixation de la protéine c-Myb au sein de l'élément EP).

Le vecteur pCDNA3 contient le promoteur du cytomégalo virus (pCMV) et un signal de polyadénylation (polyA) pour permettre l'expression correcte d'un ADNc placé entre ces deux éléments. Il est utilisé comme contrôle de l'action du vecteur pCDNA3-c-Myb alors que le vecteur contrôle pour l'action du vecteur pCDNA3-NF-M est celui contenant l'ADNc de NF-M en orientation inverse (pCDNA3-NF-M anti-sens).

l'ADNc dans le sens inverse a été utilisé comme contrôle lors des expériences de transfection (Figure M1).

2. Culture bactérienne

a. Souches bactériennes utilisées

Les génotypes des souches d'*Escherichia coli* utilisées sont les suivants :

→ **JM 109** : *recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17 (rK⁻, mK⁺), relA1, supE44, λ-, Δ(lac-proAB), [F', traD36, proAB, lac^qZΔM15]*. C'est la souche communément utilisée pour la production de protéines de fusion en bactérie et pour la production de plasmides permettant l' α -complémentation, ceci grâce à sa particularité de posséder dans son épisode F' le gène *lacZ* délété de certaines parties qui sont au contraire présentes dans les vecteurs pBS_{II}SK+ et pSELECT™. L'introduction de ces vecteurs dans la souche JM109 permet d'exprimer dans la bactérie le peptide- α dont la partie codante est délétée dans son génome et d'obtenir ainsi la restauration de l'activité β -galactosidase. Cette souche permet donc de visualiser les clones ayant introduit le vecteur sauvage (colonies bleues) ou le vecteur recombinant (colonies blanches) en présence de X-Gal et d'IPTG. La présence de l'épisode F' est indispensable pour l'infection par le phage *helper* et donc pour la production d'ADN simple brin du phagemide, utilisé pour la mutagenèse dirigée.

→ **JM110** : *rspL, thr, leu, thi-1, lacY, galK, galT, ara, tonA, tsx, dam-, dcm, supE44, Δ(lac-proAB), [F', traD36, proAB, lac^qZΔM15]*. Elle est utilisée pour la production de plasmides qui devront être digérés par la suite par des enzymes de restriction sensibles à la méthylation de l'ADN.

→ **TOP10F'** : *msrA, Δ(mrr, hsdRMS, mcrBC), Φ80lacZ ΔM15, ΔlacX74, deoR, recA1, araD139, Δ(ara, leu), 7697 galU galK λ-, rpsL, endA1, nupG, [F', Tn10, proAB, lac^qZΔM15]*. Elle est utilisée pour l'amplification des plasmides portant la résistance à l'ampicilline (donc sauf le pSELECT™ et le pALTER-EX1 possédant la résistance à la tétracycline) car elle doit être cultivée en présence de tétracycline pour conserver l'épisode

F'. Cette souche est particulièrement recommandée pour l'amplification des vecteurs dérivés du pcDNA3.

→ **BMH 71-18 mutS** : *thi-1*, *supE*, $\Delta(lac-proAB)$, [*mutS* : :Tn10] [F', *proAB*, *lac*^qZ Δ M15], souche déficiente en système de réparation des mésappariements (*minus repair*), elle permet donc d'augmenter l'efficacité de l'obtention de mutants lors de la mutagenèse dirigée.

b. Milieux de culture

Toutes ces souches sont cultivées en milieu LB (peptone 10 g/L ; extrait sec de levure 5 g/L, NaCl 86 mM ; pH 7,5), étalées après transformation sur boîtes de Pétri de LB gélifié (LB contenant de l'agar à 15 g/L). Ces boîtes peuvent contenir des antibiotiques de sélection tels que l'ampicilline (125 μ g/mL) ou la tétracycline (15 μ g/mL), ou encore un mélange d'IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside, 0,4 mM) et de X-Gal (5-bromo-4-chloro- β -D-galactopyranoside à 50 μ g/mL).

Pour maintenir l'épisome F', les bactéries JM109, JM110 et BMH 71-18 mutS sont cultivées en milieu minimum M9 (Na₂HPO₄ 34 mM ; KH₂PO₄ 22 mM ; NH₄Cl 20 mM ; NaCl 9 mM ; MgSO₄ 2 mM ; CaCl₂ 0,1 mM ; glucose 0,2 % ; vitamine B₁ 9 μ M ; pH 7,5).

Les bactéries sont conservées à -20°C après avoir été cultivées dans du milieu riche 2XTY +MC (Bacto-tryptone 18 g/L ; extrait sec de levure 10 g/L ; NaCl 86 mM ; + extrait sec de viande 8 g/L ; pH 7,5) additionné de glycérol 30 %.

3. Digestion enzymatique des fragments et ligature de l'ADN

Le plasmide contenant le fragment d'intérêt et celui receveur du fragment sont digérés par des endonucléases de restriction à raison d'1 unité enzymatique par μ g d'ADN, pendant 1 h à 37°C dans leur tampon spécifique. Les extrémités 5' protubérantes non compatibles entre elles peuvent être rendues franches par polymérisation du brin complémentaire grâce au fragment Klenow de l'ADN polymérase I d'*E. coli* (Boehringer), en présence de désoxynucléotides (0,2 mM) et du tampon approprié à cette enzyme. La réaction est ensuite stoppée par incubation 10 mn à 70°C. Les fragments d'ADN ainsi libérés sont séparés par

électrophorèse en gel d'agarose ou de polyacrylamide, élués et mis en ligation par action de l'ADN ligase du phage T4 (Boehringer) pendant deux heures à une nuit à 16°C.

4. Mutagenèse dirigée

Afin d'obtenir des mutations ponctuelles en des endroits précis de séquences nucléotidiques étudiées, le système de mutagenèse dirigée par oligonucléotide a été utilisé (*Altered SitesTM Mutagenesis System*, Promega). Cette technique repose sur l'hybridation à un ADN simple brin d'un oligonucléotide complémentaire de 20 à 30 pb contenant la mutation d'intérêt en son centre et par hybridation d'un autre oligonucléotide restaurant la résistance à l'ampicilline du vecteur pSELECTTM.

a. Obtention de la matrice d'ADN simple brin

Une pré-culture de bactérie JM109 contenant le phagemide recombiné à muter est relancée au 1/50^e dans 50 mL de LB additionné de tétracycline. Après une heure de culture à 37°C sous agitation (DO₆₀₀ = 0,3), le phage *helper* R408 (dérivé du bactériophage M13) est ajouté à la culture, à raison de 10 *pfu* par bactéries. L'infection des bactéries et la production du phagemide se fait pendant 6 à 16 h à 37°C sous agitation. Les bactéries sont alors centrifugées à 12 000 g pendant 15 mn, le surnageant contenant les phages est centrifugé à nouveau puis précipité par addition de 0,25 volume du mélange PEG-8000 20% et acétate d'ammonium 3,75 M [pH 7,5] et incubation 30 mn sur la glace. Après centrifugation à 12 000 g, les phages *helper* et recombinants sont repris dans 400 µL de TE, lysés par 400 µL de mélange chloroforme/alcool isoamylique (24/1) et agitation vigoureuse durant une minute avant d'être centrifugés 5 mn à 12 000 g. La phase aqueuse supérieure, contenant les phages, est alors déprotéinisée par deux extractions au phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1) suivie d'une dernière extraction au chloroforme/alcool isoamylique. L'ADN est ensuite précipité par 2,5 volumes d'alcool absolu en présence de 0,5 volume d'acétate d'ammonium 7,5 M. Après centrifugation 10 mn à 12 000 g, le culot est rincé à l'éthanol 70 %, séché et repris dans 20 µL d'eau déminéralisée.

Une fraction de 2 µL est déposée sur un gel d'agarose pour estimer le rapport entre les quantités de l'ADN du phage *helper* et celui du phagemide recombinant. Deux autres

microlitres sont utilisés pour estimer la concentration totale en ADN par mesure de l'absorbance à 260 nm, sachant qu'une unité de DO₂₆₀ correspond à 33 µg/mL d'ADN simple brin.

b. Réaction de mutagenèse

L'ADN simple brin (0,05 pM) est incubé avec 0,25 pM de l'oligonucléotide restaurant la résistance à l'ampicilline et 1,25 pM d'oligonucléotide portant la mutation désirée. L'hybridation se fait par refroidissement progressif du mélange de 70°C à la température ambiante, dans le tampon [Tris-HCl 20 mM ; NaCl 50 mM ; MgCl₂ 10 mM ; pH 7,5]. La synthèse du brin complémentaire ainsi que la ligation des extrémités synthétisées aux séquences des oligonucléotides hybridés se font par incubation 90 mn à 37°C du mélange avec 10 unités d'ADN polymérase du phage T4 et 2 unités d'ADN ligase T4 dans le tampon de synthèse [Tris-HCl 10 mM ; ATP 1 mM ; dNTP 0,5 mM ; DTT 2 mM ; pH 7,5].

L'ADN double brin ainsi obtenu peut-être introduit dans la souche bactérienne BMH 71-18 MutS compétente. Les phagemides des clones sélectionnés en présence d'ampicilline sont purifiés et réintroduits dans la bactérie JM109 compétente. Les clones ayant poussé sur boîtes de LB gélosé contenant l'ampicilline seront testés pour la présence de la mutation.

5. La transformation bactérienne

Les bactéries sont cultivées durant une nuit à 37°C sous agitation dans le milieu LB puis relancées au 1/50^e dans 50 mL de milieu, jusqu'à obtention d'une turbidité correspondant à la DO₅₆₀ de 0,2. Les bactéries sont alors centrifugées à 3000 g pendant 10 mn à 4°C. Le culot est alors lavé dans 20 mL de tampon A [MOPS 10 mM, pH 7,0 ; chlorure de rubidium 10 mM], centrifugé et laissé 30 mn dans la glace dans 20 mL de tampon B [MOPS 100 mM, pH 6,5 ; chlorure de calcium 50 mM ; chlorure de rubidium 10 mM]. Après une dernière centrifugation, les bactéries compétentes sont reprises dans 5 mL de tampon B. 200 µL de ces bactéries sont alors utilisées pour la transformation ou congelées à -70°C en présence de 30 % de glycérol.

Pour la transformation bactérienne, l'ADN mis en ligation est mélangé à 200 µL de bactéries compétentes auxquels on ajoute 5 µL de DMSO. Après incubation 30 mn sur la

glace, un choc thermique de 90 s à 42°C est effectué puis le tube est remis dans la glace. Les bactéries sont ensuite mises en culture dans 1 mL de milieu LB pendant 45 mn à 37°C sous agitation, afin de permettre aux facteurs de résistance aux antibiotiques de s'exprimer. Les bactéries sont alors étalées sur boîtes de LB gélosé contenant les antibiotiques de sélection (additionné éventuellement de mélange X-Gal et IPTG pour l' α -complémentation) et incubées une nuit dans une étuve à 37°C.

6. Identification des clones recombinants

a. Minipréparation de plasmides par la méthode WIZARD (Promega)

Après transformation bactérienne et sélection, les clones contenant les plasmides recombinants sont mis en culture dans 10 mL de LB additionné de l'antibiotique de sélection et incubés à 37°C sous agitation durant 6 à 16 heures. Après centrifugation 10 mn à 4000 g, le culot bactérien est repris dans 200 μ L de tampon de resuspension (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 ; EDTA 10 mM ; RNase A 100 μ g/mL) du kit WIZARD de minipréparation de plasmides. Les bactéries sont ensuite lysées par 200 μ L de solution alcaline (NaOH 0,2 M ; SDS 1 %). Le mélange est ensuite neutralisé par 200 μ L de tampon de neutralisation (acétate de potassium 1,32 M ; pH 4,8) avant d'être centrifugé 10 mn à 12000 g de manière à séparer les débris bactériens des plasmides contenus dans le surnageant. La résine WIZARD (1 mL) est alors ajoutée au surnageant, le mélange est déposé sur des colonnes retenant la résine. Après deux lavages par 2 mL de la solution de lavage du kit (acétate de potassium 80 mM ; Tris-HCl 8,3 mM, pH 7,5 ; EDTA 40 μ M ; éthanol 55 %), 100 μ L d'eau déminéralisée sont déposés dans la colonne et incubés 1 mn de manière à éluer l'ADN. Une brève centrifugation permet de récupérer la solution plasmidique.

Un aliquote de 20 μ L, correspondant à environ 5 μ g de plasmide, est utilisé pour identifier les clones recombinants par digestion par les enzymes de restriction appropriées.

b. Séquençage de l'ADN recombinant

Les plasmides donnant le profil de digestion enzymatique recherché, ainsi que les clones issus de la mutagenèse dirigée, sont vérifiés par séquençage par la méthode de terminaison de chaîne (Sanger *et al.*, 1977).

Le plasmide recombinant (0,5 pM) est d'abord dénaturé dans une solution à 0,2 M NaOH additionnée de 0,2 mM EDTA, par incubation 30 mn à 37°C. Après neutralisation de la solution par addition de 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M (pH 4,8), l'ADN est précipité à l'éthanol, rincé et séché. Le culot est alors repris dans 7 µL d'eau déminéralisée et mis en hybridation avec 1 pM d'amorce appropriée dans le tampon d'hybridation du kit Séquenase version 2.0 (USB), par chauffage 5 mn à 65°C et refroidissement lent jusqu'à température ambiante. La phase d'extension est démarrée par ajout de 5,5 µL d'une solution contenant 0,5 µL de *séquenase* (ADN polymérase), 0,5 µL de [$\alpha^{35}\text{S}$] dATP (1000 Ci/mM), 1 µL de DTT 0,1 M, 2 µL de mélange de dCTP, dGTP et dTTP (7,5 µM) dans le tampon adéquat, pendant 5 mn à température ambiante. Dans chacun des quatre puits, contenant 2,5 µL d'une des quatre bases sous forme de didéoxynucléotide, sont ajoutés 3,5 µL du mélange marqué pour 7 mn à 37°C afin d'obtenir la terminaison de la synthèse du brin complémentaire radioactif. Les échantillons sont dénaturés pendant 5 mn à 80°C après addition de 4 µL de tampon de dénaturation (formamide 95 % ; EDTA 20 mM ; bleu de bromophénol 0,5 % ; xylène cyanol 0,5 %) puis déposés sur un gel dénaturant (polyacrylamide 6 %, rapport acrylamide/bisacrylamide 19/1 ; urée 8 M dans le TBE) équilibré par prémigration 30 mn dans le tampon TBE (Tris 100 mM ; acide orthoborique 100 mM ; EDTA 2 mM). La migration s'effectue à 85 W pendant 2 h 30 à 5 h. Le gel est ensuite séché sous vide et révélé au PhosphorImager.

c. Production de stocks de plasmides

Afin de produire en grande quantité les plasmides recombinants ou sauvages, les bactéries sont cultivées une nuit dans 100 mL de milieu LB additionné de l'antibiotique de sélection. Après centrifugation de la culture à 4000 g pendant 10 mn à 4°C, le culot bactérien est repris dans 4 mL de tampon P1 du kit de purification Qiagen, lysé pendant 5 mn par ajout de 4 mL de tampon P2 (contenant un mélange de soude et de SDS) puis neutralisé pendant 15 mn par addition de 4 mL de solution saline P3. Les débris bactériens sont éliminés par centrifugation 15 mn à 10 000 g à 4°C. Le surnageant est filtré sur laine de verre avant d'être

déposé sur une colonne Qiagen-tip 100 préalablement équilibrée par 5 mL de tampon QBT. Après deux passages de 10 mL de tampon de lavage QC, les plasmides sont élués de la colonne par addition de 5 mL de tampon salin QF avant d'être précipités à l'isopropanol (0,7 volume) et centrifugés à 15 000 g pendant 30 mn à 4°C. Le culot d'ADN est alors lavé dans l'éthanol 70 %, séché sous vide et resuspendu dans un volume approprié de TE. La concentration en ADN de la solution est mesurée par absorbance à 260 nm, sachant qu'une unité d'absorbance correspond à une concentration de 50 µg d'ADN double brin/mL.

II. Production de protéines recombinantes

A. Protéines produites en système bactérien

1. Production de protéines de fusion

Les bactéries contenant les vecteurs d'expression pGEX-2T, pGEX-3X, pALTER-EX1 ou pTRC-99A recombinants sont cultivées dans 200 mL de milieu LB + ampicilline sous agitation à 37°C jusqu'à obtention d'une DO₅₈₀ de 0,2. La synthèse protéique est alors initiée par addition de 200 µL d'une préparation extemporanée d'IPTG 0,1 M. La culture est poursuivie 2 à 5 h.

Pour la production de protéines marquées en bactéries, 0,5 mCi d'un mélange de méthionine et de cystéine marquées au ³⁵S (Pro-Mix, Amersham) est ajouté au moment de l'induction.

2. Purification par affinité au glutathion

Cette purification permet de récupérer la protéine de fusion GST-BN grâce à l'interaction entre la partie GST (glutathion-S-transférase) et la colonne de glutathion-sépharose. Cette protéine est exprimée à partir du vecteur d'expression procaryotique pGEX-BN, dans lequel le fragment [*Bcl*I(5104)-*Nar*I(6370) rendu cohésif] de l'ADNc de Bcr-Abl est cloné entre les sites *Bam*HI et *Spe*I (le site *Spe*I étant préalablement introduit dans le vecteur et dont les extrémités sont rendues compatibles par la Klenow).

La culture bactérienne est centrifugée à 4000 g 10 mn à 4°C. Le culot est repris dans 10 mL de tampon PBS (NaCl 150 mM ; Na₂HPO₄ 16 mM ; NaH₂PO₄ 4 mM ; pH 7,3)

additionné d'inhibiteurs de protéases (PMSF 1 mM ; aprotinine 1 µg/mL) et lysé par 3 pulses de 30 secondes de sonication séparés par des congélations et décongélations rapides. Les protéines bactériennes sont alors séparées des débris bactériens par centrifugation à 10 000 g 20 mn à 4°C. Le surnageant contenant les protéines bactériennes solubles est filtré sur membrane de porosité supérieure à 0,8 µm avant d'être déposé sur une colonne de 2 mL de glutathion-sépharose préalablement lavée par 2 fois 10 mL de tampon PBS et équilibrée par passage de 6 mL de tampon PBS additionné de Triton-X 100 1%. Après 3 lavages par 10 mL de PBS permettant d'éliminer les protéines bactériennes n'ayant pas d'affinité pour le glutathion, les protéines retenues par la colonne sont éluées par 10 mL d'une solution de glutathion 5 mM dans du Tris-HCl 50 mM, pH 8,0. Les colonnes sont régénérées par passage de 10 mL de tampon salin PBS additionné de 3 M NaCl. L'éluat est dialysé une nuit contre le tampon D utilisé dans les expériences de retard en gel (HEPES 50 mM , pH 7,9 ; KCl 100 mM ; MgCl₂ 5 mM ; EDTA 0,1 mM ; glycérol 20 %) additionné d'inhibiteurs de protéases (DTT 1 mM ; PMSF 1 mM).

La protéine peut alors être concentrée si nécessaire par le système vivapore (0,22 µM, Vivascience). La concentration finale de la protéine est estimée sur gel de polyacrylamide dénaturant coloré au Bleu de Coomassie, par comparaison à une gamme étalon de sérum albumine bovine (BSA) et par dosage colorimétrique reposant sur la méthode de Bradford (1976) (Biorad). Les protéines sont alors congelées à -70°C en présence de glycérol 30 %.

3. Purification par affinité pour le nickel

Les colonnes de nickel permettent de purifier les protéines GST-NX-HIS et NX-HIS par la séquence poly-histidine affine pour le nickel et exprimée en C-terminal de ces protéines de fusion.

Le culot de bactéries exprimant les protéines recombinantes est repris dans 10 mL de tampon de lyse [guanidium 6 M ; NaCl 500 mM ; Na₂HPO₄ 18,85 mM ; NaH₂PO₄ 1,15 mM ; pH 7,8], lysé comme précédemment par sonication et chocs thermiques. Le surnageant est filtré sur membrane 0,8 µm avant d'être déposé sur les billes de nickel équilibrées dans le tampon de fixation [urée 8 M ; NaCl 500 mM ; Na₂HPO₄ 18,85 mM ; NaH₂PO₄ 1,15 mM ; pH 7,8] et incubé 30 mn en agitation douce à 4°C. Suivent deux lavages par 8 mL de tampon de fixation, trois par 8 mL de tampon de lavage au pH 6,0 [urée 8 M ; NaCl 500 mM ; NaH₂PO₄

14,75 mM ; Na₂HPO₄ 5,25 mM] et quatre lavages par 8 mL de tampon de lavage au pH 5,5 [urée 8 M ; NaCl 500 mM ; NaH₂PO₄ 18,35 mM ; Na₂HPO₄ 1,65 mM] afin d'éliminer toutes les interactions non-spécifiques avec les billes de nickel. Les protéines sont alors éluées des billes de nickel par 2 fois 5 mL de tampon d'éluion [urée 8 M ; NaCl 500 mM ; NaH₂PO₄ 20 mM ; pH 4,0] en agitation 10 mn à 4°C. L'éluat est filtré sur membrane 0,8 µm afin d'éliminer les billes de nickel restant en suspension dans le surnageant, avant d'être dialysé progressivement contre le tampon D additionné d'inhibiteurs de protéases pour éliminer l'urée et permettre à la protéine de retrouver progressivement sa structure native.

Les protéines purifiées sont alors dosées et congelées comme précédemment décrit.

B. Protéines exprimées en lysat de réticulocytes

Le kit *TNT™ Coupled Reticulocyte Lysate System* (Promega) a été utilisé pour la production de protéines radiomarquées en système eucaryotique à partir des vecteurs d'expression dérivés des plasmides pcDNA3 ou pALTER-EX1 qui contiennent le promoteur de l'ARN polymérase du bactériophage T7. A 25 µL de lysat de réticulocytes de lapin sont ajoutés 1 µg de vecteur d'expression, 1 µL d'ARN polymérase T7, 40 unités d'inhibiteur de ribonucléase (RNAsin, Boehringer), 1 µL de mélange d'acides aminés sans méthionine (1 mM) et 4 µL de [³⁵S]-méthionine (1 000 Ci/mM, 10 mCi/mL, Amersham), 2 µL du tampon spécifique, complété par de l'eau déminéralisée contenant du DEPC (diéthylpyrocarbonate) pour un volume final de 50 µL. La transcription et la traduction se font par incubation du mélange 90 mn à 30°C. Un aliquote de 5 µL est déposé sur gel de protéine dénaturant afin de vérifier le niveau d'expression de la protéine, le reste est conservé par congélation à -70°C.

III. Etudes en cellules eucaryotes

A. Culture de cellules

1. Cellules adhérentes

Les lignées cellulaires COS-7 (cellules de rein de singe transformées par le virus SV40 et exprimant l'antigène T), HepG2 (issue d'un hépatocarcinome humain) et HeLa (issue d'un

cancer du col de l'utérus) sont cultivées à 37°C sous atmosphère humide à 5 % de CO₂ dans du milieu Dulbecco additionné de 10 % de sérum de veau fœtal (SVF, Boehringer) décomplémenté. Elles sont divisées deux fois par semaine après avoir été décollées du support au versène (NaCl 137 mM ; Na₂HPO₄ 16 mM ; KCl 2,7 mM ; KH₂PO₄ 1,5 mM ; pH 7,2).

2. Cellules en suspension

La lignée myéloïde HL60 et la lignée K562 (dérivant d'un patient en crise blastique de Leucémie Myéloïde Chronique ; Lozzio and Lozzio,1975) sont cultivées dans le milieu RPMI (Life Science) additionné de 10 % de sérum de veau fœtal dans une étuve à CO₂. Ces cellules sont multipliées deux fois par semaine.

B. Techniques de transfection

1. Lipofection

Les cellules adhérentes COS-7 et HepG2 sont transfectées en utilisant la lipofectamine (Life Science). Ce produit est constitué de lipides polycationiques pouvant former des liposomes enfermant l'ADN. Le liposome ainsi complexé à l'ADN fusionne à la membrane plasmique, libérant alors l'ADN dans le cytoplasme cellulaire. Les liposomes complexés à l'ADN sont obtenus par incubation de 2 à 10 µg de plasmides avec 20 µL de lipofectamine dans 300 µL de milieu OPTI-MEM (Life Science) pendant 30 mn à température ambiante. Le mélange est ensuite repris dans 5 mL de milieu Dulbecco sans sérum et déposé lentement sur les cellules cultivées à 20 % (HepG2) ou 50 % (COS-7, HeLa) de confluence en boîte de pétri de 10 cm de diamètre (Falcon) et rincées par le milieu sans sérum. Les cellules sont alors remises à l'étuve pendant 5 à 16 h avant d'être à nouveau cultivées avec sérum pendant 24 à 48 h.

2. Electroporation

Les cellules en suspension K562 (3.10^6 cellules) sont électroporées en présence des plasmides (5 à 25 µg) à un voltage de 270 V et une capacité de 1 500 µF (appareil Easy-Ject+,

Eurogentec) dans 500 μL de milieu RPMI sans sérum. Le choc électrique ainsi provoqué entraîne l'ouverture transitoire des pores de la membrane plasmique afin de permettre l'entrée de l'ADN dans le cytoplasme. Les cellules sont ensuite remises en culture dans 5 mL de milieu RPMI avec sérum et cultivées 48 h à 37 C.

C. Dosage de l'activité CAT

Il permet de mesurer l'action d'un facteur pouvant agir, directement ou indirectement, sur un élément régulateur de la transcription placé en amont du promoteur minimal du vecteur *reporter* pBLCAT2 (Luckow and Shultz, 1987) exprimant la protéine CAT (*Chloramphenicol Acetyl Transferase*).

Ainsi 24 à 48 h après transfection des vecteurs *reporter* seuls ou avec les vecteurs d'expression de protéines d'intérêt, les cellules adhérentes sont d coll es au versène et lav es par 5 mL de PBS (NaCl 68 mM ; Na₂HPO₄ 58 mM ; NaH₂PO₄ 17 mM ; pH 7,4), alors que les cellules en suspension sont centrifug es à 1000 g et lav es deux fois dans le PBS. Les cellules sont reprises dans 100 μL de Tris-HCl 0,25 M pH 7,7 et lys es aux ultrasons pendant 20 secondes. Les extraits cellulaires totaux sont récupérés après centrifugation 10 mn à 12 000 g et dosés par mesure de l'absorbance à 280 nm. Une même quantité de protéines totales est alors reprise dans un volume final de 100 μL de Tris-HCl 0,25 M pH 7,7, auxquels sont ajoutés 20 μL d'acétyl coenzyme A   4 mM, 35 μL d'eau déminéralisée et 0,5 μL de ¹⁴C-chloramphénicol (1 mCi/mL, 54 mCi/mM, Amersham). La réaction est men e 1 h à 37 C et est arr t e par addition de 800 μL d'acétate d'éthyle froid. Après centrifugation 5 mn à 12 000 g, la phase organique, contenant le chloramphénicol sous forme ac tyl e ou non, est pr lev e et s ch e sous vide. Le culot est repris dans 15 μL d'acétate d'éthyle et déposé sur gel de silice (0,25 mm, Machery-Nagel). Les d pots sont concentrés par pré-migration dans l'acétone. Les formes ac tyl es du ¹⁴C-chloramphénicol sont s par es des formes non ac tyl es par chromatographie ascendante d'une heure dans un solvant chloroforme/méthanol (95/5).

Les gels de silice sont alors placés contre des écrans stimulables par la radioactivité (Kodak) et révélés par le PhosphorImager 445SI (Molecular Dynamics). La détermination du pourcentage d'acétylation se fait par analyse des donn es dans le programme ImageQuant.

D. Obtention d'extraits protéiques nucléaires

Les cellules en phase exponentielle de croissance sont centrifugées à 1 000 g pendant 10 mn à 4°C et lavées deux fois par 30 volumes de PBS. Le culot cellulaire est repris par 1 volume de solution A [HEPES 10 mM, pH 7,9 ; KCl 10 mM ; MgCl₂ 1,5 mM ; DTT 0,5 mM], incubé 15 mn sur la glace puis passées 10 fois au travers d'une aiguille de calibre 25 permettant de lyser les membranes cellulaires tout en conservant les noyaux intacts. Une brève centrifugation de 30 secondes à 12 000 g permet de récupérer les noyaux au fond du tube. Ceux-ci sont alors incubés dans 2/3 de volume de solution C [HEPES 20 mM, pH 7,9 ; Glycérol 25 % ; NaCl 420 mM ; MgCl₂ 1,5 mM ; DTT 0,5 mM ; PMSF 0,5 mM], pendant 30 mn sous agitation dans la glace. La forte force ionique du tampon C permet de libérer les protéines au travers des pores des membranes nucléaires. Les protéines nucléaires sont isolées du reste des noyaux par centrifugation à 12 000 g pendant 10 mn à 4°C puis dialysées contre le tampon D [HEPES 50 mM, pH 7,9 ; Glycérol 20 % ; KCl 100 mM ; EDTA 0,2 mM ; DTT 0,5 mM ; PMSF 0,5 mM] afin d'éliminer les sels.

La solution de protéines nucléaires est clarifiée par centrifugation à 100 000 g 1 h à 4°C. La concentration protéique est alors estimée par dosage colorimétrique de BRADFORD (1976). Les protéines sont alors conservées aliquotées à -70°C.

E. Extraction des ARN cellulaires totaux

La préparation des ARN totaux des lignées cellulaires HepG2, HeLa, HL60 et K562 a été réalisée grâce au kit RNA QUICK™ II (Bioprobe Systems). Pour cela, les cellules sont centrifugées avant d'être reprises par 1 mL de solution d'extraction du kit/10⁷ cellules. Le mélange est alors déprotéinisé par addition de 0,2 volume de chloroforme et agitation vigoureuse 15 secondes suivie d'une incubation 5 mn sur la glace. Une centrifugation à 12 000 g pendant 15 mn à 4°C permet de récupérer les ARN dans la phase supérieure aqueuse et de les isoler de l'ADN et des protéines cellulaires restés dans la phase inférieure organique ou à l'interface. Les ARN sont transférés dans un tube Eppendorf traité au DEPC pour inhiber les activités ribonucléasiques, puis mélangés à 0,05 volume de résine *RNA CATCH™* et à 0,5 volume d'isopropanol. Après agitation 30 secondes et centrifugation 15 mn à 12 000 g à 4°C,

deux lavages à l'éthanol 70 % sont effectués. L'ARN est alors élué de la résine par 0,1 volume d'eau traitée DEPC et agitation énergique 30 secondes. Une centrifugation 1 mn à 12 000 g permet de récupérer l'ARN dans le surnageant. La concentration et le degré de pureté sont estimés par mesure de la densité optique à 260 et 280 nm, sachant qu'une unité d'absorbance à 260 nm correspond à une concentration de 40 µg d'ARN/mL et qu'un rapport DO_{260}/DO_{280} compris entre 1,8 et 2 atteste d'une préparation d'ARN exempte de contamination protéique. Les ARN sont alors aliquotés et précipités par addition de 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M et 3 volumes d'éthanol pour être conservés à -70°C .

IV. Détection des ARN par RT-PCR

A. Rétrotranscription des ARN

Les oligonucléotides complémentaires des ARNm des gènes *c-myb* et *c-abl* ont été mis en hybridation avec 2 µg d'ARN totaux de cellules HL60, K562, HeLa ou HepG2. Cette hybridation s'effectue par chauffage à 70°C pendant 5 mn en présence de tampon spécifique de la reverse transcriptase du virus Moloney de la leucémie murine (M-MLV), de 1 µg d'inhibiteur de RNase (Boehringer), de DTT (10 mM) et des quatre dNTP (2,5 mM de chaque). Après refroidissement, 200 unités de rétrotranscriptase (RT de M-MLV, Life Science) sont ajoutés au mélange afin de synthétiser une copie d'ADNc hybridée à l'ARN. La réaction a lieu à 37°C pendant 1 h.

B. Amplification par PCR (polymerase chain reaction)

L'ADNc est utilisé comme matrice pour la réaction de PCR afin d'obtenir l'amplification de fragment d'ADNc double brin spécifique du jeu d'amorces de PCR choisi. Pour cela, $1/10^6$ du produit de rétrotranscription est mélangé à 0,6 pM de chacun des jeux d'amorce, 0,25 mM de chacun des dNTP et 0,5 unité de Taq polymérase (Appligene) pour un volume final de 20 µL du tampon spécifique. Afin d'éviter tout problème d'évaporation de tampon pendant la PCR, 20 µL d'huile minérale sont déposés sur les échantillons.

Une première étape de dénaturation est effectuée par chauffage 5 mn à 96°C , suivie de 35 cycles de PCR correspondant chacun à la succession des étapes de dénaturation 1 mn à

94°C, d'hybridation 1 mn à 56°C et d'élongation 2 mn à 72°C. Une dernière étape d'élongation de 10 mn à 72°C permet la synthèse complète des séquences amplifiées. Les produits de PCR sont alors séparés sur gel d'agarose à 2 % pour estimer leur taille et visualisés aux UV. L'identification des ampligènes est également réalisée par digestion enzymatique et migration des fragments d'ADN sur gel de polyacrylamide à 8 %.

V. Techniques immunologiques

A. Electrophorèse de protéines en gel de polyacrylamide

Les échantillons de protéines à analyser sont mélangés vol/vol à une solution dénaturante (Urée 8 M, glycérol 25 %, Tris-HCl 125 mM, pH 6,8 ; SDS 2 % ; β -mercaptoéthanol 2 % ; bleu de bromophénol 0,05 %) et bouillis 2 mn afin de dénaturer les protéines et permettre la détermination de leur poids moléculaire apparent sans influence de leurs charges ni des interactions avec d'autres protéines sur leur migration en gel.

Le mélange refroidi sur la glace est alors déposé dans les puits d'un gel de tassement à 5 % de polyacrylamide (rapport acrylamide/bisacrylamide 50/1,33) dans du tampon Tris-HCl 125 mM, pH 6,8 contenant 0,1 % de SDS. Les protéines se concentrent à la limite du gel de tassement avant de migrer dans le gel de séparation. La concentration de ce gel varie de 10 à 15 % selon le poids moléculaire des protéines à séparer (rapport acrylamide/bisacrylamide 50/0,235 dans du tampon Tris-HCl 375 mM pH 8,9 et SDS 0,1 %). L'électrophorèse est réalisée dans le tampon [glycine 192 mM ; Tris 25 mM ; SDS 0,1 % ; pH 8,9] sous une tension de 50 à 70 V durant une nuit. Des marqueurs de poids moléculaire pré-colorés sont déposés en même temps que les échantillons et permettent de contrôler la migration.

Le gel peut ensuite être coloré au Bleu de Coomassie par un bain de 30 mn dans un mélange méthanol 50 % ; acide acétique 10 % ; R250 0,1 %, suivie d'une décoloration dans le mélange méthanol/eau/acide acétique (45/45/10).

Les gels contenant des protéines radioactives sont séchés et révélés au PhosphorImager.

Les gels de protéines peuvent encore être utilisés en Western Blots afin de révéler immunologiquement l'identité des protéines.

B. Western Blot

Les protéines séparées selon leur poids moléculaire en gel de polyacrylamide dénaturant sont transférées sur membrane de nitrocellulose (Immobilon P, Millipore) en utilisant un appareil d'électrotransfert semi-sec (*Milliblot-Graphite electoblotter system*, Millipore). Une coloration transitoire de la membrane par une solution de Rouge Ponceau 0,2 % et d'acide trichloroacétique 3 % permet de vérifier l'efficacité du transfert des protéines. La membrane est rincée par du tampon TBS (NaCl 150 mM ; Tris-HCl 10 mM, pH 7,6), puis incubée 1 h à 45°C dans une solution de TBS additionnée de 5 % de poudre de lait écrémé afin de saturer les sites de fixation non spécifique. Deux lavages de 10 mn dans le TBS sont effectués avant incubation de la membrane 1 h avec un anticorps spécifique des protéines à révéler (sérum polyclonal anti-GST obtenu par Eurogentec par inoculation de protéine GST chez le lapin et utilisé au 1/500^e). La membrane est alors lavée une fois dans le TBS puis deux fois dans du TBS additionné de 1 % de TWEEN-20. Le second anticorps (0,2 µg/mL, anti-lapin couplé à la peroxydase, Pasteur Production) est alors incubé avec la membrane dans le TBS-lait pendant une heure. La membrane est lavée trois dernières fois puis révélée par le mélange de chloronaphtol 25 mg ; H₂O₂ 60 µL ; méthanol 17 mL dans un volume final de 50 mL TBS. Une coloration violette permet de repérer le poids moléculaire apparent des protéines reconnues par l'anticorps.

VI. Etudes des interactions ADN-protéine

A. Préparation des sondes radioactives

1. Fragments d'ADN issus de plasmides

Les fragments d'ADN à étudier doivent avoir une taille comprise entre 25 et 300 pb. Ils sont obtenus par digestion par des enzymes de restriction appropriés du plasmide contenant la séquence d'intérêt.

Les séquences utilisées dans les expériences de retard en gel classique et contenant des extrémités 5' protubérantes sont ensuite marquées en 3' par l'ADN polymérase I fragment Klenow d'*E. coli* (Boehringer), en présence de 40 µCi de [α -³²P]dCTP ou [α -³²P]dATP

séquence nucleotidique	structure	nom
1: CTGGTCTACCAGATTACCCCGTGTGAGAGCGCTCGCC 2: GGCGAGCGCTCTCACACGGCCCTCCGCCAGCTGCGTG 3: CACGCAGCTGGGCGGAGGGGCGCGGACGTTAACCGTCC 4: GGACGGTTAACGTCCGCGGGTAACTGGTAGACCAG		4Wa
4: GGACGGTTAACGTCCGCGGGTAACTGGTAGACCAG 5: CTGGTCTACCAGATTACCCCAACAAAAGAGCGCTCGCC 6: GGCGAGCGCTCTTTTGTGTTTTTTGCCCAGCTGCGTG 7: CACGCAGCTGGGCAAAAAGCGCGGACGTTAACCGTCC		4Wb
6: GGCGAGCGCTCTTTTGTGTTTTTTGCCCAGCTGCGTG 8: CACGCAGCTGGGCAAAAACAACAAAAGAGCGCTCGCC		DUP-38mer
9: AGACTAGTGGATCCTGTCTAAAAACAACAACAAACCGATACCGTCGACCTCGAG 10: CTCGAGGTCGACGGTATCGTGTGTTGTTGTTTTAGACAGGATCCACTAGTCT		DUP-56mer
9: AGACTAGTGGATCCTGTCTAAAAACAACAACAAACCGATACCGTCGACCTCGAG 11: CTCGAGGTCGACGGTATCGCCCCCCCCCCCCAGACAGGATCCACTAGTCT		BBL-56mer (AAC)
11: CTCGAGGTCGACGGTATCGCCCCCCCCCCCCAGACAGGATCCACTAGTCT 12: AGACTAGTGGATCCTGTCTTGGATCCGCCGGCTGCAGCGATACCGTCGACCTCGAG		BBL-56mer (SK)
13: GGCGAGCGCTCTCCGCCGCCCGCCAGCTGCGTG 14: CACGCAGCTGGGCHIIIIICIIHAGAGCGCTCGCC		IC-38mer
13: GGCGAGCGCTCTCCGCCGCCCGCCAGCTGCGTG 15: CACGCAGCTGGGCGGGGGCGCGGAGAGCGCTCGCC		GC-38mer
16: ACTAGTGGATCCCCGGGCTGCAGGATCGATACAGCTT 17: AAGCTGTATCGATCCTGCAGCCCCGGGGATCCACTAGT		SK-38mer
18: GGCGAGCGCTCTTTTGTCTGTTTTTTGCCCAGCTGCGTG 8: CACGCAGCTGGGCAAAAACAACAAAAGAGCGCTCGCC		V
$\begin{array}{c} \text{NH}_3 \quad \text{NH}_3 \\ \diagdown \quad / \\ \text{Pt} \\ / \quad \diagdown \\ \text{CTCTTTTGGTTATTTTCCC} \\ \text{GGAAAATAACCAAAAAGAGG} \end{array}$		ADN platiné
6: GGCGAGCGCTCTTTTGTGTTTTTTGCCCAGCTGCGTG 21: CACGCAGCTGGGCAAAAACAACAAAAGAGCGCTCGCC $\begin{array}{c} \quad \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \end{array}$		DUP-38mer méthylé

Figure M2 : Séquence et structure des différents oligonucléotides synthétiques utilisés par retard en gel dans l'étude du domaine de liaison à l'ADN de c-Abl.

Les oligonucléotides 4Wb et BBL-56mer (AAC) contiennent le site de fixation pour le domaine de liaison à l'ADN de c-Abl alors que les oligonucléotides 4Wa et BBL-56mer (SK) contiennent des séquences différentes. Les oligonucléotides IC-38mer et GC-38mer sont dérivés de la séquence linéaire DUP-38mer avec les modifications des bases A/T en I/C ou G/C au niveau de la séquence consensus de reconnaissance par c-Abl. Les oligonucléotides 12, 16 et 17 contiennent des séquences issues de la région du *polylinker* du pBS_{II}SK qui n'est pas reconnue en retard en gel par la protéine GST-NX-HIS. Le symbole « * » représente le groupement méthyle.

Oligonucléotides utilisés en retard en gel avec le peptide R2R3 :

mim1A : 5' -TCGACACATTATAACGGTTTTTTTAGC-3'
3' -AGCTGTGTAATATTGCCAAAAAATCG-5'

EP : 5' -GATCCTGAACCTTTACCCCGTTGCCCGGCAACGGCCAGGTCTGTA-3'
3' -GACTTGAAATGGGGCAACGGGCCGTTGCCGGTCCAGACATTCTGA-5'

EPm: 5' -GATCCTGAACCTTTACCCCGTTGCCCGGCGCCGGCCAGGTCTGTA-3'
3' -GACTTGAAATGGGGCAACGGGCCCGCGCCGGTCCAGACATTCTGA-5'

EP muté sur site RFX1 :
5' -GATCCTGAACCTTTACCCCGGCGCCCGGCAACGGCCAGGTCTGTA-3'
3' -GACTTGAAATGGGGCGCGGCCGTTGCCGGTCCAGACATTCTGA-5'

EP-like XRCC1 : 5' -AGCTGGAGGAAACGCTCGTTGCTAAGGAACGCAGCG-3'
3' -CCTCCTTTGCGAGCAACGATTCTTGCCTCGCCTAG-5'

EF-C : 5' -AGCTTAATTAGTTGCTAGGCAACTGGCCTCG-3'
3' -ATTAATCAACGATCCGTTGACCGGAGCCTAG-5'

EP-like MYC : 5' -AGCTTGGCAATGCGTTGCTGGGTTATTTAAG-3'
3' -ACCGTTACGCAACGACCCAATAAAATTCCTAG-5'

MIF-1 : 5' -AGCTCAGAGTAGTTATGGTAACTGGGGCTGGGGT-3'
3' -GTCTCATCAATACCATTGACCCCGACCCACTAG-5'

Oligonucléotides divers :

amorce *myb* pour RT : 5' -GAGGCGCTTTCTTCAGGTAGGGAGC-3'

amorces *myb* pour PCR : 5' -CATGTTCCATACCCTGTAGCG-3'
5' -ATGAGGTCTGGTGTGGTCCG-3'

Oligonucléotide codant la séquence poly-histidine :
5' -GGCCGCGATGCATCACCATCACCACCATCACTAG-3'

Oligonucléotides utilisés pour le *CASTing* :

R62 : 5' -CAGGTCAGTTCAGCGGATCCTGTGCGNNNNNNNNNNNGAGGCGAATTCAGTGCAACTGCAGC-3'

R : 5' -CAGGTCAGTTCAGCGGATCCTGTGCG-3'

F : 5' -GCTGCAGTTGCACTGAATTCGCCTC-3'

Figure M3 : Séquence de différents oligonucléotides utilisés.

(3000 Ci/mM, Amersham) et de 5 mM des autres dNTP. Le marquage s'effectue par incubation du mélange 20 mn à 37°C. Les fragments d'ADN sont ensuite séparés et purifiés en gel de polyacrylamide non-dénaturant.

Par contre, les fragments ayant des extrémités 3' protubérantes ou devant conserver des extrémités cohésives (pour les expériences de circularisation de l'ADN) ou encore devant avoir la même radioactivité spécifique (pour le test de permutation circulaire) sont marqués en 5'. Pour cela, le fragment d'ADN libéré du plasmide par les enzymes de restriction est d'abord déphosphorylé par 10 unités de phosphatase alcaline (Boehringer) 30 mn à 37°C. La réaction est stoppée par chauffage 15 mn à 65°C avant d'être déprotéinisée par extraction au phénol/chloroforme et précipitée à l'éthanol. L'ADN est alors marqué par ajout en 5' d'un groupement phosphate marqué au ^{32}P , par action de 10 unités de polynucléotide kinase (Boehringer) en présence de 40 μCi de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (3 000 Ci/mM, Amersham) dans le tampon spécifique à l'enzyme et pour 1 h à 37°C. L'ADN marqué est alors purifié en gel de polyacrylamide.

2. Marquage des oligonucléotides synthétiques

Ces séquences d'ADN simple brin sont synthétisées non phosphorylées en 5' par Eurogentec (Belgique). Ils sont marqués en 5' par la polynucléotide kinase avant d'être hybridés à l'oligonucléotide complémentaire par chauffage du mélange à 80°C et retour progressif à température ambiante. Afin de comparer les affinités relatives d'une protéine pour différents oligonucléotides ayant un brin en commun, celui-ci est marqué puis chaque moitié est hybridée à son pool d'oligonucléotide complémentaire afin d'obtenir des ADN ayant la même radioactivité spécifique. Les différentes séquences utilisées en retard en gel sont présentées dans les figures M2 et M3.

3. Marquage des ARN

L'ARN produit en bactérie est marqué par ligation en 5' d'une molécule de cytosine monophosphate (CMP) préalablement marquée par transfert d'un groupement phosphate- ^{32}P . Le CMP (3,3 mM) est incubé avec 40 μCi de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ en présence d'1 unité de polynucléotide kinase dans son tampon spécifique pendant 1 h à 37°C avant ajout de 1 mM

d'ATP non radioactif et incubation 15 mn en présence d'1 unité supplémentaire de polynucléotide kinase. La réaction est arrêtée par incubation 10 mn à 65°C.

La réaction de ligation est alors effectuée par ajout au mélange précédant de 300 pM de l'ARN à marquer, de 2 unités d'ARN ligase (Boehringer), d'1 unité d'inhibiteurs de RNase, dans 40 µL final de tampon de ligation pour une incubation d'1 h à température ambiante. L'ARN marqué est alors repris dans un volume de tampon de dépôt dénaturant [formamide 95 % ; EDTA 20 mM ; bleu de bromophénol 0,5 % ; xylène cyanol 0,5 %] , chauffé 5 mn à 80°C et déposé sur gel dénaturant de polyacrylamide à 10 %. Après migration, la partie du gel contenant l'ARN marqué est récupéré par élution dans de l'eau DEPC, purification dans un tube SPIN-X et précipitation à l'éthanol.

B. Interaction de protéines à la DNA-cellulose

La DNA-cellulose est composée de fragments d'ADN de séquence aléatoire immobilisés dans la réticulation de la cellulose. Les protéines radioactives, obtenues en lysat de réticulocytes ou produites en bactéries, sont mélangées à 50 µL de DNA-cellulose préalablement équilibrée dans le tampon de fixation [Tris-HCl 20 mM, pH 7,4 ; EDTA 1 mM ; Aprotinine 1 µg/mL ; NP-40 0,2 %, additionné de NaCl 40 mM]. L'incubation se fait dans 100 µL de ce tampon pendant 1 h à 4°C sous agitation douce. Après centrifugation 5 mn à 1000 g, le surnageant est enlevé et le culot lavé par 300 µL de tampon de fixation et incubation 5 mn sur la glace. Après 4 lavages par ce tampon, deux lavages par chacun des tampons d'élutions de même composition de base mais avec des concentrations saline croissantes (NaCl 100 mM ; 300 mM ; 500 mM ; 1 M, successivement). Chaque fraction récupérée est déposée sur gel de protéines dénaturant. Le gel sera séché avant d'être analysé et quantifié au PhosphorImager. La fixation de protéines radioactives sur de la cellulose exempte de tout ADN de même que sur de la cellulose contenant de l'ADN dénaturé a été testé de la même manière.

C. Détermination de séquences cibles par CASTing

La technique de *CASTing* (pour *Cyclic Amplification of Sequence Targeting*) permet de sélectionner, à partir d'un mélange d'oligonucléotides contenant une séquence aléatoire, le site de reconnaissance préférentiel d'une protéine ayant des capacités de liaison à l'ADN.

Pour cela, un oligonucléotide de 62 bases (R62) contenant en son centre une succession de 12 bases aléatoires est utilisé. Deux oligonucléotides R et F de 25 bases, correspondant pour le premier à la séquence 5' non dégénérée de l'oligonucléotide R62 et pour le second à la séquence complémentaire de la partie 3' connue du 62-mer, sont utilisés pour amplifier les séquences sélectionnées par la protéine (séquences figure M3).

Concrètement, 5 µg de l'oligonucléotide dégénéré R62 sont hybridés à 5 µg du *primer* F et rendus totalement double brin par action 30 mn à 37°C du fragment Klenow de l'ADN polymérase I (10 unités) en présence de dNTP. Le fragment double brin de 62 pb ainsi obtenu est mélangé à 50 ng de protéine purifiée GST-NX-HIS dans 100 µL de tampon de fixation [HEPES 20 mM, pH 7,9 ; KCl 100 mM, Glycérol 20 % ; BSA 10 mg/mL ; PMSF 1 mM ; aprotinine 1 µg/mL], additionné de 0,5 µg de poly(dI-dC).(dI-dC). Après 30 mn d'agitation douce à 4°C, 35 µL de billes de nickel pré-équilibrées dans le tampon de fixation sont ajoutés pour 15 mn supplémentaires. Une brève centrifugation permet alors de séparer les billes ayant retenu les protéines et leurs oligonucléotides associés du reste des oligonucléotides non sélectionnés. Le culot est lavé par 5 fois 1 mL de tampon avant d'être resuspendu dans 50 µL de tampon de PCR et chauffé 5 mn à 95°C. Le surnageant est alors soumis à 10 cycles de PCR (1 mn à 94°C, 1 mn à 65°C et 2 mn à 72°C par cycle) dans un volume final de 100 µL de tampon de PCR contenant 15 pM des *primers* R et F. Un aliquote de 20 µL des témoins positif et négatif de PCR sont déposés sur gel d'agarose 3 % en même temps que 20 µL de la sélection amplifiée. Si aucun ampligène n'est visualisé dans la piste de sélection de séquences cibles, 10 cycles supplémentaires de PCR sont effectués. Une série de 9 cycles de sélection-amplification des séquences cibles est effectuée en augmentant la stringence, ceci par augmentation de la quantité de compétiteur non-spécifique poly(dI-dC).(dI-dC) (jusqu'à 5 µg par réaction), de la concentration en KCl (jusqu'à 300 mM), du nombre de lavages (jusqu'à 15 lavages) et par diminution de la quantité de protéine de fusion GST-NX-HIS (jusqu'à 0,01 ng). Les fragments d'ADN ainsi sélectionnés sont alors clonés dans le vecteur pBSIIISK+ après digestion par les enzymes de restriction *Bam*HI (dans le *primer* R) et *Eco*RI (dans le *primer* F). Les clones recombinants sélectionnés sont séquencés afin de déterminer la séquence d'ADN cible de la protéine d'intérêt.

D. Retard en gel

Cette technique permet de visualiser l'interaction entre une protéine et une sonde d'acide nucléique marquée, ceci grâce à la différence de mobilité en gel de polyacrylamide d'un complexe protéine-sonde par rapport à celle de la sonde seule.

La protéine purifiée (10 nM à 1 μ M) ou 10 à 15 μ g d'extraits nucléaires sont incubés 20 mn à 30°C avec 10 000 CPM de sonde marquée dans 20 μ L final de tampon D [HEPES 50 mM, pH 7,9 ; KCl 100 mM ; EDTA 0,1 mM ; glycérol 20 %] additionné de BSA 15 μ g et de poly(dI-dC).(dI-dC) (500 à 1 000 fois en excès molaire par rapport à la sonde) comme compétiteur non-spécifique. Lors d'expériences de compétition, les compétiteurs froids (oligonucléotides, fragments d'ADN plasmidique ou ligand du petit sillon de l'ADN) sont ajoutés au mélange protéine-sonde avant incubation 20 mn à 30°C. Les échantillons sont ensuite déposés délicatement dans les puits d'un gel de polyacrylamide de 4 à 8 % (rapport acrylamide/bisacrylamide 80/1) dans le tampon de migration TAE 0,7X (Tris-HCl 4,7 mM ; ACoNa 2,3 mM ; EDTA 0,7 mM ; pH 7,9), après une pré-migration 1 h à 100V. L'électrophorèse s'effectue à 35 mA pendant 2 h. Le gel est ensuite séché sous vide et révélé par autoradiographie ou au PhosphorImager.

E. Empreinte à la DNase I

Cette technique permet de localiser le site de fixation exact d'une protéine par digestion ménagée à la DNase I des séquences d'ADN non protégées par la protéine (Graves *et al.*, 1986). Une sonde ADN marquée à l'une ou l'autre de ses extrémités (50 000 CPM) est mélangé à la protéine à tester ou à la BSA (comme contrôle) dans 50 μ L de tampon [HEPES 20 mM, pH 7,9 ; KCl 100 mM ; MgCl₂ 12,5 mM ; glycérol 20 % ; DTT 1 mM ; PMSF 1 mM] additionné de poly(dI-dC).(dI-dC) et de polyvinyl alcool 2 %. Après incubation 20 mn à 30°C, 50 μ L de solution [CaCl₂ 5 mM, EDTA 1,5 mM] sont ajoutés ainsi que 0,01 à 0,05 unités de DNase I pendant 30 secondes à 2 mn à température ambiante. La réaction est stoppée par addition de 100 μ L de solution [NaCl 100 mM ; EDTA 20 mM ; SDS 1 % ; t-RNA 50 μ g/mL] suivie de deux extractions au phénol/chloroforme avant que les fragments d'ADN digérés ne soient précipités à l'éthanol. L'ADN est repris dans 10 μ L de solution

dénaturante [formamide 95 % ; EDTA 20 mM ; bleu de bromophénol 0,5 %] chauffés 5 mn à 80°C et déposés sur gel de polyacrylamide dénaturant à 8 % en même temps qu'une piste contrôle appelée G-track, montrant la localisation des guanines dans le brin d'ADN testé. Les guanines sont révélées par digestion chimique à la pipéridine. La sonde (50 000 CPM) est incubée 3 mn sur la glace dans 200 µL de tampon [cacodylate de sodium 50 mM ; EDTA 1 mM] avec 1 µL de DMS (diméthyl sulfate). Le DMS transfère un groupement méthyle sur les guanines de la sonde. La réaction est stoppée par 50 µL de solution G-stop [acétate de sodium 1,5 M ; β-mercaptoéthanol 1 M ; t-RNA 100 µg/mL]. L'ADN méthylé est précipité à l'éthanol, lavé et séché sous vide. Le culot est repris dans 100 µL de pipéridine 10 % permettant la digestion au niveau des guanines méthylées par incubation 30 mn à 90°C. Le mélange est séché sous vide et repris dans le tampon de dépôt dénaturant pour être déposé sur gel. Le gel est ensuite séché et autoradiographié ou analysé au PhosphorImager.

F. Interaction de protéines avec des oligonucléotides fixés sur des colonnes

Afin d'obtenir des colonnes d'affinité sur lesquelles sont fixés de manière covalente les oligonucléotides *bubble* ou duplex linéaire de 56 pb, nous avons utilisé le kit OligoLink (Pierce) pour permettre d'obtenir des oligonucléotides modifiés de manière à générer une extrémité thiol qui sera ensuite utilisée pour fixer de manière covalente les oligonucléotides sur des colonnes d'affinité en utilisant le kit SulfoLink (Pierce).

Les oligonucléotides de 56 pb linéaire ou *bubble* non phosphorylés en 5' (50 µg de chaque) sont tout d'abord marqué en 5' par la polynucléotide kinase en présence de 100 µCi de [γ -³²P]ATP (3 000 Ci/mM, Amersham) suivie d'une chasse en présence d'ATP non radioactif de manière à obtenir un pool faiblement marqué d'oligonucléotides aux extrémités phosphorylées, ceci afin de vérifier l'efficacité de la fixation aux différentes colonnes. Les oligonucléotides sont alors précipités, lavés et séchés avant que le culot ne soit repris dans 5 µL d'eau déminéralisée. L'ADN est ensuite mélangé à 25 µL de la solution de dérivation du kit OligoLink contenant de la cystamine et 5 mg de EDC et incubé 30 mn à 50 °C en agitation constante de manière à permettre la fixation covalente de la cystamine sur l'extrémité hydroxyl du groupement phosphate en 5' de l'oligonucléotide. Le mélange est ensuite déposé dans une colonne contenant 200 µL de matrice OligoLink et le tampon de fixation du kit, puis

incubé 15 mn à température ambiante et en agitation douce. Après une brève centrifugation pour éliminer les oligonucléotides non retenus, la colonne est lavée par 500 µL de tampon de fixation puis par 500 µL de tampon de lavage du kit. Les oligonucléotides sont ensuite récupérés de la colonne par réduction du pont disulfure de la cystamine grâce à l'addition de 0,66 µg de DTT dans 500 µL de tampon de lavage et incubation 10 mn à température ambiante, suivi de 4 lavages par 500 µL de tampon de lavage et une incubation de 10 mn à 55°C dans une solution d'EDTA à 10 mM. L'oligonucléotide, modifié ainsi par ajout d'un résidu cystéine avec une extrémité thiol, est alors récupéré par une brève centrifugation et fixé de manière covalente sur les colonnes SulfoLink. Pour cela, les oligonucléotides sont repris dans 2 mL de tampon de couplage du kit SulfoLink et déposés sur les colonnes de billes d'agarose préalablement équilibrées dans ce même tampon. Après 30 mn d'agitation de la colonne, le tampon et les oligonucléotides non fixés sont éliminés par écoulement au travers de la colonne, suivi d'un lavage par trois fois 6 mL du tampon de couplage. Les sites de fixation aux groupements thiol restant libres sur la colonne sont bloqués par ajout de 2 mL d'une solution de L-cystéine-HCl à 0,05 M dans le tampon de couplage et incubation 30 mn à température ambiante. Les colonnes sont ensuite lavées par 4 fois 4 mL de tampon de lavage du kit SulfoLink puis 4 fois 4 mL d'une solution d'azide de sodium à 0,05 %. 50µL des billes d'agarose fixant ainsi de manière covalente les oligonucléotides duplex ou *bubble* de 56 pb sont alors utilisées pour tester la fixation de protéines radioactives produites en lysat de réticulocytes de la même manière que pour les colonnes de DNA-cellulose. Les protéines retenues par les oligonucléotides fixés sur les billes de la colonnes sont éluées par différentes concentrations de solution salines. Les différentes fractions obtenues sont séparés en gel de protéine dénaturant pour être analysés au PhosphorImager.

G. South-Western blot

Afin de pouvoir visualiser à la fois l'interaction protéine-ADN et la masse moléculaire apparente des protéines impliquées dans cette interaction, les protéines sont séparées en gel de polyacrylamide dénaturant à 15 % et transférées sur membrane de nitrocellulose (voir chapitre V) avant d'être incubée avec une sonde ADN.

Brièvement, la membrane est saturée à 45°C pendant 1 h dans 50 mL de tampon Blotto [lait écrémé en poudre 5 % ; Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 ; NaCl 50 mM ; EDTA 1 mM ;

DTT 1 mM] puis lavée par deux fois 50 mL de tampon de fixation [Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 ; NaCl 50 mM ; EDTA 1 mM ; DTT 1 mM]. La sonde ($2 \cdot 10^6$ CPM/mL) est alors incubée avec la membrane pendant 2 h à température ambiante et sous agitation dans le tampon de fixation additionné d'ADN soniqué de sperme de hareng (1 µg/mL). Les fixations non spécifiques sont éliminées par 3 à 5 lavages avec 50 mL de tampon de fixation. La membrane est enfin révélée au PhosphorImager. La masse moléculaire apparente des protéines complexées à la sonde est déterminée par comparaison aux marqueurs de taille pré-colorés et par vérification de l'identité des protéines par Western Blot.

H. Test de permutation circulaire

Cette technique (Wu and Crothers, 1984) permet de mettre en évidence, par un test simple, la capacité d'une protéine à courber sa séquence cible ainsi que son angle de torsion, ceci grâce à la différence de migration en gel d'un fragment tordu en son centre ou en un endroit plus proche des extrémités. Cette expérience nécessite l'obtention d'une série de fragments de même taille et de séquence homologue hormis la présence en différentes positions de la séquence de fixation de la protéine à tester. Pour ce faire, le fragment compris entre les sites de restriction *Bam*HI et *Eco*RI du polylinker du vecteur pALTER-EX1 a été récupéré par coupure du site *Bam*HI, rendu franc, puis digestion du site *Eco*RI. Ce fragment [*Bam*HI^{Blunt}-*Eco*RI] est cloné entre les sites de restriction *Eco*RI et *Xho*I (rendu franc) du vecteur pBSIIISK contenant la séquence 05 sélectionnée par CASTing (permettant l'obtention du vecteur intermédiaire pBSIIISK-05m). De la même manière, le même fragment du polylinker du vecteur pALTER-EX1, mais rendu franc de l'autre extrémité (*Bam*HI-*Eco*RI^{Blunt}), est cloné entre les sites *Xba*I (rendu franc) et *Bam*HI du vecteur pBSIIISK-05m. Le vecteur pBEND-05 ainsi obtenu est digéré, par les enzymes de restriction du polylinker du pALTER-EX1 placé ainsi en tandem autour des séquences 05, au niveau des sites *Hpa*I, *Nco*I, *Pst*I, *Not*I, *Sph*I, *Nsi*I et *Bam*HI associé à *Dra*II (du polylinker du pBSIIISK). Les fragments d'ADN de 141 pb ainsi générés sont déphosphorylés puis marqués en 5' à la polynucléotide kinase en présence de [γ -³²P]ATP afin que tous aient la même radioactivité spécifique. Les sondes sont alors utilisées en retard en gel par incubation avec la protéine à tester.

I. Expériences de circularisation de l'ADN

Ce test permet également de déterminer la capacité d'une protéine à tordre l'ADN. Il est basé sur la capacité d'un fragment d'ADN de taille supérieure à 150 pb de former un ADN circulaire par ligation de ses deux extrémités compatibles. Un fragment d'ADN de longueur inférieure à 150 pb ne peut pas former d'anneau à lui seul, sauf si une protéine se fixant sur sa séquence cible à l'intérieur du fragment d'ADN tord celui-ci de manière à permettre aux deux extrémités de se rejoindre. La taille du fragment d'ADN pouvant se circulariser grâce à la torsion par la protéine dépend de l'angle de torsion que la protéine induit à la double hélice d'ADN.

Pour l'obtention d'un fragment d'ADN ne pouvant se circulariser par lui-même, la séquence *XbaI-BamHI* du polylinker du vecteur pcDNA3 a été inséré entre les sites de restriction *XbaI* et *BamHI* du vecteur pBSIIISK contenant la séquence cible 05 issue du *CASTing*. Cette construction peut ensuite être digérée par les sites de restriction *XhoI* (présents l'un dans le polylinker du pcDNA3, l'autre en aval de la séquence 05 dans le polylinker du vecteur pBSIIISK) et permettre ainsi l'obtention d'un fragment d'ADN de 121 pb. Les fragments *BssHII-BssHII* des vecteurs pBSIIISK-05 (191 pb), pBSIIISK-05m (249 pb) et pBEND-05 (302 pb), pouvant tous former intrinsèquement des cercles, ont également été utilisés pour cette expérience. Les fragments sont déphosphorylés avant d'être marqués en 5' à la polynucléotide kinase et purifiés sur gel de polyacrylamide. Chaque sonde (10 000 CPM) est incubée 20 mn à 30°C, avec ou sans la protéine à tester, dans 20 µL de tampon de ligation. La ligation est ensuite effectuée par incubation d'une unité d'ADN ligase T4 (Life Science) dans le mélange pendant 15 mn à température ambiante. La réaction est stoppée par chauffage 15 mn à 65°C. L'identité de l'ADN circulaire est vérifiée dans les tubes contrôles par digestion de l'ADN linéaire par 30 unités d'exonucléase III (Boehringer) pendant 1 h à 37°C. Les produits de ligation sont alors déposés sur gel de polyacrylamide de 4 à 6 % pour une migration à 60-70 V pendant 16 h. Le gel est alors séché sous vide et analysé au PhosphorImager.

J. Test de relaxation de l'ADN

Cette technique repose sur la capacité de la topoisomérase I de couper un brin de la double hélice d'ADN, permettant ainsi la détorsion d'un ADN superenroulé, et de religaturer ensuite les extrémités du brin d'ADN. La digestion modérée d'un plasmide superenroulé par la topoisomérase I permet ainsi l'obtention de topoisomères correspondant à des formes plus ou moins enroulées sur elles-mêmes du plasmide. La fixation d'une protéine ayant la capacité de tordre l'ADN sur des séquences du plasmide tend à empêcher la relaxation du plasmide par la coupure de la topoisomérase I.

Concrètement, 0,77µg de plasmide superenroulé est incubé avec différentes concentrations de la protéine à tester pendant 15 mn dans le tampon de relaxation [Tris-HCl 50 mM, pH 7,8 ; KCl 50 mM ; MgCl₂ 10 mM ; DTT 1 mM ; EDTA 1 mM]. Le plasmide est ensuite coupé par 4 unités d'ADN topoisomérase I de thymus de veau (TopoGen) et incubation 1 h à 37°C. Les complexes protéine/plasmide/topoisomérase I sont ensuite dissociés par addition de SDS (0,25 % final) et de protéinase K (250 µg/mL final, Boehringer). Les échantillons sont alors déposés sur gel d'agarose à 1 % pour une migration de 3 à 4 h sous une tension de 90V. Le gel est ensuite visualisé et photographié sous UV.

K. Test de fusion de l'ADN

Cette technique consiste à mesurer, en continu, la DO₂₆₀ d'une solution d'ADN soumise à une augmentation de température progressive de 20 à 90°C (avec une augmentation de 1°C/mn) à l'aide d'un spectrophotomètre Uvikon 943 couplé à un système de chauffage Neslab RTE111. Une quantité d'ADN à tester, correspondant au minimum à une DO₂₆₀ finale de 0,1, est mélangée à 1 mL de tampon BPE (Na₂HPO₄ 6 mM ; NaH₂PO₄ 2 mM ; EDTA 1 mM ; pH 7,1), auquel est ajouté ou non 10 nM final de protéine GST-NX-HIS ou 10 nM final de BSA. La courbe obtenue reflète la fusion de l'ADN et permet de déterminer son point de fusion T_m, en présence ou non de la protéine GST-NX-HIS.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adams, J.M., Houston, H., Allen, J., Lints, T. & Harvey, R.** 1992. The hematopoietically expressed *vav* proto-oncogene shares homology with the *dbl* GDP-GTP exchange factor, the *bcr* gene and a yeast gene (*CDC24*) involved in cytoskeletal organisation. *Oncogene*, **7**, 611-618.
- Aizawa, S., Nishini, H., Saito, K., Kimura, K., Shirakawa, H. & Yoshida, M.** 1994. Stimulation of transcription in cultured cells by high mobility group protein 1: essential role of the acidic carboxyl-terminal region. *Biochemistry*, **33**, 14690-14695.
- Alfonso, P.J., Crippa M.P., Hayes, J.J. & Bustin, M.** 1994. The footprint of chromosomal proteins HMG-14 and HMG-17 on chromatin subunits. *J. Mol. Biol.*, **236**, 189-198.
- Alitalo, K., Winqvist, R., Lin, C.C., de la Chapelle, A., Schwab, M., & Bishop, J.M.** 1984. Aberrant expression of an amplified *c-myb* oncogene in two cell lines from a colon carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 4534-4538.
- Allen, P.B., Morgan, G.J. & Wiedemann, L.M.** 1992. Philadelphia chromosome-positive leukaemia: the translocated genes and their gene products. *Baillere's Clinical Haematology*, **4**, 897-930.
- Amaravadi, L. & King, M.W.** 1994. Characterization and expression of the *xenopus* *c-Myb* homolog. *Oncogene*, **9**, 971-974.
- Andoniou, C.E., Thien, C.B.F. & Langdon, W.Y.** 1994. Tumour induction by activated *abl* involves tyrosine phosphorylation of the product of the *cbl* oncogene. *EMBO J.*, **13**, 4515-4523.
- Andreasson, P., Johansson, B., Carlsson, M., Jarsfelt, I., Fioretos, T., Mitelman, F. & Höglund, M.** 1997. *BCR/ABL*-negative Chronic Myeloid Leukemia with *ETV6/ABL* fusion. *Genes, Chrom. & Cancer*, **20**, 299-304.
- Anfossi, G., Gewirtz, A.M. & Calabretta, B.** 1989. An oligomer complementary to *c-myb*-encoded mRNA inhibits proliferation of human myeloid leukemia cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 3379-3383.
- Anton, I.A. & Frampton, J.** 1988. Tryptophans in *myb* proteins. *Nature*, **336**, 719.
- Arcinas, M., Sizer, K.C. & Boxer, L.M.** 1994. Activation of *c-myc* expression by *c-Abl* is independent of both the DNA binding function of *c-Abl* and the *c-myc* EP site. *J. Biol. Chem.*, **269**, 21919-21924.
- Arlinghaus, R.B.** 1992. Multiple *BCR*-related gene products and their proposed involvement in ligand-induced signal transduction pathways. *Mol. Carcin.*, **5**, 171-173.

- Arsura, M., Introna, M., Passerini, F., Mantovani, A. & Golay, J.** 1992. B-*myb* antisense oligonucleotides inhibit proliferation of human hematopoietic cell lines. *Blood*, **79**, 2708-2716.
- Aziz, N., WU, J., Dubendorff, J.W., Lipsick, J.S., Sturgill, T.W. & Bender, T.P.** 1993. C-Myb and v-Myb are differentially phosphorylated by p42^{mapk} *in vitro*. *Oncogene*, **8**, 2259-2265.
- Aziz, N., Miglarese, M.R., Hendrickson, R.C., Shabanowitz, J., Sturgill, T.W., Hunt, D.F. & Bender, T.P.** 1995. Modulation of c-Myb-induced transcription activation by a phosphorylation site near the negative regulatory domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 6429-6433.
- Badiani, P., Corbella, P., Kioussis, D., Marvel, J. & Weston, K.** 1994. Dominant interfering alleles define a role for c-Myb in T-cell development. *Genes Dev.*, **8**, 770-782.
- Bailly, C., Minnock, A. & Waring, M.J.** 1996a. A simple ligation assay to detect effects of drugs on the curvature/flexibility of DNA. *FEBS Lett.*, **396**, 253-256.
- Bailly, C., Payet, D., Travers, A.A. & Waring, M.J.** 1996b. PCR-based development of DNA substrates containing modified bases : An efficient system for investigating the role of the exocyclic groups in chemical and structural recognition by minor groove binding drugs and proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 13623-13628.
- Baluda, M.A., & Reddy, E.P.** 1994. Anatomy of an integrated avian myeloblastosis provirus : structure and function. *Oncogene*, **9**, 2761-2774.
- Baranowskij, N., Frohberg, C., Prat, S. & Willmitzer, L.** 1994. A novel DNA binding protein with homology to Myb oncoproteins containing only one repeat can function as a transcriptional activator. *EMBO J.*, **13**, 5383-5392.
- Baskaran, R., Dahmus, M.E. & Wang, J.Y.J.** 1993. Tyrosine phosphorylation of mammalian RNA polymerase II carboxyl-terminal domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 11167-11171.
- Baskaran, R., Chiang, G.G. & Wang, J.Y.J.** 1996. Identification of a binding site in c-Abl tyrosine kinase for the C-terminal repeated domain of RNA polymerase II. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 3361-3369.
- Baskaran, R., Wood, L.D., Whitaker, L.L., Canman, C.E., Morgan, S.E., Xu, Y., Barlow, C., Baltimore, D., Wynshaw-Boris, A., Kastan, M.B. & Wang, J.Y.J.** 1997. Ataxia telangiectasia mutant protein activates c-Abl tyrosine kinase in response to ionizing radiation. *Nature*, **387**, 516-519.
- Baxevanis, A.D., Bryant, S.H. & Landsman, D.** 1995. Homology model building of the HMG-1 box structural domain. *Nucleic Acids Res.*, **23**, 1019-1029.

- Baxevanis, A.D. & Landsman, D.** 1995. The HMG-1 box protein family : classification and functional relationships. *Nucleic Acids Res.*, **23**, 1604-1613.
- Bedi, A., Zehnbaauer, B.A., Barber, J.P., Sharkis, S.J. & Jones, R.J.** 1994. Inhibition of apoptosis by BCR-ABL in chronic myeloid leukemia. *Blood*, **83**, 2038-2044.
- Bellon, S.F. & Lippard, S.J.** 1990. Bending studies of DNA site-specifically modified by cisplatin, trans-diamminedichloroplatinium(II) and cis-[Pt(NH₃)₂(N₃-cytosine)Cl]⁺. *Biophys. Chem.*, **35**, 179-188.
- Bender, T.P. & Kuehl, W.M.** 1986. Murine *myb* protooncogene mRNA : cDNA sequence and evidence for 5' heterogeneity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 3204-3208.
- Ben-Levy, R., Faktor, O., Berger, I., & Shaul, Y.** 1989. Cellular factors that interact with the hepatitis B virus enhancer. *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 1804-1809.
- Benn, J. & Schneider, R.J.** 1994. Hepatitis B virus HBX protein activates Ras-GTP complex formation and establishes a Ras, Raf, MAP kinase signalling cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 10350-10354.
- Ben-Neriah, Y., Bernard, A., Poskind, M., Daley, G.Q. & Baltimore, D.** 1986. Alternative 5' exons in *c-abl* mRNA. *Cell*, **44**, 577-586.
- Bennett, R.L. & Hoffmann, F.M.** 1992. Increased levels of the Drosophila Abelson tyrosine kinase in nerves and muscles : subcellular localization and mutant phenotypes imply a role in cell-cell interactions. *Development*, **116**, 953-966.
- Bernard, A., Rubin, C.M., Westbrook, C.A., Paskind, M. & Baltimore, D.** 1987. The first intron in human *c-abl* gene is at least 200 kilobases long and is a target for translocations in chronic myelogenous leukemia. *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 3231-3236.
- Besmer, P., Hardy, Jr.W.D., Zuckerman, E.E., Bergold, P., Lederman, L. & Snyder, Jr.H.W.** 1983. The Hardy-Zucherman 2-FeSV, a new feline retrovirus with oncogene homology to Abelson-MuLV. *Nature*, **303**, 825-828.
- Bhat, A., Kolibaba, K., Oda, T., Ohno-Jones, S., Heaney, C. & Druker, B.J.** 1997. Interactions of CBL with BCR-ABL and CRKL in BCR-ABL-transformed myeloid cells. *J. Biol. Chem.*, **272**, 16170-16175.
- Bianchi, M.E., Beltrame, M. & Paonessa, P.** 1989. Specific recognition of cruciform DNA by nuclear protein HMG1. *Science*, **243**, 1056-1059.
- Biedenkapp, H., Borgmeyer, U., Sippel, A.E. & Klempnauer, K.-H.** 1988. Viral *myb* oncogene encodes sequence specific DNA-binding activity. *Nature*, **335**, 835-837.
- Birchenall-Roberts, M.C., Ruscetti, F.W., Kasper, J.J., Bertolette III, D.C., Yoo, Y.D., Bang, O.-S., Roberts, M.S., Truley, J.M., Ferris, D.K. & Kim, S.-J.** 1995. Nuclear localization of v-Abl leads to complex formation with cyclic AMP response element

- (CRE)-binding protein and transactivation through CRE motifs. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 6088-6099.
- Blake, M., Niklinski, J. & Zajac-Kaye, M.** 1996. Interactions of the transcription factors MIBP1 and RFX1 with the EP element of the hepatitis B virus enhancer. *J. Virol.*, **70**, 6060-6066.
- Boccia, L.M., Lillicrap, D., Newcombe, E. & Mueller, C.R.** 1996. Binding of the Ets factor GA-binding protein to an upstream site in the factor IX promoter is a critical event in transactivation. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 1929-1935.
- Bolen, J.B.** 1993. Non receptor tyrosine protein kinases. *Oncogene*, **8**, 2025-2031.
- Bonnefoy, E., Takahashi, M. & Rouviere-Yaniv, J.** 1994. DNA-binding parameters of the HU protein of *Escherichia coli* to cruciform DNA. *J. Mol. Biol.*, **242**, 116-129.
- Bortner, D.M. & Ostrowski, M.C.** 1991. Analysis of the v-myb structural components important for transactivation of gene expression. *Nucleic Acids Res.*, **19**, 1533-1539.
- Bosselut, R., Lim, F., Romond, P.C., Frampton, J., Brady, J., & Ghysdael, J.** 1992. Myb protein binds to multiple sites in the human T cell lymphotropic virus type 1 long terminal repeat and transactivates LTR-mediated expression. *Virology*, **186**, 764-769.
- Boulikas, T.** 1994. Myb proteins « talking » to their DNA. *Intern. J. Oncol.*, **5**, 101-109.
- Bramham, J. & Norman, D.G.** 1995. hSRY : molecular gender bender. *Structure*, **3**, 631-633.
- Britos-Bray, M. & Friedman, A.D.** 1997. Core Binding Factor cannot synergistically activate the myeloperoxidase proximal enhancer in immature myeloid cells without c-Myb. *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 5127-5135.
- Brown, K.E., Kindy, M.S. & Sonenshein, G.E.** 1992. Expression of the c-myb proto-oncogene in bovine vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, **267**, 4625-4630.
- Bruhn, S.L., Pil, P.M., Essigmann, J.M. & Housman, D.E.** 1992. Isolation and characterization of human cDNA clones encoding a high mobility group box protein that recognizes structural distortions to DNA caused by binding of the anticancer agent cisplatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 2307-2311.
- Burk, O., Mink, S., Ringwald, M., & Klempnauer, K.H.** 1993. Synergistic activation of the chicken *mim-1* gene by v-myb and C/EBP transcription factors. *EMBO J.*, **12**, 2027-2038.
- Bustin, M., Lehn, D.A. & Landsman, D.** 1990. Structural features of the HMG chromosomal proteins and their genes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1049**, 231-243.

- Bustin, M. & Reeves, R.** 1996. High-mobility-group chromosomal proteins : architectural components that facilitate chromatin function. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **54**, 35-100.
- Butler, A.P., Mardian, J.K.W. & Olins, D.E.** 1985. Nonhistone chromosomal protein HMG 1 interactions with DNA. Fluorescence and thermal denaturation studies. *J. Biol. Chem.*, **260**, 10613-10620.
- Calabretta, B., Sims, R.B., Valtieri, M., Caracciolo, D., Szczylik, C., Venturelle, D., Ratajczak, M., Beran, M. & Gewirtz, A.M.** 1991. Normal and leukemic hematopoietic cells manifest differential sensitivity to inhibitory effects of *c-myb* antisense oligodesoxynucleotides : An *in vitro* study relevant to bone marrow purging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 2351-2355.
- Caldecott, K.W., Tucker, J.D., & Thompson, L.H.** 1992. Construction of human *XRCC1* minigenes that fully correct the CHO DNA repair mutant EM9. *Nucleic Acids Res.*, **20**, 4575-4579.
- Cao, Z., Umek, R.M. & McKnight, S.L.** 1991. Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev.*, **5**, 1538-1552.
- Caracciolo, D., Valtieri, M., Venturelli, D., Peschle, C., Gewirtz, A.M. & Calabretta, B.** 1989. Lineage-specific requirement of *c-abl* function in normal haematopoiesis. *Science*, **245**, 1107-1109.
- Chen, J.H., Moscovici, M.G. & Moscovici, C.** 1980. Isolation of complementary DNA unique to the genome of avian myeloblastosis virus (AMV). *Virology*, **103**, 112-122.
- Chen, Q., Turner, J., Watson, A.J.M. & Dive, C.** 1997. V-Abl protein tyrosine kinase (PTK) mediated suppression of apoptosis is associated with the up-regulation of Bcl-X_L. *Oncogene*, **15**, 2249-2254.
- Chen, R.-H. & Lipsick, J.S.** 1993. Differential transcriptional activation by v-Myb and c-Myb in animal cells and *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 4423-4431.
- Chen, R.-H., Fields, S. & Lipsick, J.S.** 1995. Dissociation of transcriptional activation and oncogenic transformation by v-Myb. *Oncogene*, **11**, 1771-1779.
- Chenaval, D., Christy, R.J., Geiman, D., Cornelius, P. & Lane, M.D.** 1991. Cell-free transcription directed by the 422 adipose P2 gene promoter : Activation by the CCAAT/enhancer binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 8465-8469.
- Churchill, M.E.A., Jonas, D.N.M., Glaser, T., Hefner, H., Searles, M.A. & Travers, A.A.** 1995. HMG-D is an architecture-specific protein that preferentially binds to DNA containing the dinucleotide TG. *EMBO J.*, **14**, 1264-1275.
- Churchill, M.E.A. & Suzuki, M.** 1989. "SPKK" motifs prefer to bind to DNA at A/T-rich sites. *EMBO J.*, **8**, 4189-4195.

- Churchill, M.E.A. & Travers, A.A.** 1991. Protein motifs that recognize structural features of DNA. *Trends Biochem. Sci.*, **16**, 92-97.
- Chuvpilo, S., Schomberg, C., Gerwig, R., Heinfling, A., Reeves, R., Grummt, F. & Serfling, E.** 1993. Multiple closely-linked NFAT/octamer and HMG I(Y) binding sites are part of the interleukin-4 promoter. *Nucleic Acids Res.*, **21**, 5694-5704.
- Cicchetti, P., Mayer, B.J., Thiel, G. & Baltimore, D.** 1992. Identification of a protein that binds to the SH3 region of Abl and is similar to Bcr and GAP-rho. *Science*, **257**, 803-806.
- Cicchetti, P., Ridley, A.J., Zheng, Y., Cerione, R.A. & Baltimore, D.** 1995. 3BP-1, an SH3 domain binding protein, has GAP activity for Rac and inhibits growth factor-induced membrane ruffling in fibroblasts. *EMBO J.*, **14**, 3127-3135.
- Clarke, M.F., Kukowska, J.F., Westin, E., Smith, M. & Prochownik, E.V.** 1988. Constitutive expression of a *c-myb* cDNA blocks friend murine erythroleukemia cell differentiation. *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 884-892.
- Cogswell, J.P., Cogswell, P.C., Kuehl, W.M., Cuddihy, A.M., Bender, T.M., Engelke, U., Marcu, K.B. & Ting, J.P.-Y.** 1993. Mechanisms of *c-myc* regulation by c-Myb in different cell lineages. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 2858-2869.
- Cohen, G.B., Ren, R. & Baltimore, D.** 1995. Modular binding domains in signal transduction proteins. *Cell*, **80**, 237-248.
- Coll, J., Saule, S., Martin, P., Raes, M.B., Lagrou, C., Graf, T., Beug, H., Simon, I.E. & Stehelin, D.** 1984. The cellular oncogenes *c-myc*, *c-myb* and *c-erb* are transcribed in defined types of avian hematopoietic cells. *Exp. Cell Res.*, **149**, 151-162.
- Collyn-d'Hooghe, M., Vandewalle, B., Hornez, L., Lantoine, D., Revillion, F., Lefebvre, J. & Kerckaert, J.P.** 1991. *C-myc* overexpression, *c-mil*, *c-myb* expression in a breast tumor cell line. Effects of estrogen and antiestrogen. *Anticancer Res.*, **11**, 2175-2179.
- Cooper, C., Henderson, A., Artandi, S., Avitahl, N. & Calame, K.** 1995. Ig/EBP (C/EBP γ) is a transdominant negative inhibitor of C/EBP family transcriptional activators. *Nucleic Acids Res.*, **23**, 4371-4377.
- Crippa, M.P., Alfonso, P.J. & Bustin, M.** 1992. Nucleosome core binding region of chromosomal protein HMG-17 acts as an independent functional domain. *J. Mol. Biol.*, **228**, 442-449.
- Croniger, C., Trus, M., Lysek-Stupp, K., Cohen, H., Liu, Y., Darlington, G.J., Poli, V., Hanson, R.W. & Reshef, L.** 1997. Role of the isoforms of the CCAAT/enhancer-binding protein in the initiation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene transcription at birth. *J. Biol. Chem.*, **272**, 26306-26312.

- Dahmus, M.E.** 1995. Phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II. *Biochim. Biophys. Acta*, **1261**, 171-182.
- Dai, P., Akimura, H., Tanaka, Y., Hou, D.-X., Yasukawa, Y., Kanei-Ishii, C., Takahashi, T. & Ishii, S.** 1996. CBP as a transcriptional activator of c-Myb. *Genes Dev.*, **10**, 528-540.
- Dai, Z. & Pendergast, A.M.** 1995. Abi-2, a novel SH3-containing protein interacts with the c-Abl tyrosine kinase and modulates c-Abl transforming activity. *Genes Dev.*, **9**, 2569-2582.
- Daley, G.Q., Van Etten, R.A. & Baltimore, D.** 1990. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210^{bcr-abl} gene of the Philadelphia chromosome. *Science*, **247**, 824-829.
- Daley, G.Q. & Ben-Neriah, Y.** 1991. Implicating the bcr/abl gene in the pathogenesis of Philadelphia chromosome-positive human leukemia. *Origins of human cancer, Cold Spring Harbor-Laboratory press*, 151-183.
- Dang, C.V. & Lee, W.M.F.** 1989. Nuclear and nucleolar targeting sequences of c-erb-A, c-myb, N-myc, p53, HSP70, and HIV tat proteins. *J. Biol. Chem.*, **264**, 18019-18023.
- Dasgupta, P., Saikumar P., Reddy C.D. & Reddy, E.P.** 1990. Myb protein binds to human immunodeficiency virus 1 long terminal repeat (LTR) sequences and transactivates LTR-mediated transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 8090-8094.
- Dasgupta, P., Reddy, C.D., Saikumar, P. Reddy, E.P.** 1992. The cellular proto-oncogene product Myb acts as transcriptional activator of the Long Terminal repeat of the human T-Lymphotropic Virus type I. *J. Virol.*, **66**, 270-276.
- Dash, A.B., Orrico, F.C. & Ness, S.A.** 1996. The EVES motif mediates both intermolecular and intramolecular regulation of c-Myb. *Genes Dev.*, **10**, 1858-1869.
- Delfau, M.-H., Garbarz, M., Chaverroche, I. & Grandchamp, B.** 1988. Détection du messenger chimérique *abl-bcr* dans la leucémie myéloïde chronique. *Medecine Science*, **7**, 402-403.
- Deng, Q.-L., Ishii, S. & Sarai, A.** 1996. Binding site analysis of c-Myb : screening of potential binding sites by using the mutation matrix derived from systematic binding affinity measurements. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 766-774.
- Desbiens, X., Quéva, C., Jaffredo, T., Stéhelin, D. & Vandebunder, B.** 1991. The relationship between cell proliferation and the transcription of the nuclear oncogenes *c-myc*, *c-myb* and *c-ets-1* during feather morphogenesis in the chick embryo. *Development*, **111**, 699-713.

- Descombes, P., Chojkier, M., Lichtsteiner, S., Falvey, E. & Schibler, U.** 1990. LAP, a novel member of the C/EBP gene family, encodes a liver-enriched transcriptional activator protein. *Genes Dev.*, **4**, 1541-1551.
- Dhut, S., Chaplin, T. & Young, D.B.** 1990. BCR-ABL and BCR proteins : biochemical characterization and localization. *Leukemia*, **4**, 745-750.
- Diekmann, D., Brill, S., Garrett, M.D., Totty, N., Hsuan, J., Monfries, C., Hall, C., Lim, L. & Hall, A.** 1991. *Bcr* encodes a GTPase-activating protein for p21^{Rac}. *Nature*, **335**, 400-402.
- van Dijk, M.A., Rodenburg, R.J.T., Holthuisen, P. & Sussenbach, J.S.** 1992. The liver-specific promoter of the human insulin-like growth factor II gene is activated by the CCAAT/enhancer binding factor(C/EBP). *Nucleic Acids Res.*, **20**, 3099-3104.
- Dikstein, R., Faktor, O., Ben-Levy, R. & Shaul, Y.** 1990a. Functional organization of the Hepatitis B Virus enhancer. *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 3683-3689.
- Dikstein, R., Faktor, O. & Shaul, Y.** 1990b. Hierarchic and cooperative binding of the rat liver nuclear protein C/EBP at the hepatitis B virus enhancer. *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 4427-4430.
- Dikstein, R., Heffetz, D., Ben-Neriah, Y. & Shaul, Y.** 1992. c-Abl has a sequence-specific enhancer binding activity. *Cell*, **69**, 751-757.
- Dikstein, R., Amagi, R., Heffetz, D. & Shaul, Y.** 1996. p140/c-Abl that binds DNA is preferentially phosphorylated at tyrosine residues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 2387-2391.
- Dini, P.W. & Lipsick, J.S.** 1993. Oncogenic truncation of the first repeat of c-Myb decreases DNA binding *in vitro* and *in vivo*. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 7334-7348.
- Dini, P.W., Eltman, J.T. & Lipsick, J.S.** 1995. Mutations in the DNA-binding and transactivational activation domains of v-Myb cooperate in transformation. *J. Virol.*, **69**, 2515-2524.
- Doria, M., Klein, N., Lucito, R. & Schneider, R.J.** 1995. The hepatitis B virus HBx protein is a dual specificity cytoplasmic activator of Ras and nuclear activator of transcription factors. *EMBO J.*, **14**, 4747-4757.
- Drew, H.R., Weeks, J.R. & Travers, A.A.** 1985. Negative supercoiling induces spontaneous unwinding of a bacterial promoter. *EMBO J.*, **4**, 1025-1032.
- Du, W. & Maniatis, T.** 1994. The high mobility group protein HMG I(Y) can stimulate or inhibit DNA binding of distinct transcription factor ATF-2 isoforms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 11318-11322.

- Dubendorff, J.W., Whittaker, L.J., Eltman, J.T. & Lipsick, J.S.** 1992. Carboxy-terminal elements of c-Myb negatively regulate transcriptional activation in *cis* and in *trans*. *Genes Dev.*, **6**, 2524-2535.
- Dudek, H. & Reddy, E.P.** 1989. Murine myeloid leukemias with aberrant *myb* loci show heterogeneous expression of novel *myb* proteins. *Oncogene*, **4**, 1489-1495.
- Durand, B., Kobr, M., Reith, W. & Mach, B.** 1994. Functional complementation of Major Histocompatibility Complex class II regulatory mutants by the purified X-box-binding protein RFX1. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 6839-6847.
- Duyster, J., Baskaran, R. & Wang, J.Y.J.** 1995. Src homology 2 domain as a specificity determinant in the c-Abl-mediated tyrosine phosphorylation of the RNA polymerase II carboxyl-terminal repeated domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 1555-1559.
- Ebneth, A., Schweers, O., Thole, H., Fagin, U., Urbanke, C., Maass, G. & Wolfes, H.** 1994. Biophysical characterization of the c-Myb DNA-binding domain. *Biochemistry*, **33**, 14586-14593.
- Elfassi, E., Romet-Lemonne, J.L., Essex, M., Frances-Mc Lane, M., & Haseltine, W.A.** 1984. Evidence of extrachromosomal forms of hepatitis B viral DNA in a bone marrow culture obtained from a patient recently infected by hepatitis B virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 3526-3528.
- Elfassi, E.** 1987. Broad specificity of the hepatitis B enhancer function. *Virology*, **160**, 259-262.
- Elkins, T., Zinn, K., McAllister, L. Hoffmann, F.M. & Goodman, C.S.** 1990. Genetic analysis of a Drosophila neural adhesion molecule: interaction of fasciclin I and Abelson tyrosine kinase mutations. *Cell*, **60**, 565-575.
- Emery, P., Strubin, M., Hofmann, K., Bucher, P., Mach, B. & Reith, W.** 1996. A consensus motif in the RFX1 DNA binding domain and binding domain mutants with altered specificity. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 4486-4494.
- Engelke, U. & 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.
- Engelke, U., Smarda, J. & Lipsick, J.S.** 1995. By-pass of TPA-induced differentiation and cell cycle arrest by the c-Myb DNA-binding domain. *Oncogene*, **11**, 735-741.
- Ess, K.C., Whitaker, T.L., Cost, G.J., Witte, D.P., Hutton, J.J., & Aronow, B.J.** 1995. A central role for a single c-Myb binding site in a thymic locus control region. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 5707-5715.

- Evans, C.A., Owen-Lynch, P.J., Whetton, A.D. & Dive, C.** 1993. Activation of the Abelson tyrosine kinase activity is associated with suppression of apoptosis in hemopoietic cells. *Cancer Res.*, **53**, 1735-1738.
- Evans, J.L., Moore, T.L., Kuehl, W.M., Bender, T., & Ting, J. P.-Y.** 1990. Functional analysis of c-Myb protein in T-lymphocytic cell lines shows that it *trans*-activates the *c-myc* promoter. *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 5747-5752.
- Fainstein, E., Einat, M., Gokkel, E., Marcelle, C., Croce, C.M., Gale, R.P. & Cannani, E.** 1989. Nucleotide sequence analysis of human *abl* and *bcr-abl* cDNAs. *Oncogene*, **4**, 1477-1481.
- Faktor, O., Budlovsky, S., Ben-Levy, R., & Shaul, Y.** 1990. A single element within the hepatitis B virus enhancer binds multiple proteins and responds to multiple stimuli. *J. Virol.*, **64**, 1861-1863.
- Falciola, L., Murchie, A.I.H., Lilley, D.M.J. & Bianchi, M.E.** 1994. Mutational analysis of the DNA binding domain A of chromosomal protein HMG1. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 285-292.
- Favier, D. & Gonda, T.J.** 1994. Detection of proteins that bind to the leucine zipper motif of c-Myb. *Oncogene*, **9**, 305-311.
- Feller, S.M., Ren, R., Hanafusa, H. & Baltimore, D.** 1994. SH2 and SH3 domains as molecular adhesives : the interactions Crk and Abl. *TIBS*, **19**, 453-458.
- Ferrao, P., Macmillan, E.M., Ashman, L.K. & Gonda, T.J.** 1995. Enforced expression of full length c-Myb leads to density-dependant transformation of murine haemopoietic cells. *Oncogene*, **11**, 1631-1638.
- Ferrari, S., Harley, V.R., Pontiggia, A., Goodfellow, P.N., Lovell-Badge, R. & Bianchi, M.E.** 1992. SRY, like HMG1, recognizes sharp angles in DNA. *EMBO J.*, **11**, 4497-4502.
- Foos, G., Grimm, S. & Klempnauer, K.-H.** 1993. Functional antagonism between members of the *myb* family : B-*myb* inhibits v-*myb*-induced gene activation. *EMBO J.*, **11**, 4619-4629.
- Foos, G., Natour, S. & Klempnauer, K.-H.** 1994. TATA-box dependant trans-activation of the human HSP70 promoter by Myb proteins. *Oncogene*, **8**, 1775-1782.
- Frampton, J., Leutz, A., Gibson, T.B. & Graf, T.** 1989. DNA-binding domain ancestry. *Nature*, **342**, 134.
- Franz, W.M., Berger, P. & Wang, J.Y.J.** 1989. Deletion of an N-terminal regulatory domain of *c-abl* tyrosine kinase activates its oncogenic potential. *EMBO J.*, **8**, 137-147.

- Freed, E. & Hunter, T.** 1992. A 41-kilodalton protein is a potential substrate for the p210^{bcr-abl} protein tyrosine kinase in chronic myelogenous leukemia cells. *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 1312-1323.
- Friedmann, M., Holth, L.T., Zoghbi, H.Y. & Reeves, R.** 1993. Organisation, inducible-expression and chromosome localization of the human HMG-I(Y) nonhistone protein gene. *Nucleic Acids Res.*, **21**, 4259-4267.
- Gabrielsen, O.S., Sentenac, A., & Fromageot, P.** 1991. Specific DNA binding by c-Myb : evidence for a double helix-turn-helix-related motif. *Science*, **253**, 1140-1143.
- Galibert, F., Mandart, E., Fitoussi, F., Tiollais, P. & Charnay, P.** 1979. Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E. coli*. *Nature*, **291**, 646-650.
- Ganter, B. & Lipsick, J.S.** 1997. Myb binding sites within the N-ras promoter repress transcription. *Oncogene*, **15**, 193-202.
- Garcia, A., LaMontagne, K., Reavis, D., Stober-Grässer, U. & Lipsick, J.S.** 1991. Determinants of sequence-specific DNA-binding by p48^{v-myb}. *Oncogene*, **6**, 265-273.
- Garcia, A.D., Ostapchuk, P. & Hearing, P.** 1993. Functional interaction of nuclear factors EF-C, HNF-4, and RXR alpha with hepatitis B virus enhancer I. *J. Virol.*, **67**, 3940-3950.
- Garnier, J., Osguthorpe, D.J. & Robson, B.** 1978. Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. *J. Mol. Biol.*, **120**, 97-120.
- Gascuel, O. & Golmard, J.L.** 1988. A simple method for predicting the secondary structure of globular proteins : implications and accuracy. *Comput. Appl. Biosci.*, **4**, 357-365.
- Ge, H. & Roeder, R.G.** 1994. The high mobility group protein HMG1 can reversibly inhibit class II gene transcription by interaction with the TATA-binding protein. *J. Biol. Chem.*, **269**, 17136-17140.
- Geierstanger, B.H., Volkman, B.F., Kremer, W. & Wemmer, D.E.** 1994. Short peptide fragments derived from HMG-I/Y proteins bind specifically to the minor groove of DNA. *Biochemistry*, **33**, 5347-5355.
- Geourjon, C. & Deleage, G.** 1995. SOPMA : significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Comput. Appl. Biosci.*, **11**, 681-684.
- Getler, F.B., Bennett, R.L., Clarck, M.J. & Hoffmann, F.M.** 1989. Drosophila *abl* tyrosine kinase in embryogenic CNS axons : a role in axogenesis is revealed through dosage-sensitive interactions with *disabled*. *Cell*, **58**, 103-113.

- Getler, F.B., Hill, K.K., Clarck, M.J. & Hoffmann, F.M.** 1993. Dosage-sensitive modifiers of *Drosophila abl* tyrosine kinase function : *prospero*, a regulator of axonal outgrowth, and *disabled*, a novel tyrosine kinase substrate. *Genes Dev.*, **7**, 441-453.
- Getler, F.B., Comer, A.R., Juang, J.-L., Ahern, S.M., Clarck, M.J., Liebl, E.C. & Hoffmann, F.M.** 1995. *Enabled*, a dosage-sensitive suppressor of mutations in the *Drosophila Abl* tyrosine kinase, encodes an Abl substrate with SH3 domain-binding properties. *Genes Dev.*, **9**, 521-533.
- Gewirtz, A.M. & Calabretta, B.** 1988. A *c-myb* antisense oligodesoxynucleotide inhibits normal human hematopoiesis in vitro. *Science*, **242**, 1303-1306.
- Gewirtz, A.M., Anfossi, G., Venturelli, D., Valpreda, S., Sims, R., & Calabretta, B.** 1989. G1/S transition in normal human T-lymphocytes requires the nuclear protein encoded by *c-myb*. *Science*, **245**, 180-183.
- Gewirtz, A.M.** 1994. Treatment of chronic myelogenous leukemia (CML) with *c-myb* antisense oligodesoxynucleotides. *Bone Marrow Transplantation*, **14**, S57-S61.
- Giancotti, V., Pani, B., D'Andrea, P., Berlingieri, M.T., DiFiore, P.P., Fusco, A., Veccio, G., Philip, R., Crane-Robinson, C., Nicolas, R.H., Wright, C.A. & Goodwin, G.H.** 1987. Elevated levels of a specific class of nuclear phosphoproteins in cells transformed with *v-ras* and *v-mos* oncogenes and by cotransfection with *c-myc* and polyoma middle T genes. *EMBO J.*, **6**, 1981-1987.
- Gibrat, J.F., Garnier, J. & Robson, B.** 1987. Further developments of protein secondary structure prediction using information theory. New parameters and consideration of residue pairs. *J. Mol. Biol.*, **198**, 425-443.
- Giese, K., Amsterdam, A. & Grooschedl, R.** 1991. DNA-binding properties of the HMG domain of the lymphoid-specific transcriptional regulator LEF-1. *Genes Dev.*, **5**, 2567-2578.
- Giese, K., Cox, J. & Grooschedl, R.** 1992. The HMG domain of lymphoid enhancer factor 1 bends DNA and facilitates assembly of functional nucleoprotein structures. *Cell*, **69**, 185-195.
- Giese, K. & Grooschedl, R.** 1993. LEF-1 contains an activation domain that stimulates transcription only in a specific context of factor-binding sites. *EMBO J.*, **12**, 4667-4676.
- Giese, K., Kingsley, C., Kirshner, J.R. & Grooschedl, 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.
- Goga, A., McLaughlin, J., Pendergast, A.M., Parmar, K., Muller, A., Rosenberg, N. & Witte, O.N.** 1993. Oncogenic activation of *c-Abl* by mutation within its last exon. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 4967-4975.

- Goga, A., Liu, X., Hambuch, T.M., Senechal, K., Major, E., Berk, A.J., Witte, O.N., Sawyers, C.L.** 1995a. p53 dependant growth suppression by the c-Abl nuclear tyrosine kinase. *Oncogene*, **11**, 791-799.
- Goga, A., McLaughlin, J., Afar, D.E.H., Saffran, D.C. & Witte, O.N.** 1995b. Alternative signals to RAS for hematopoietic transformation by the *BCR-ABL* oncogene. *Cell*, **82**, 981-988.
- Golay, J., Capucci, A., Arsura, M., Castellano, M., Rizzo, V. & Introna, M.** 1991. Expression of c-myb and B-myb, but not A-myb, correlates with proliferation in human hematopoietic cells. *Blood*, **77**, 149-158.
- Golay, J., Loffarelli, L., Luppi, M., Castellano, M., & Introna, M.** 1994. The human A-myb protein is a strong activator of transcription. *Oncogene*, **9**, 2469-2479.
- Golub, T.R., Goga, A., Barker, G.F., Afar, D.E.H., McLaughlin, J., Bohlander, S.K., Rowley, J.D., Witte, O.N. & Gilliland, D.G.** 1996. Oligomerization of the ABL tyrosine kinase by the Ets protein TEL in human leukemia. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 4107-4116.
- Gonda, T.J., Sheiness, D.K. & Bishop, J.M.** 1982. Transcripts from the cellular homologs of retroviral oncogenes : distribution among chicken tissues. *Mol. Cell. Biol.*, **2**, 617-624.
- Gonda, T.J., Gough, N.M., Dunn, A.R. & de Blaquiére, J.** 1985. The nucleotide sequence of cDNA clones of the murine myb proto-oncogene. *EMBO J.*, **4**, 2003-2008.
- Gonda, T.J., Buckmaster, C., & Ramsay, R.G.** 1989. Activation of c-myb by carboxy-terminal truncation : relationship to transformation of murine haemopoietic cells *in vitro*. *EMBO J.*, **8**, 1777-1783.
- Gorman, C., Moffat, L.F., & Howard, B.H.** 1982. Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyl transferase in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.*, **2**, 1044-1051.
- Gosser, Y.Q., Zheng, J., Overduin, M., Mayer, B.J. & Cowburn, D.** 1995. The solution structure of Abl SH3, and its relationship to SH2 in the SH(23) construct. *Structure*, **3**, 1075-1086.
- Graf, T.** 1992. Myb : a transcriptional activator linking proliferation and differentiation in hematopoietic cells. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **2**, 249-255.
- Grässer, F.A., LaMontagne, K., Whittaker, L., Stohr, S. & Lipsick, J.S.** 1992. A highly conserved cysteine in the v-Myb DNA-binding domain is essential for transformation and transcriptional *trans*-activation. *Oncogene*, **7**, 1005-1009.
- Graves, B.J., Jonhson, P.J. & McKnight, S.L.** 1986. Homologous recognition of a promoter domain common to the MSV LTR and the HSV tk gene. *Cell*, **44**, 565-576.

- Griffin, C.A., & Baylin, S.B.** 1985. Expression of the *c-myb* oncogene in human small cell lung carcinoma. *Cancer Res.*, **45**, 272-275.
- Grosschedl R., Giese, K. & Pagel, J.** 1994. HMG domain proteins : architectural elements in the assembly of nucleoprotein structures. *Trends in Genet.*, **10**, 94-100.
- Guerin, M., Sheng, Z.M., Andrieu, N. & Riou, G.** 1990. Strong association between *c-myb* and oestrogen-receptor expression in human breast cancer. *Oncogene*, **5**, 131-135.
- Guerra, J., Withers, D.A. & Boxer, L.M.** 1995. MYB binding sites mediate negative regulation of *c-MYB* expression in T-cell lines. *Blood*, **5**, 1873-1880.
- Hamdane, M., David-Cordonnier, M.-H. & D'Halluin, J.-C.** 1997. Activation of p65 NF- κ B protein by the p210^{BCR-ABL} in myeloid cell line. *Oncogene*, **15**, 2267-2275.
- Haqq, C.M., King, C.Y., Donahoe, P.K. & Weiss, M.A.** 1993. SRY recognizes conserved DNA sites in sex-specific promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 1097-1101.
- Hardman, C.H., Broadhurst, R.W., Raine, A.R.C., Grasser, K.D., Thomas, J.O. & Laue, E.D.** 1995. Structure of the A-domain of HMG1 and its interaction with DNA as studied by heteronuclear three- and four-dimensional NMR spectroscopy. *Biochemistry*, **34**, 16596-16607.
- Hariharan, I.K. & Adams, J.M.** 1987. cDNA sequence for human *bcr*, the gene that translocates to the *abl* oncogene in chronic myelogenous leukemia. *EMBO J.*, **6**, 115-119.
- Harley, V.R., Lovell-Badge, R. & Goodfellow, P.N.** 1994. Definition of a consensus DNA binding site for SRY. *Nucleic Acid. Res.*, **22**, 1500-1501.
- Harper, M.F., Franchini, C., Love, J., Simon, M.I., Gallo, R.C. & Wong-Staal, F.** 1983. Chromosomal sublocalisation of human *c-myb* and *c-fes* cellular oncogenes. *Nature*, **304**, 169-171.
- Haynes, T.L., Thomas, M.B., Dusing, M.R., Valerius, M.T., Potter, S.S. & Wiginton, D.A.** 1996. An enhancer LEF-1/TCF-1 site is essential for insertion site-independent transgene expression in thymus. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 5034-5044.
- Henkemeyer, M., West, S.R., Gertier, F.B. & Hoffman, F.M.** 1990. A novel tyrosine kinase-independent function of Drosophila ABL correlates with proper subcellular localization. *Cell*, **65**, 451-464.
- Hernandez-Munain, C. & Krangel, M.S.** 1994. Regulation of the T-cell receptor δ enhancer by functional cooperation between c-Myb and Core-Binding Factors. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 473-483.

- Hernandez-Munain, C. & Krangel, M.S.** 1995. c-Myb and Core-Binding/PEBP2 display functional synergy but bind independently to adjacent sites in the T-cell receptor δ enhancer. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 3090-3099.
- Hijiya, N., Zhang, J., Ratajczak, M.Z., Kant, J.A., DeRiel, K., Herlyn, M., Zon, G., & Gewirtz, A.M.** 1994. Biologic and therapeutic significance of *MYB* expression in human melanoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 4499-4503.
- Hohaus, S., Petrovick, M.S., Voso, M.T., Sun, Z., Zhang, D.-E. & Tenen, D.G.** 1995. PU.1 (Spi-1) and C/EBP α regulate expression of the Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Receptor α gene. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 5830-5845.
- Honigwachs, J., Faktor, O., Dikstein, R., Shaul, Y., & Laub, O.** 1989. Liver-specific expression of hepatitis B virus is determined by the combined action of the core gene promoter and the enhancer. *J. Virol.*, **63**, 919-924.
- Hosking, B.M., Muscat, G.E.O., Koopman, P.A., Dowhan, D.H. & Dunn, T.L.** 1995. Trans-activation and DNA-binding properties of the transcription factor, Sox-18. *Nucleic Acids Res.*, **23**, 2626-2628.
- Hovring, I., Bostad, A., Ording, E., Myrset, A.H. & Gabrielsen, O.S.** 1994. DNA-binding domain and recognition sequence of the yeast BAS1 protein, a divergent member of the Myb family of transcription factors. *J. Biol. Chem.*, **269**, 17663-17669.
- Howe, K.M., Reakes, C.F.L. & Watson, R.J.** 1990. Characterization of the sequence-specific interaction of mouse c-*myb* protein with DNA. *EMBO J.*, **9**, 161-169.
- Howe, K.M. & Watson, R.J.** 1991. Nucleotide preferences in sequence-specific recognition of DNA by c-*myb* protein. *Nucleic Acids Res.*, **19**, 3913-3919.
- Hsu, W., Kerppola, T.K., Chen, P.L. & Chen-Kiang, S.** 1994. Fos and Jun repress transcription activation by NF-IL6 through association at a basic zipper region. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 268-276.
- Hu, Y., Ramsay, R.G., Kanei-Ishii, C., Ishii, S. & Gonda, T.J.** 1991. Transformation by the carboxyl-deleted Myb reflects increased transactivating capacity and disruption of a negative regulatory domain. *Oncogene*, **6**, 1549-1553.
- Huang, J.C., Zamble, D.B., Reardon, J.T., Lippard, S.J. & Sancar, A.** 1994. HMG-domain proteins specifically inhibit the repair of the major DNA adduct of the anticancer drug cisplatin by human excision nuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 10394-10398.
- Hurst, H.** 1994. bZIP proteins. *Protein Profile*, **1**, 123-168.
- Ibanez, C.E. & Lipsick, J.S.** 1988. Structural and functional domains of the *myb* oncogene : requirements for nuclear transport, myeloid transformation and colony formation. *J. Virol.*, **62**, 1981-1988.

- Introna, M., Golay, J., Frampton, J., Nakano, T., Ness, S.A. & Graf, T.** 1990. Mutations in *v-myb* alter the differentiation of myelomonocytic cells transformed by the oncogene. *Cell*, **63**, 1287-1297.
- Isackson, P.J., Fishback, J.L., Bidney, D.L. & Reeck, G.R.** 1979. Preferential affinity of high molecular weight high mobility group non-histone chromatin proteins for single-stranded DNA. *J. Biol. Chem.*, **254**, 5569-5572.
- Jackson, P. & Baltimore, D.** 1989. N-terminal mutations activate the leukemogenic potential of the myristoylated form of *c-abl*. *EMBO J.*, **8**, 449-456.
- Jacobs, S.M., Gorse, K.M. & Westin, E.H.** 1994. Identification of a second promoter in the human *c-myb* proto-oncogene. *Oncogene*, **9**, 227-235.
- Jamin, N., Gabrielsen, O.S., Gilles, N., Lirsac, P.-N. & Toma, F.** 1993. Secondary structure of the DNA-binding domain of the c-Myb onco-protein in solution. *Eur. J. Biochem.*, **216**, 147-154.
- Jantzen, H.-M., Admon, A., Bell, S.P. & Tjian, R.** 1990. Nucleolar transcription factor hUBF contains a DNA-binding motif with homology to HMG proteins. *Nature*, **344**, 830-836.
- Jin, S., Kharbanda, S., Mayer, B., Kufe, D. & Weaver, D.T.** 1997. Binding of Ku and c-Abl at the kinase homology region of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit. *J. Biol. Chem.*, **272**, 24763-24766.
- John, S., Reeves, R.B., Lin, J.X., Child, R., Leiden, J.M., Thompson, C.B. & Leonard, W.J.** 1995. Regulation of cell-type-specific alpha-chain 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.
- de Jong, R., ten Hoeve, J., Heisterkamp, N. & Groffen, J.** 1997. Tyrosine 207 in CRKL is the BCR/ABL phosphorylation site. *Oncogene*, **14**, 507-513.
- Juo, Z.S., Chiu, T.K., Leiberman, P.M., Baikalov, I., Berk, A.J. & Dickerson, R.E.** 1996. How proteins recognize the TATA box. *J. Mol. Biol.*, **261**, 239-254.
- Kabarowski, J.H.S., Allen, P.B. & Wiedemann, L.M.** 1994. A temperature sensitive p210BCR-ABL mutant defines the primary consequences of BCR-ABL tyrosine kinase expression in growth factor dependent cells. *EMBO J.*, **13**, 5887-5895.
- Kadlec, L. & Pendergast, A.M.** 1997. The amphiphysin-like protein 1 (ALP1) interacts functionally with the cABL tyrosine kinase and may play a role in cytoskeletal regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 12390-12395.
- Kalkbrenner, F., Guehmann, S. & Moelling, K.** 1990. Transcriptional activation by human *c-myb* and *v-myb* genes. *Oncogene*, **5**, 657-661.

- Kallenbach, N.R., Ma, R.-I. & Seeman, N.C.** 1983. An immobile nucleic acid junction constructed from oligonucleotides. *Nature*, **305**, 829-831.
- Kanei-Ishii, C., Sarai, A., Sawazaki, T., Nakagoshi, H., He, D.-N., Ogata, K., Nishimura, Y. & Ishii, S.** 1990. The tryptophan cluster : a hypothetical structure of the DNA-binding domain of the *myb* protooncogene product. *J. Biol. Chem.*, **265**, 19990-19995.
- Kanei-Ishii, C., McMillan, E.M., Nomura, T., Sarai, A., Ramsay, R.G., Aimoto, S., Ishii, S. & Gonda, T.J.** 1992. Transactivation and transformation by Myb are negatively regulated by a leucine-zipper structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 3088-3092.
- Kanei-Ishii, C., Yasukawa, T., Morimoto, R.I. & Ishii, S.** 1994. c-Myb-induced transactivation mediated by heat shock elements without sequence-specific DNA binding of c-Myb. *J. Biol. Chem.*, **269**, 15769-15775.
- Kantarjian, H.M., Deisseroth, A., Kurzrock, R., Estrov, Z. & Talpaz, M.** 1993. Chronic Myelogenous Leukemia : A concise update. *Blood*, **82**, 691-703.
- Karim, F.D., Urness, C.S., Thummel, C.S., Klemsz, M.J., McKercher, S.R., Celada, A., Van Beveren, C., Maki, R.A., Gunther, C.V., Nye, J.A. & Graves, B.J.** 1990. The ETS-domain : a new DNA-binding motif that recognizes a purine-rich core DNA sequence. *Genes Dev.*, **4**, 1451-1453.
- Karpen, S., Banerjee, R., Zelznt, A., Price, P. & Acs, G.** 1988. Identification of protein-binding sites in the hepatitis B virus enhancer and core promoter domains. *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 5159-5165.
- Katan, Y., Agami, R. & Shaul, Y.** 1997. The transcriptional activation and repression domains of RFX1, a context-dependent regulator, can mutually neutralise their activity. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 3621-3628.
- Katz, S., Kowenz-Leutz, E., Müller, C., Meese, K., Ness, S.A., & Leutz, A.** 1993. The NF-M transcription factor is related to C/EBP β and plays a role in signal transduction, differentiation and leukemogenesis of avian myelomonocytic cells. *EMBO J.*, **12**, 1321-1332.
- Katzen, A.L., Kornberg, T.B. & Bishop, J.M.** 1985. Isolation of the proto-oncogene *c-myb* from *D. melanogaster*. *Cell*, **41**, 449-456.
- Kelliher, M., Knott, A., McLaughlin, J., Witte, O.N. & Rosenberg, N.** 1991. Differences in oncogenic potency but not target cell specificity distinguish two forms of the *BCR/ABL* oncogene. *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 4710-4716.
- Kenney, S.C., Holley-Guthrie, E., Quinlivan, E.B., Gutsch, D., Zhang, Q., Bender, T., Giot, J. & Sergeant, A.** 1992. The cellular oncogene *c-myb* can interact synergistically with the Epstein-Barr Virus BZLF1 transactivator in lymphoid cells. *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 136-146.



- Khadake, J.R. & Rao, M.R.** 1997. Condensation of DNA and chromatin by an SPKK-containing octapeptide repeat motif present in the C-terminus of histone H1. *Biochemistry*, **36**, 1041-1051.
- Kharbanda, S., Ren, R., Pandey, P., Shafman, T.D., Feller, S.M., Weichselbaum, R.R. & Kufe, D.** 1995a. Activation of the c-Abl tyrosine kinase in the stress response to DNA-damaging agents. *Nature*, **376**, 785-788.
- Kharbanda, S., Pandey, P., Ren, R., Mayer, B., Zon, L. & Kufe, D.** 1995b. c-Abl activation regulates induction of the SEK1/stress-activated protein kinase pathway in the cellular response to 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine. *J. Biol. Chem.*, **270**, 30278-30281.
- Kharbanda, S., Pandey, P., Jin, S., Inoue, S., Bharti, A., Yuan, Z.M., Weichselbaum, R.R., Weaver, D. & Kufe, D.** 1997. Functional interaction between DNA-PK and c-Abl in response to DNA damage. *Nature*, **386**, 732-735.
- Kiewitz, A. & Wolfes, H.** 1997. Mapping of the protein-protein interactions between c-myc and its coactivator CBP by a new phage display technique. *FEBS Lett.*, **415**, 258-262.
- Kim, J.L., Nikolov, D.B. & Burley, S.K.** 1993a. Co-crystal structure of TBP recognizing the minor groove of a TATA element. *Nature*, **365**, 520-527.
- Kim, Y., Geiger, J.G., Hahn, S. & Sigler, P.B.** 1993b. Crystal structure of a yeast TBP/TATA box complex. *Nature*, **365**, 512-520.
- King, C.-Y. & Weiss, M.A.** 1993. The SRY high-mobility-group box recognizes DNA by partial intercalation in the minor groove: A topological mechanism of sequence specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 11990-11994.
- Kipreos, E.J. & Wang, J.Y.J.** 1990. Differential phosphorylation of c-Abl in cell cycle determined by *cdc2* kinase and phosphatase activity. *Science*, **248**, 217-220.
- Kipreos, E.J. & Wang, J.Y.J.** 1992. Cell cycle-regulated binding of c-Abl tyrosine kinase to DNA. *Science*, **256**, 382-385.
- von Kitzing, E., Lilley, D.M.J. & Diekmann, S.** 1990. The stereochemistry of a four-way DNA junction: a theoretical study. *Nucleic Acids Res.*, **18**, 2671-2683.
- Klempnauer, K.-H., Symonds, G., Evan, G.I. & 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-myc* gene. *Cell*, **37**, 537-547.
- Klempnauer, K.-H. & Sippel, A.E.** 1987. The highly conserved amino-terminal region of the protein encoded by the v-myc oncogene functions as a DNA-binding domain. *EMBO J.*, **6**, 2719-2725.

- Klempnauer, K.-H.** 1988. Interaction of *myb* proteins with nuclear matrix in vitro. *Oncogene*, **2**, 545-551.
- Klug, C.A., Gerety, S.J., Shah, P.C., Chen, Y.-Y., Rice, N.R., Rosenberg, N. & Singh, H.** 1994. The *v-abl* tyrosine kinase negatively regulates NF- κ B/Rel factors and blocks κ gene transcription in pre-B lymphocytes. *Genes Dev.*, **8**, 678-687.
- Koldin, B., Suckow, M., Seydel, A., von Wilcken-Bergmann & Müller-Hill, B.** 1995. A comparison of the different DNA binding specificities of the bZIP proteins C/EBP and GCN4. *Nucleic Acids Res.*, **23**, 4162-4169.
- Kowenz-Leutz, E., Twamley, G., Ansieau, S. & Leutz, A.** 1994. Novel mechanism of C/EBP β (NF-M) transcriptional control : Activation through derepression. *Genes Dev.*, **8**, 2781-2791.
- Kowenz-Leutz, E., Ansieau, S., Twamley, G., Ness, S.A. & Leutz, A.** 1995. Gene regulation by NF-M and Myb during differentiation and leukemic transformation. *Immunobiol.*, **193**, 356-362.
- Krieg, J., Oelgeschläger, M., Janknecht, R. & Lüscher, B.** 1995. High affinity DNA binding of native full length c-Myb and differential proteolytic sensitivity of its N- and C-terminal domains. *Oncogene*, **10**, 2221-2228.
- Kruh, G.D., Perego, R., Miki, T. & Aaronson, S.A.** 1990. The complete coding sequence of arg defines the Abelson subfamily of cytoplasmic tyrosine kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 5802-5806.
- Ku, D.-H., Wen, S.-C., Engelhard, A., Nicolaidis, N.C., Lipson, K.E., Marino, T.A., & Calabretta, B.** 1993. c-myb transactivates *cdc2* expression via Myb binding sites in the 5'-flanking region of the human *cdc2* gene. *J. Biol. Chem.*, **268**, 2255-2259.
- Laget, M.-P., Callebaut, I., de Launoit, Y., Stehelin, D. & Mornon, J.-P.** 1993. Predicted common structural features of the DNA-binding domains from Ets, Myb and HMG transcription factors. *Nucleic Acids Res.*, **21**, 5987-5996.
- Lam, E.W.-F., Robinson, C., & Watson, R.J.** 1992. Characterization and cell cycle-regulated expression of mouse B-*myb*. *Oncogene*, **7**, 1885-1890.
- Lam, E.W.-F. & Watson, R.J.** 1993. An E2F-binding site mediates cell-cycle regulated repression of mouse B-*myb* transcription. *EMBO J.*, **12**, 2705-2713.
- Lam, E.W.-F., Bennett, J.D., & Watson, R.J.** 1995. Cell-cycle regulation of human B-*myb* transcription. *Gene*, **160**, 277-281.
- Landschulz, W.H., Johnson, P.F. & McKnight, S.L.** 1989. The DNA binding domain of the rat liver nuclear protein C/EBP is bipartite. *Science*, **243**, 1681-1688.

- Landsman, D. & Bustin, M.** 1993. A signature for the HMG-1 box DNA-binding proteins. *BioEssays*, **15**, 539-546.
- Laudet, V., Stehelin, D. & Clevers, H.** 1993. Ancestry and diversity of the HMG box family. *Nucleic Acids Res.*, **21**, 2493-2501.
- LeClair, K.P., Blonar, M.A. & Sharp, P.A.** 1992. The p50 subunit of NF-kappa B associates with the NF-IL6 transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 8145-8149.
- Lee, D.K., Horikoshi, M. & Roeder, R.G.** 1991. Interaction of TFIID in the minor groove of the TATA element. *Cell*, **67**, 1241-1250.
- Leprince, D., Gegonne, A., Coll, J., deTaisne, C., Schneeberger, A., Lagrou, C., & Stehelin, D.** 1983. A putative second cell-derived oncogene of the avian leukaemia retrovirus E26. *Nature*, **306**, 395-397.
- Levin, J.M., Robson, B. & Garnier, J.** 1986. An algorithm for secondary structure determination in proteins based on sequence similarity. *FEBS Lett.*, **205**, 303-308.
- Levin, J.M. & Garnier, J.** 1988. Improvements in a secondary structure prediction method on a search for local sequence homologies and its use as a model building tool. *Biochim. Biophys. Acta*, **955**, 283-295.
- Lewis, J.M., Baskaran, R., Taagepera, S., Schwartz, M.A. & Wang, J.Y.J.** 1996. Integrin regulation of c-Abl tyrosine kinase activity and cytoplasmic-nuclear transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 15174-15179.
- Li, M., Xie, Y., Wu, X., Kong, Y. & Wang, Y.** 1995. HNF3 binds and activates the second enhancer, ENII, of hepatitis B virus. *Virology*, **214**, 371-378.
- Lichtensteiner, S., Wuarin, J. & Schibler, U.** 1987. The interplay of DNA-binding proteins on the promoter of the mouse albumine gene. *Cell*, **51**, 963-973.
- Lifshitz, B., Fainstein, E., Marcelle, C., Shtivelman, E., Amson, R., Gale, R.P., & Canaani, E.** 1988. BCR genes and transcripts. *Oncogene*, **2**, 113-117.
- Lilley, D.M.J. & Clegg, R.M.** 1993. The structure of the four-way junction in DNA. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **22**, 299-328.
- Lilley, D.M.J.** 1994. Molecular recognition of DNA structure by proteins that mediate genetic recombination. *J. Mol. Recogn.*, **7**, 71-78.
- Lipsick, J.S.** 1996. One billion year of Myb. *Oncogene*, **13**, 223-235.
- Liu, J., Campbell, M., Guo, J.Q., Lu, D., Xian, Y.M., Andersson, B.S. & Arlinghaus, R.B.** 1993. BCR-ABL tyrosine kinase is autophosphorylated or transphosphorylates

p160BCR on tyrosine predominantly within the first BCR exon. *Oncogene*, **8**, 101-109.

- Locker, D., Decoville, M., Maurizot, J.C., Bianchi, M.E. & Leng, M.** 1995. Interaction between cisplatin-modified DNA and HMG boxes of HMG 1 : DNase I footprinting and circular dichroism. *J. Mol. Biol.*, **246**, 243-247.
- Love, J.J., Li, X., Case, D.A., Giese, K., Grosschedl, R. & Wright, P.E.** 1995. Structural basis for DNA bending by the architectural transcription factor LEF-1. *Nature*, **376**, 791-795.
- Lozzio, C.B. & Lozzio, C.C.** 1975. Human chronic myelogenous leukemia cell line with positive Philadelphia chromosome. *Blood*, **45**, 321-334.
- Luckow, B., & Shultz, G.** 1987. CAT constructions with multiple unique restriction sites for the functional analysis of eucaryotic promoters and regulatory elements. *Nucleic Acids Res.*, **15**, 5490.
- Lugo, T.G., Pendergast, A.-M., Muller, A.J. & Witte, O.N.** 1990. Tyrosine kinase activity and transformation potency of *bcr-abl* oncogene products. *Science*, **247**, 1079-1081.
- Lüscher, B., Christenson, E., Litchfield, D.W., Krebs, E.G., & Eisenman, R.N.** 1990. Myb DNA binding inhibited by phosphorylation at a site deleted during oncogenic activation. *Nature*, **344**, 517-521.
- Lüscher, B., & Eisenman, R.N.** 1990. New light on Myc and Myb. Part II : Myb. *Genes Dev.*, **4**, 2235-2241.
- Lyon, J., Robinson, C., & Watson, R.** 1994. The role of Myb proteins in normal and neoplastic cell proliferation. *Crit. Rev. in Onc.*, **4**, 373-388.
- Ma, X.-P., & Calabretta, B.** 1994. DNA binding and transactivation activity of A-*myb*, a *c-myb* related gene. *Cancer Res.*, **54**, 6512-6516.
- Majello, B., Kenyon, L.C. & Dalla-Favera, R.** 1986. Human *c-myb* protooncogene : Nucleotide sequence of cDNA and organisation of the genomic locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 9636-9640.
- Mandanás, R.A., Leibowitz, D.S., Gharehbaghi, K., Tauchi, T., Burgess, G.S., Miyazawa, K., Jayaram, N. & Boswell, H.S.** 1993. Role of p21RAS in p210*bcr-abl* transformation of murine myeloid cells. *Blood*, **82**, 1838-1847.
- Mardian, J.K.W., Paton, A.E., Burnick, G.J. & Olins, D.E.** 1980. Nucleosome cores have two specific binding sites for nonhistone chromosomal proteins HMG 14 and HMG 17. *Science*, **209**, 1534-1536.
- Maru, Y. & Witte, O.N.** 1991. The BCR gene encodes a novel serine/threonine kinase activity within a single exon. *Cell*, **67**, 459-468.

- Mathey-Prevot, B., Nabel, G., Palacios, R. & Baltimore, D.** 1986. Abelson virus abrogation of interleukin-3 dependence in a lymphoid cell line. *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 4133-4135.
- Matsuguchi, T., Salgia, R., Hallek, M., Eder, M., Druker, B., Ernst, T. & Griffin, J.D.** 1994. SHC phosphorylation in myeloid cells is regulated by GM-CSF, IL-3, and steel factor and is constitutively increased by p210BCR-ABL. *J. Biol. Chem.*, **269**, 5016-5021.
- Matsusaka, T., Fujikawa, K., Nishio, Y., Mukaida, N., Matsushima, K., Kishimoto, T. & Akira, S.** 1993. Transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 10193-10197.
- Mayer, B.J., Jackson, P.K., Van Etten, R.A. & Baltimore, D.** 1992. Point mutations in the *abl* SH2 domain coordinately impair phosphotyrosine binding *in vitro* and transforming activity *in vivo*. *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 609-618.
- Mayer, B.J. & Baltimore, D.** 1994. Mutagenic analysis of the roles of SH2 and SH3 domains in regulation of the Abl tyrosine kinase. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 2883-2894.
- McArthur, M. & Thomas, J.O.** 1996. A preference of histone H1 for methylated DNA. *EMBO J.*, **15**, 1705-1714.
- McCann, S., Sullivan, J., Guerra, J., Arcinas, A. & Boxer, L.M.** 1995. Repression of the *c-myb* gene by WT1 protein in T and B cell lines. *J. Biol. Chem.*, **270**, 23785-23789.
- McClinton, D., Stafford, J., Brents, L., Bender, T.P. & Kuehl, W.M.** 1990. Differentiation of mouse erythroleukemia cells is blocked by late up-regulation of a *c-myb* transgene. *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 705-710.
- McCracken, S., Leung, S., Bosselut, R., Ghysdael, J. & 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.
- McGahon, A., Bissonnette, R., Schmitt, M., Cotter, K.M., Green, D.R. & Cotter, D.R.** 1994. BCR-ABL maintains resistance of chronic myelogenous leukemia cells to apoptotic cell death. *Blood*, **83**, 1179-1187.
- McWhirter, J.R. & Wang, J.Y.J.** 1991. Activation of tyrosine kinase and microfilament-binding functions of *c-abl* by *bcr* sequences in *bcr/abl* fusion proteins. *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 1553-1565.
- McWhirter, J.R. & Wang, J.Y.J.** 1993. An actin-binding function contributes to transformation by the Bcr-Abl oncoprotein of Philadelphia chromosome-positive human leukemias. *EMBO J.*, **12**, 1533-1546.

- McWhirter, J.R. & Wang, J.Y.J.** 1997. Effect of Bcr sequences on the cellular function of Bcr-Abl oncoprotein. *Oncogene*, **15**, 1625-1634.
- Meese, E., Meltzer, P.S., Witkowski, C.M., & Trent, J.M.** 1989. Molecular mapping of the oncogene *MYB* and rearrangements in malignant melanoma. *Genes, Chrom. Cancer*, **1**, 88-94.
- Melo, J.V., Gordon, D.E., Cross, N.C.P. & Goldman, J.M.** 1993. The *ABL-BCR* fusion gene is expressed in chronic myeloid leukemia. *Blood*, **81**, 158-165.
- Melotti, P. & Calabretta, B.** 1994. Ets-2 and c-Myb act independently in regulating expression of the hematopoietic stem cell antigen CD34. *J. Biol. Chem.*, **269**, 25303-25309.
- Melotti, P., Ku, D.-H., & Calabretta, B.** 1994. Regulation of the expression of the hematopoietic stem cell antigen CD-34 : role of c-myb. *J. Exp. Med.*, **179**, 1023-1028.
- Mettus, R.V., Litvin, J., Wali, A., Toscani, A., Latham, K., Hatton, K., & Reddy, E.P.** 1994. Murine A-myb : evidence for differential splicing and tissue-specific expression. *Oncogene*, **9**, 3077-3086.
- Metzger, S., Halaas, J.L., Breslow, J.L. & Sladek, F.M.** 1993. Orphan receptor HNF-4 and bZIP protein C/EBP α bind to overlapping regions of the apolipoprotein B gene promoter and synergistically activate transcription. *J. Biol. Chem.*, **268**, 16831-16838.
- Miao, Y.-J. & Wang, J.Y.J.** 1996. Binding of A/T-rich DNA by three high mobility group-like domains in c-Abl tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.*, **271**, 22823-22830.
- Mink, S., Kerber, U. & Klempnauer, K.H.** 1996. Interaction of C/EBPbeta and v-Myb is required for synergistic activation of the mim-1 gene. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 1316-1325.
- Mink, S., Haenig, B. & Klempnauer, K.H.** 1997. Interaction and functional collaboration of p300 and C/EBP β . *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 6609-6617.
- Mitchell, P.J. & Tijan.** 1989. Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science*, **245**, 371-378.
- Mizuguchi, G., Nakagoshi, H., Nagase, T., Nomura, N., Date, T., Ueno, Y. & Ishii, S.** 1990. DNA binding activity and transcriptional activator function of the human B-Myb protein compared with c-MYB. *J. Biol. Chem.*, **265**, 9280-9284.
- Mizuguchi, G., Kanei-Ishii, C., Takahashi, T., Yasukawa, T., Nagase, T., Horikoshi, M., Yamamoto, T., & Ishii, S.** 1995. c-Myb repression of c-erbB-2 transcription by direct binding to the c-erbB-2 promoter. *J. Biol. Chem.*, **270**, 9384-9389.
- Moran, M.F., Koch, C.A., Anderson, D., Ellis, C., England, L., Martin, G.S. & Pawson, T.** 1990. Src homology region 2 domains direct protein-protein interactions in signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 8622-8626.

- Morris, C., Kennedy, M., Heisterkamp, N., Columbano-Green, L., Romeril, K., Groffen, J. & Fitzgerald, P.** 1991. A complex chromosome rearrangement forms the *BCR-ABL* fusion gene in leukemic cells with a normal karyotype. *Genes Chrom. Cancer*, **3**, 263-271.
- Moscovici, M.G., Jurdic, P., Samarut, J., Gazzolo, L., Mura, C.V. & Moscovici, C.** 1983. Characterization of the hemopoietic target cells for avian leukemia virus E26. *Virology*, **129**, 65-78.
- Mossing, M.C. & Sauer, R.T.** 1990. Stable, monomeric variants of λ Cro obtained by insertion of a β -hairpin sequence. *Science*, **250**, 1712-1715.
- Mucenski, M.L., McLain, K., Kier, A.B., Swerdlow, S.H., Schreiner, C.M., Miller, T.A., Pietryga, D.W., Scott, W.J., Jr. & Potter, S.S.** 1991. A functional *c-myb* gene is required for normal and murine fetal hepatic hematopoiesis. *Cell*, **65**, 677-689.
- Mukhopadhyaya, R. & Wolff, L.** 1992. New sites of proviral integration associated with murine promonocytic leukemias and evidence for alternate modes of *c-myb* activation. *J. Virol.*, **66**, 6035-6044.
- Muller, A.J., Young, J.C., Pendergast, A.-M., Pontel, M., Landau, N.R., Littman, D.R. & Witte, O.N.** 1991. BCR first exon sequences specially activate the BCR/ABL tyrosine kinase oncogene of Philadelphia chromosome positive human leukemias. *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 1785-1792.
- Muller, R., Slamon, D.J., Tremblay, J.M., Cline, M.J. & Verma, I.M.** 1982. Differential expression of cellular oncogenes during pre- and postnatal development of the mouse. *Nature*, **299**, 640-644.
- Mushinski, J.F., Potter, M., Bauer, S.R. & Reddy, E.P.** 1983. DNA rearrangement and altered RNA expression of the *c-myb* oncogene in mouse plasmocytoid lymphosarcomas. *Science*, **220**, 795-798.
- Myrser, A.H., Bostad, A., Jamin, N., Lirsac, P.-N., Toma, F. & Gabrielsen, O.S.** 1993. DNA and redox state induced conformational changes in the DNA-binding domain of the Myb oncoprotein. *EMBO J.*, **12**, 4625-4633.
- Nakagoshi, H., Nagase, T., Kanei-Ishii, C., Ueno, Y., & Ishii, S.** 1990. Binding of the *c-myb* proto-oncogene product to the Simian Virus 40 enhancer stimulates transcription. *J. Biol. Chem.*, **265**, 3479-3483.
- Nakagoshi, H., Kanei-Ishii, C., Sawazaki, T., Mizuguchi, G., & Ishii, S.** 1992. Transcription of the *c-myc* gene by the *c-myb* and *B-myb* gene products. *Oncogene*, **7**, 1233-1240.

- Nakajima, T., Uchida, C., Anderson, S.F., Lee, C.-G., Hurwitz, J., Parvin, J.D. & Montminy, M.** 1997. RNA helicase A mediates association of CBP with RNA polymerase II. *Cell*, **90**, 1107-1112.
- Nakano, T. & Graf, T.** 1992. Identification of genes differentially expressed in two types of v-myb-transformed avian myelomonocytic cells. *Oncogene*, **7**, 527-534.
- Nason-Burchenal, K. & Wolff, L.** 1993. Activation of c-myb is an early bone-marrow event in a murine model for acute promonocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 1619-1623.
- Nasrin, N., Buggs, C., Kong, X.F., Carnazza, J., Goebel, M. & Alexander-Bridges, M.** 1991. DNA-binding properties of the product of the testis-determining gene and a related protein. *Nature*, **354**, 317-320.
- Nerlov, C. & Ziff, E.B.** 1995. CCAAT/enhancer binding protein- α amino acid motifs with dual TBP and TFIIB binding ability co-operate to activate transcription in both yeast and mammalian cells. *EMBO J.*, **14**, 4318-4328.
- Ness, S.A., Marknell, A., & 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., & Leutz, A.** 1993. Myb and NF-M : combinatorial activators of myeloid genes in heterologous cell types. *Genes Dev.*, **7**, 749-759.
- Ness, S.A.** 1996. The Myb oncoprotein : regulating a regulator. *Bioch. Biophys. Acta*, **1288**, 123-139.
- Nichols, G.L., Raines, M.A., Vera, J.C., Lacomis, L. Tempst, P & Golde, D.W.** 1994. Identification of CRKL as a constitutive phosphorylated 39-kD tyrosine phosphoprotein in Chronic Myelogenous Leukemia cells. *Blood*, **84**, 2912-2918.
- Nicolaidis, N.C., Gualdi, R., Casadevall, C., Manzella, L. & Calabretta, B.** 1991. Positive autoregulation of c-myb expression via Myb binding sites in the 5' flanking region of the human c-myb gene. *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 6166-6176.
- Nikolov, D.B. & Burley, S.K.** 1997. RNA polymerase II transcription initiation : A structural view. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 15-22.
- Nishina, Y., Nakagoshi, H., Imamoto, F., Gonda, T.J. & Ishii, S.** 1989. Trans-activation by the c-myb proto-oncogene. *Nucleic Acids Res.*, **17**, 107-117.
- Nissen, M.S., Langan, T.A. & Reeves, R.** 1991. Phosphorylation by cdc2 kinase modulates DNA binding activity of High Mobility Group I nonhistone chromatin protein. *J. Biol. Chem.*, **266**, 19945-19952.

- Nissen, M.S. & Reeves, R.** 1995. Changes in superhelicity are introduced into closed circular DNA by binding of High Mobility Group protein I/Y. *J. Biol. Chem.*, **270**, 4355-4360.
- Nomura, N., Takahashi, M., Matsui, M., Ishii, S., Date, T., Sasamoto, S., & Ishizaki, R.** 1988. Isolation of human c-DNA clones of *myb*-related genes, *A-myb* and *B-myb*. *Nucleic Acids Res.*, **16**, 11075-11089.
- Nomura, T., Sakai, N., Sarai, A., Sudo, T., Kanei-Ishii, C., Ramsay, R.G., Favier, D., Gonda, T.J., & Ishii, S.** 1993. Negative autoregulation of c-Myb activity by homodimer formation through the leucine zipper. *J. Biol. Chem.*, **268**, 21914-21923.
- Noonan, C.A., Yaffe, B., Mansell, P.W.A., Melnick, J.L., & Hollinger, F.B.** 1986. Extrachromosomal sequences of hepatitis B virus DNA in peripheral blood mononuclear cells of acquired immune deficiency syndrome patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 5698-5702.
- Nowell, P. & Hungerford, D.** 1960. A minute chromosome in human granulocytic leukemia. *Science*, **132**, 1497.
- Nuchprayoon, I., Simkevich, C.P., Luo, M., Friedman, A.D. & Rosmarin, A.G.** 1997. GABP cooperates with c-Myb and C/EBP to activate the neutrophil elastase promoter. *Blood*, **89**, 4546-4554.
- Oda, M., Furukawa, K., Ogata, K., Sarai, A., Ishii, S., Nishimura, Y. & Nakamura, H.** 1997. Investigation of the pyrimidine preference by the c-Myb DNA-binding domain at the initial base of the consensus sequence. *J. Biol. Chem.*, **272**, 17966-17971.
- Oelgeschläger, M., Krieg, J., Lüscher-Firzlaff, J.M., & Lüscher, B.** 1995. Casein kinase II phosphorylation site mutations in c-Myb affect DNA binding and transcriptional cooperativity with NF-M. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 5966-5974.
- Oelgeschläger, M., Janknecht, R., Krieg, J., Schreck, S. & Lüscher, B.** 1996a. Interaction of the co-activator CBP with Myb proteins : effects on Myb-specific transactivation and the cooperativity with NF-M. *EMBO J.*, **15**, 2771-2780.
- Oelgeschläger, M., Nuchprayoon, I., Lüscher, B. & Friedman, A.D.** 1996b. C/EBP, c-Myb, and PU.1 cooperate to regulate the neutrophil elastase promoter. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 4717-4725.
- Ogata, K., Morikawa, S., Nakamura, H., Sekikawa, A., Inoue, T., Kanai, H., Sarai, A., Ishii, S., & Nishimura, Y.** 1994. Solution structure of a specific DNA complex of the Myb DNA-binding domain with cooperative recognition helices. *Cell*, **79**, 639-648.
- Ogata, K., Morikawa, S., Nakamura, H., Hojo, H., Yoshimura, S., Zhang, R., Aimoto, S., Ametani, Y. Hirata, Z & Sarai, A.** 1995. Comparison of the free and DNA-complexed forms of the DNA-binding domain from c-Myb. *Nature Structural Biology*, **2**, 309-320.

- Ogata K., Kanei-Ishii, C., Sasaki, M., Hatanaka, H., Nagadoi, A., Enari, M., Nakamura, H., Nishimura, Y., Ishii, S., & Sarai, A. 1996. The cavity in the hydrophobic core of Myb DNA-binding domain is reserved for DNA recognition and *trans*-activation. *Nature structural biology*, **3**, 178-187.
- Ogram, S.A. & Reeves, R. 1995. Differential regulation of a multipromoter gene. Selective 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induction of a single transcription start site in the HMG-I/Y gene. *J. Biol. Chem.*, **270**, 14235-14242.
- Okuda, K., Golub, T.R., Gilliland, D.G. & Griffin, J.D. 1996. P210BCR/ABL, p190BCR/ABL and TEL/ABL activate similar signal transduction pathways in hematopoietic cell lines. *Oncogene*, **13**, 1147-1152.
- Onate, S.A., Prendergast, P., Wagner, J.P., Nissen, M., Reeves, R., Pettijohn, D.E. & Edwards, D.P. 1994. The DNA-bending protein HMG-1 enhances progesterone receptor binding to its target DNA sequences. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 3376-3391.
- Ording, E., Kvavik, W., Bostad, A. & Gabrielsen, O.S. 1994. Two functionally distinct half sites in the DNA-recognition sequence of the Myb oncoprotein. *Eur. J. Biochem.*, **222**, 113-120.
- Ostapchuk, P., Scheirle, G., & Hearing, P. 1989. Binding of nuclear factor EF-C to a functional domain of the hepatitis B virus enhancer region. *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 2787-2797.
- Öslund Farrants, A.-K., Blomquist, P., Kwon, H. & Wrangé, Ö. 1997. Glucocorticoid receptor-glucocorticoid response element binding stimulates nucleosome disruption by the SWI/SNF complex. *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 895-905.
- Ozawa, K., Hagiwara, H., Tang, X., Saka, F., Kitabayashi, I., Shiroki, K., Fujinaga, K., Israël, A., Gachelin, G. & Yokoyama, K. 1993. Negative regulation of the gene for H-2K^b class I antigen by adenovirus 12-E1A is mediated by a CAA repeated element. *J. Biol. Chem.*, **268**, 27258-27268.
- Pandey, P., Raingeaud, J., Kaneki, M., Weichselbaum, R., Davis, R.J., Kufe, D. & Kharbanda, S. 1996. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase by c-Abl-dependent and -independent mechanisms. *J. Biol. Chem.*, **271**, 23775-23779.
- Papadopoulos, P., Ridge, S.A., Boucher, C.A. & Stocking, C. 1995. The novel activation of *ABL* by fusion to an *ets*-related gene, *TEL*. *Cancer Res.*, **55**, 34-38.
- Parisi, M.A. & Clayton, D.A. 1991. Similarity of human mitochondrial transcription factor 1 to high mobility group proteins. *Science*, **252**, 965-969.
- Patel, N.U., Jameel, S., Isom, H. & Siddiqui, A. 1989. Interactions between nuclear factors and the hepatitis B virus enhancer. *J. Virol.*, **63**, 5293-5301.

- Paull, T.T., Haykinson, M.J. & Johnson, R.C.** 1993. The nonspecific DNA-binding and -bending proteins HMG1 and HMG2 promote the assembly of complex nucleoprotein structures. *Genes Dev.*, **7**, 1521-1534.
- Pawson, T. & Gish, G.D.** 1992. SH2 and SH3 domains : from structure to function. *Cell*, **71**, 359-362.
- Payet, D. & Travers, A.A.** 1997. The acidic tail of the high mobility group protein HMG-D modulates the structural selectivity of DNA binding. *J. Mol. Biol.*, **266**, 66-75.
- Pendergast, A.M., Traugh, J.A. & Witte, O.N.** 1987. Normal cellular and transformation-associated *abl* proteins share common sites for protein kinase C phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 4280-4289.
- Pendergast, A.M., Muller, A.J., Havlik, M.H., Maru, Y. & Witte, O.N.** 1991. BCR sequences essential for transformation by the *BCR-ABL* oncogene bind to the ABL SH2 regulatory domain in a non-phosphotyrosine-dependent manner. *Cell*, **66**, 161-171.
- Pendergast, A.M., Gishzky, M.L., Havlik, M.H. & Witte, O.N.** 1993. SH1 autophosphorylation of p210^{BCR-ABL} is required for transformation but not growth factor independence. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 1728-1736.
- Pendergast, A.M.** 1996. Nuclear tyrosine kinase : from Abl to WEE1. *Curr. Op. Cell Biol.*, **8**, 174-181.
- Perrotti, D., Melotti, P., Skorski, T., Casella, I., Peschle, C. & Calabretta, B.** 1995. Overexpression of the zinc finger protein MZF1 inhibits hematopoietic development from embryonic stem cells : Correlation with negative regulation of *CD34* and *c-myc* promoter activity. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 6075-6087.
- Peters, R., King, C.-Y., Ukiyama, E., Falsafi, S., Donahoe, P.K. & Weiss, M.A.** 1995. An SRY mutation causing human sex reversal resolves a general mechanism of structure-specific DNA recognition : Application to the four-way DNA junction. *Biochemistry*, **34**, 4569-4576.
- Pil, P.M. & Lippard, S.J.** 1992. Specific binding of chromosomal protein HMG1 to DNA damaged by the anticancer drug cisplatin. *Science*, **256**, 234-237.
- Pil, P.M., Chow, C.S. & Lippard, S.J.** 1993. High-mobility-1 protein mediates DNA bending as determined by ring closures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 9465-9469.
- Plath, K., Engel, K., Schwedersky, G. & Gaestel, M.** 1994. Characterization of the proline-rich region of mouse MAPKAP kinase 2 : Influence on catalytic properties and binding to the c-Abl SH3 domain *in vitro*. *Bioch. Biophys. Res. Comm.*, **203**, 1188-1194.

- Plaza, S., Turque, N., Dozier, C., Bailly, M., & Saule, S.** 1995. c-Myb acts as transcriptional activator of the quail PAX6 (PAX-QNR) promoter through two different mechanisms. *Oncogene*, **10**, 329-340.
- Postnikov, Y.V., Lehn, D., Robinson, R.C., Friedman, F.K., Shiloach, J. & Bustin, M.** 1994. Homodimers of chromosomal proteins HMG-14 and HMG-17 in nucleosome cores. *J. Mol. Biol.*, **252**, 423-432.
- Press, R.D., Reddy, E.P. & Ewert, D.L.** 1994. Overexpression of C-terminally but not N-terminally truncated Myb induces fibrosarcomas : a novel nonhematopoietic target cell for the *myb* oncogene. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 2278-2290.
- Press, R.D., Wisner, T.W. & Ewert, D.L.** 1995. Induction of B cell lymphomas by overexpression of a Myb oncogene truncated at either terminus. *Oncogene*, **11**, 525-535.
- Puil, L., Lui, J., Gish, G., Mbamula, G., Bowtell, D., Pelicci, P.G., Arlinghaus, R. & Pawson, T.** 1994. Bcr-Abl oncoproteins bind directly to activators of the Ras signalling pathway. *EMBO J.*, **13**, 764-773.
- Qadri, I., Maguire, H.F., & Siddiqui, A.** 1995. Hepatitis B virus transactivator protein X interacts with the TATA-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 1003-1007.
- Ramsay, R.G., Thompson, M.A., Hayman, J.A., Reid, G., Gonda, T.J. & Whitehead, R.H.** 1992. Myb expression is higher in malignant human colonic carcinoma and premalignant adenomatous polyps than in normal mucosa. *Cell Growth Diff.*, **3**, 723-730.
- Ramsay, R.G., Morrice, N., Van Eeden, P., Kanagasundaram, V., Nomura, T., De Blaquiére, J., Ishii, S. & Wettenhall, R.** 1995. Regulation of c-Myb through protein phosphorylation and leucine zipper interactions. *Oncogene*, **11**, 2113-2120.
- Raschellà, G., Negroni, A., Sala, A., Pucci, S., Romeo, A. & Calabretta, B.** 1995. Requirement of B-*myb* function for survival and differentiative potential of human neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.*, **270**, 8540-8545.
- Ratajczak, M.Z., Hijiya ; N., Catani, L., DeReiel, K., Luger, S.M., McGlave, P. & Gewirtz A.M.** 1992a. Acute- and chronic-phase Chronic Myelogenous Leukemia colony-forming units are highly sensitive to the growth inhibitory effects of c-*myb* antisense oligodesoxynucleotides. *Blood*, **79**, 1956-1961.
- Ratajczak, M.Z., Kant, J.A., Luger, S.M., Hijiya ; N., Zhang, J., Zon, G. & Gewirtz A.M.** 1992b. *In vivo* treatment of human leukemia in a *scid* mouse model with c-*myb* antisense oligodesoxynucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 11823-11827.
- Read, C.M., Cary, P.D., Preston, N.S., Lnenicek-Allen, M. & Crane-Robinson, C.** 1994. The DNA sequence specificity of HMG boxes lies in the minor wing of the structure. *EMBO J.*, **13**, 5639-5646.

- Reddy, C.D. & Reddy, E.P.** 1989. Differential binding of nuclear factors to the intron 1 sequences containing the transcriptional pause site correlates with *c-myb* expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 7326-7330.
- Reddy, E.P., Smith, M.J. & Srinivasan, A.** 1983. Nucleotide sequence of Abelson murine leukemia virus genome : structural similarity of its transforming gene product to other *onc* gene products with tyrosine-specific kinase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 3623-3627.
- Reeves, R. & Nissen, M.S.** 1990. The A-T-DNA-binding domain of mammalian high mobility group I chromosomal proteins. A novel peptide motif recognizing DNA structure. *J. Biol. Chem.*, **265**, 8573-8582.
- Reeves, R., Langan, T.A. & Nissen, M.S.** 1991. Phosphorylation of the DNA-binding domain of nonhistone High Mobility Group I protein by *cdc2* kinase : reduction of binding affinity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 1671-1675.
- Reeves, R. & Nissen, M.S.** 1993. Interaction of high mobility group-I (Y) nonhistone proteins with nucleosome core particles. *J. Biol. Chem.*, **268**, 21137-21146.
- Reinhold, W., Emens, L., Itkes, A., Blake, M., Ichinose, I., & Zajac-Kaye, M.** 1995. The Myc Intron-Binding Polypeptide associates with RFX1 in vivo and binds to the major histocompatibility complex class II promoter region, to the hepatitis B virus enhancer, and to regulatory regions of several distinct viral genes. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 3041-3048.
- Reith, W., Kobr, M., Emery, P., Durand, B., Siegrist, C.-A. & Mach, B.** 1994a. Cooperative binding between factors RFX and X2bp to the X and X2 boxes of MHC class II promoters. *J. Biol. Chem.*, **269**, 20020-20025.
- Reith, W., Siegrist, C.-A., Durand, B., Barras, E. & Mach, B.** 1994b. Function of major histocompatibility complex class II promoters requires cooperative binding between factors RFX and NF-Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 554-558.
- Reith, W., UCLA, C., Barras, E., Gaud, A., Durand, B., Herrero-Sanchez, C., Kobr, M. & Mach, B.** 1994c. RFX1, a transactivator of hepatitis B virus enhancer I, belongs to a novel family of homodimeric and heterodimeric DNA-binding proteins. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 1230-1244.
- Ren, R., Mayer, B.J., Cicchetti, P. & Baltimore, D.** 1993. Identification of a 10-amino-acid proline-rich SH3 binding site. *Science*, **259**, 1157-1161.
- Ren, R., Ye, Z.-S. & Baltimore, D.** 1994. Abl protein-tyrosine kinase selects the Crk adapter as a substrate using SH3-binding sites. *Genes Dev.*, **8**, 783-795.
- Renshaw, M.W., Kipreos, E.T., Albrecht, M.R. & Wang, J.Y.J.** 1992. Oncogenic v-Abl tyrosine kinase can inhibit or stimulate growth depending on cell context. *EMBO J.*, **11**, 3941-3951.

- Renshaw, M.W., McWhirter, J.R. & Wang, J.Y.J.** 1995. The human leukemia oncogene *bcr-abl* abrogates the anchorage requirement but not the growth factor requirement for proliferation. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 1286-1293.
- Renshaw, M.W., Lea-Chou, E. & Wang, J.Y.J.** 1996. Rac is required for v-Abl tyrosine kinase to activate mitogenesis. *Current Biology*, **6**, 76-83.
- Rickles, R.J., Botfield, M.C., Weng, Z., Taylor, J.A., Green, O.M., Brugge, J.S. & Zoller, M.J.** 1994. Identification of Src, Fyn, Lyn, PI3K and Abl SH3 domain ligands using phage display libraries. *EMBO J.*, **13**, 5598-5604.
- Robinson, C., Light, Y., Groves, R., Mann, D., Marais, R. & Watson, R.** 1996. Cell-cycle regulation of B-Myb protein expression : specific phosphorylation during the S phase of the cell cycle. *Oncogene*, **12**, 1855-1864.
- Roman, C., Platero, J.S., Shuman, J. & Calame, K.** 1990. Ig/EBP-1 : a ubiquitously expressed immunoglobulin enhancer binding protein that is similar to C/EBP and heterodimerizes with C/EBP. *Genes Dev.*, **4**, 1404-1415.
- Romet-Lemonne, J.L., Frances-Mc Lane, M., Elfassi, E., Haseltine, W.A., Azocar, J., & Essex, M.** 1983. Hepatitis B virus infection in cultured human lymphoblastoid cells. *Science*, **221**, 667-669.
- Ron, D. & Habener, J.F.** 1992. CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. *Genes Dev.*, **6**, 439-453.
- Rosson, D., Dugan, D. & Reddy, E.P.** 1987. Aberrant splicing events that are induced by proviral integration : Implications for *myb* oncogene activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 3171-3175.
- Rosson, D. & O'Brien, T.G.** 1995. Constitutive *c-myb* expression in K562 cells inhibits induced erythroid differentiation but not tetradecanoyl phorbol acetate-induced megakaryocytic differentiation. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 772-779.
- Rosti, V., Bergamaschi, C., Leuotti, C., Danova, M., Carlo-Stella, C., Locatelli, F., Towon, L., Mazini, G. & Cazzola, M.** 1995. Oligodeoxynucleotides antisense to *c-abl* specifically inhibit entry into S-phase of CD34⁺ hematopoietic cells and their differentiation to granulocytes-macrophage progenitors. *Blood*, **86**, 3387-3393.
- Saglio, G., Guerrosia, A., Rosso, C., Zaccaria, A., Tassinari, A., Serra, A., Rega-Combrin, G. Mozza, U. & Gavosto, F.** 1990. New type of Bcr-Abl junction in Ph¹ chromosome positive Chronic Myelogenous Leukemia. *Blood*, **76**, 1819-1824.
- Saikumar, P., Murali, R. & Reddy, E.P.** 1990. Role of tryptophan repeats and flanking amino acids in Myb-DNA interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 8452-8456.

- Saikumar, P., Gabriel, J.L. & Reddy, E.P.** 1994. The Myb oncogene product induces DNA-bending. *Oncogene*, **9**, 1279-1287.
- Sakura, H., Kanei-Ishii, C., Nagase, T., Nakagoshi, H. & Gonda, T.J.** 1989. Delineation of three functional activator encoded by the *c-myb* proto-oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 5758-5762.
- Salgia, R., Li, J.-L., Lo, S.H., Brunkorst, B., Kansas, G.S., Sobhany, E.S., Sun, Y., Pisick, E., Hallek, M., Ernst, T., Tantravahi, R., Chen, L.B. & Griffin, J.D.** 1995. Molecular cloning of human paxillin, a focal adhesion protein phosphorylated by p210^{BCR/ABL}. *J. Biol. Chem.*, **270**, 5039-5047.
- Samadani, U., Porcella, A., Pani, L., Johnson, P.F., Burch, J.B.E., Pine, R. & Costa, R.H.** 1995. Cytokine regulation of the liver transcription factor hepatocyte nuclear factor-3 β is mediated by the C/EBP family and Interferon Regulatory factor 1. *Cell Growth & Diff.*, **6**, 879-890.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R.** 1977. DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5463-5467.
- Sattler, M., Salgia, R., Okuda, K., Uemura, N., Durstin, M.A., Pisick, E., Xu, G., Li, J.-L., Prasad, K.V. & Griffin, J.D.** 1996. The proto-oncogene product p120^{CBL} and the adaptor proteins CRKL and c-CRK link c-Abl, p190^{BCR/ABL} and p210^{BCR/ABL} to the phosphatidylinositol-3' kinase pathway. *Oncogene*, **12**, 839-846.
- Sauer, R.T.** 1995. Minor groove DNA-recognition by α -helices. *Structural Biology*, **2**, 7-9.
- Sawyers, C.L., Callahan, W. & Witte, O.N.** 1992. Dominant negative MYC blocks transformation by *ABL* oncogenes. *Cell*, **70**, 901-910.
- Sawyers, C.L., McLaughlin, J., Goga, A., Havlik, M. & Witte, O.N.** 1994. The nuclear tyrosine kinase c-Abl negatively regulates cell growth. *Cell*, **77**, 121-131.
- Schaller, H. & Fischer, M.** 1991. Transcriptional control of hepadnavirus gene expression. *Current topics Microbiol. Immunol.*, **168**, 21-39.
- Schwartzberg, P.L., Stall, A.M., Hardin, J.D., Bowdish, K.S., Humaran, T., Boast, S., Harbison, M.L., Robertson, E.J. & Goff, S.P.** 1991. Mice homozygous for *abl*^{m1} mutation show poor viability and depletion of selected B and T cell populations. *Cell*, **65**, 1165-1175.
- Schumacher, M.A., Choi, K.Y., Zalkin, H. & Brennan, R.G.** 1994. Crystal structure of LacI member, PurR, bound to DNA : minor groove binding by α helices. *Science*, **266**, 763-770.
- Schuur, E.R., Rabinovich, J.M. & Baluda, M.A.** 1994. Distribution of alternatively spliced chicken *c-myb* exon 9A among hematopoietic tissues. *Oncogene*, **9**, 3363-3365.

- Scott, L.M., Civin, C.I., Rorth, P. & Friedman, A.D.** 1992. A novel temporal expression pattern of three C/EBP family members in differentiating myelomonocytic cells. *Blood*, **80**, 1725-1735.
- Senaca, S., Punyammalee, B., Sureau, A., Perbal, B., Dvorak, M. & Crabell, M.** 1993. The carboxy-terminal domain of c-Myb activates reporter gene expression in yeast. *Oncogene*, **8**, 2335-2342.
- Shafman, T., Khanna, K.K., Kedar, P., Spring, K., Kozlov, S., Yen, T., Hobson, K., Gatei, M., Zhang, N., Watters, D., Egerton, M., Shiloh, Y., Kharbanda, S., Kufe, D. & Lavin, M.F.** 1997. Interaction between ATM protein and c-Abl in response to DNA damage. *Nature*, **387**, 520-523.
- Shapiro, L.H.** 1995. Myb and Ets proteins cooperate to transactivate an early myeloid gene. *J. Biol. Chem.*, **270**, 8763-8771.
- Shaul, Y., Rutter, W.J., & Laub, O.** 1985. A human hepatitis B viral enhancer element. *EMBO J.*, **4**, 427-430.
- Shaul, Y. & Ben-Levy, R.** 1987. Multiple nuclear proteins in liver cells are bound to hepatitis B virus enhancer element and its upstream sequences. *EMBO J.*, **6**, 1913-1920.
- Sheflin, L.G., Fucile, N.W. & Spaulding, S.W.** 1993. The specific interactions of HMG1 and 2 with negatively supercoiled DNA are modulated by their acidic C-terminal domains and involve cysteine residues in their HMG ½ boxes. *Biochemistry*, **32**, 3238-3248.
- Shen-Ong, G.L.C., Potter, M., Mushinski, J.F., Lavu, S. & Reddy, E.P.** 1984. Activation of the *c-myb* locus by viral insertional mutagenesis in plasmocytoid lymphosarcomas. *Science*, **226**, 1077-1080.
- Shen-Ong, G.L.C., Lüscher, B. & Eisenman, R.N.** 1989. A second *c-myb* protein is translated from an alternatively spliced mRNA expressed from normal and 5'-disrupted *myb* loci. *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 5456-5463.
- Sheridan, P.L., Sheline, C.T., Cannon, K., Voz, M.L., Pazin, M.J., Kodonaga, J.T. & Jones, K.A.** 1995. Activation of the HIV-1 enhancer by the LEF-1 HMG protein on nucleosome-assembled DNA in vitro. *Genes Dev.*, **9**, 2090-2104.
- Shi, Y., Alin, K. & Goff, S.P.** 1995. Abl-interactor-1, a novel SH3 protein binding to the carboxy-terminal portion of the Abl protein, suppresses *v-abl* transforming activity. *Genes Dev.*, **9**, 2583-2597.
- Shore, D., Langowski, J. & Baldwin, R.L.** 1981. DNA flexibility studied by covalent closure of short fragments into circles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 4833-4837.

- Shtivelman, E., Lifshitz, B., Gale, R.P., Roe, B.A. & Canaani, E.** 1986. Alternative splicing of RNAs transcribed from the human *abl* gene and from the *bcr-abl* fused gene. *Cell*, **47**, 277-284.
- Shuai, K., Halpern, J., ten Hoeve, J., Rao, X. & Sawyers, C.L.** 1996. Constitutive activation of STAT5 by the BCR-ABL oncogene in chronic myelogenous leukemia. *Oncogene*, **13**, 247-254.
- Shuman, J.D., Vinson, C.R. & McKnight, S.L.** 1990. Evidence of changes in protease sensitivity and subunit exchange rate on DNA binding by C/EBP. *Science*, **249**, 771-774.
- Shykind, B.M., Kim, J. & Sharp, P.A.** 1995. Activation of the TFIID-TFIIA complex with HMG-2. *Genes Dev.*, **9**, 1354-1365.
- Siegrist, C.A., Durand, B., Emery, P., David, E., Hearing, P., Mach, B. & Reith, W.** 1993. RFX1 is identical to Enhancer Factor C and functions as a transactivator of the hepatitis B virus enhancer. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 6375-6384.
- Siino, J.S., Nissen, M.S. & Reeves, R.** 1995. Replacement of conserved threonines by alanines residues in high mobility group protein HMG-I(Y) : effect on DNA binding affinity. *Bioch. Biophys. Res. Comm.*, **207**, 497-507.
- Sitzmann, J., Noben-Trauth, K. & Klempnauer, K.-H.** 1995. Expression of mouse *c-myb* during embryonic development. *Oncogene*, **11**, 2273-2279.
- Sitzmann, J., Noben-Trauth, K., Kamano, H. & Klempnauer, K.-H.** 1996. Expression of B-Myb during mouse embryogenesis. *Oncogene*, **12**, 1889-1894.
- Siu, G., Wuster, A. L., Lipsick, J.S., & Hedrick, S.M.** 1992. Expression of the CD4 gene requires a Myb transcription factor. *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 1592-1604.
- Slamon, D.J., Boone, T.C., Murdock, D.C., Keith, D.E., Press, M.F., Larson, R.A. & Souza, L.M.** 1986. Studies of the human *c-myb* gene and its product in human acute leukemias. *Science*, **233**, 347-351.
- Sleeman, J.P.** 1993. *Xenopus A-myb* is expressed during early spermatogenesis. *Oncogene*, **8**, 1931-1941.
- Solano, R., Nieto, C., Avila, J., Canas, L., Diaz, I. & Paz-Ares, J.** 1995 Dual DNA binding specificity of a petal epidermis-specific MYB transcription factor (MYB.Ph3) from *Petunia hybrida*. *EMBO J.*, **14**, 1773-1784.
- Solomon, M.J., Strauss, F. & Varshavsky, A.** 1986. A mammalian high mobility group protein recognizes any stretch of six A/T base pairs in duplex DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 1276-1280.

- Songyang, Z., Schoelson, S.E., Chaudhuri, M., Gish, G., Pawson, T., Haser, W.G., King, F., Roberts, T., Ratnofsky, S., Lecheider, R.J., Neel, B.G., Birge, R.B., Fajardo, J.E., Chou, M.M., Hanafusa, H., Schaffhausen, B. & Cantley, L.C. 1993. SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell*, **72**, 767-778.
- Songyang, Z., Carraway III, K.L., Eck, M.J., Harrison, S.C., Feldman, R.A., Mohammadi, M., Schlessinger, J., Hubbard, S.R., Smith, D.P., Eng, C., Lorenzo, M.J., Ponder, B.A.J., Mayer, B.J. & Cantley, L.C. 1995. Catalytic specificity of protein-tyrosine kinases is critical for selective signalling. *Nature*, **373**, 536-539.
- Starr, D.B. & Hawley, D.K. 1991. TFIID binds in the minor groove of the TATA box. *Cell*, **67**, 1231-1240.
- Stein, B., Cogswell, P.C. & Baldwin, A.S.Jr. 1993. Functional and physical associations between NF-kappa B and C/EBP family members : a Rel domain-bZIP interaction. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 3944-3974.
- Stein, B. & Yang, M.X. 1995. Repression of the Interleukin-6 promoter by estrogen receptor is mediated by NF- κ B and C/EBP β . *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 4971-4979.
- Sterneck, E., Müller, C., Katz, S. & Leutz, A. 1992. Autocrine growth induced by kinase type oncogenes in myeloid cells requires AP-1 and NF-M, a myeloid specific, C/EBP-like factor. *EMBO J.*, **11**, 115-126.
- Stober-Grässer, U., Brydolf, B., Grässer, F., Firtel, R.A. & Lipsick, J.S. 1992. The Myb DNA-binding domain is highly conserved in *Dictyostelium discoideum*. *Oncogene*, **7**, 589-596.
- Strick, R. & Laemmli, U.K. 1995. SARs are *cis* DNA elements of chromosome dynamics : Synthesis of a SAR repressor protein. *Cell*, **83**, 1137-1148.
- Stros, M., Stokrova, J. & Thomas, J.O. 1994. DNA looping by the HMG-box domains of HMG1 and modulation of DNA binding by the acidic C-terminal domain. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 1044-1051.
- Su., F. & Schneider, R.J. 1996. Hepatitis B virus HBx protein activates transcription factor NF-kappa B by acting on multiple cytoplasmic inhibitors of rel-related proteins. *J. Virol.*, **70**, 4558-4566.
- Suhasini, M., Reddy, C.D., Reddy, E.P., DiDonato, J.A. & Pilz, R.B. 1997. CAMP-induced NF- κ B (p50/*relB*) binding to a *c-myb* intronic enhancer correlates with *c-myb* up-regulation and inhibition of erythroleukemia cell differentiation. *Oncogene*, **15**, 1859-1870.
- Suckow, M., von Wilcken-Bergmann, B. & Müller-Hill, B. 1993. Identification of three residues in the basic regions of the bZIP proteins GCN4, C/EBP and TAF-1 that are involved in specific DNA binding. *EMBO J.*, **12**, 1193-1200.

- Sureau, A., Soret, J., Vellard, M., Crochet, J. & Perbal, B.** 1992. The PR264/*c-myb* connection : Expression of a splicing factor modulated by a nuclear proto-oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 11683-11687.
- Suzuki, M.** 1989. SPKK, a new nucleic acid-binding unit of protein found in histone. *EMBO J.*, **8**, 797-803.
- Takahashi, T., Nakagoshi, H., Sarai, A., Nomura, N., Yamamoto, T. & Ishii, S.** 1995. Human *A-myb* gene encodes a transcriptional activator containing the negative regulatory domains. *FEBS Lett.*, **358**, 89-96.
- Tang, X., Li, H.-O., Sakatsume, O., Ohta, T., Tsutsui, H., Smit, A.F.A., Horikoshi, M., Kourilsky, P., Istael, A., Gachelin, G. & Yokoyama, K.** 1995. Cooperativity between an upstream TATA-like sequence and a CAA repeated element mediates E1A-dependant negative repression of H-2K^b class I gene. *J. Biol. Chem.*, **270**, 2327-2336.
- Tanikawa, J., Yasukawa, T., Enari, M., Ogata, K., Nishimura, Y., Ishii, I. & Sarai, A.** 1993. Recognition of specific DNA sequences by the *c-myb* proto-oncogene product : role of three repeat units in the DNA-binding domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 9320-9324.
- Tashiro, S., Takemoto, Y., Handa, H., & Ishii, S.** 1995. Cell type-specific *trans*-activation by the *B-myb* gene product : requirement of the putative cofactor binding to the C-terminal conserved domain. *Oncogene*, **10**, 1699-1707.
- Tentravahi, R., Dudek, H., Patel, G. & Reddy, E.P.** 1996. Murine myeloid leukemic cells with disrupted *myb* loci show splicing anomalies that account for heterogeneous sizes in *myb* proteins. *Oncogene*, **13**, 1187-1196.
- Teo, S.-H., Grasser, K.D. & Thomas, J.O.** 1995a. Differences in the DNA-binding properties of the HMG-box domains of HMG1 and the sex-determining factor SRY. *Eur. J. Biochem.*, **230**, 943-950.
- Teo, S.-H., Grasser, K.D., Hardman, C.H., Broadhurst, R.W., Laue, E.D. & Thomas, J.O.** 1995b. Two mutations in the HMG-box with very different structural consequences provide insights into the nature of binding to four-way junction DNA. *EMBO J.*, **14**, 3844-3853.
- Thanos, D. & Maniatis, T.** 1992. The high mobility group protein HMG I(Y) is required for NF-kappa B-dependent virus induction of the human IFN-beta gene. 1992. *Cell*, **71**, 777-789.
- Thiele, C.J., Cohen, P.S. & Israel, M.A.** 1988. Regulation of *c-myb* expression in human neuroblastoma cells during retinoic acid-induced differentiation. *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 1677-1683.

- Thomassin, H., Hamel, D., Bernier, D., Guertin, M. & Belanger, L.** 1992. Molecular cloning of two C/EBP-related proteins that bind to the promoter and the enhancer of the α 1-fetoprotein gene. Further analysis of C/EBP β and C/EBP γ . *Nucleic Acids Res.*, **20**, 3091-3098.
- Thompson, C.B., Challoner, P.B., Neiman, P.E., & Groudine, M.** 1986. Expression of the *c-myb* proto-oncogene during cellular proliferation. *Nature*, **319**, 374-380.
- Thompson, J.F. & Landy, A.** 1988. Empirical estimation of protein-induced DNA bending angles : applications to λ site-specific recombination complexes. *Nucleic Acids Res.*, **16**, 9687-9705.
- Thompson, L.H., Brookman, K.W., Jones, N.J., Allen, S.A., & Carrano, A.V.** 1990. Molecular cloning of the human *XRCC1* gene, which corrects defective DNA strand break repair and sister chromatid exchange. *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 6160-6171.
- Timmons, M.S. & Witte, O.N.** 1989. Structural characterization of BCR gene product. *Oncogene*, **4**, 559-567.
- Tiollais, P., Pourcel, C., & Dejean, A.** 1985. The hepatitis B virus. *Nature*, **317**, 489-495.
- Todokoro, K., Watson, R.J., Higo, H., Amanuma, H., Kuramochi, S., Yanagisawa, H. & Ikawa, Y.** 1988. Down-regulation of *c-myb* gene expression is a prerequisite for erythropoietin-induced erythroid differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 8900-8904.
- Tong, X., Drapkin, R., Yalamanchili, R., Mosialos, G. & Kieff, E.** 1995. The Epstein-Barr virus nuclear protein 2 acidic domain forms a complex with a novel cellular coactivator that can interact with TFIIE. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 4735-4744.
- Torelli, G.M., Venturelli, D., Colo, A., Zanni, C., Selli, L., Moretti, L., Calabretta, B. & Torelli, U.L.** 1987. Expression of *c-myb* proto-oncogene and other cell cycle-related genes in normal and neoplastic human colonic mucosa. *Cancer Res.*, **47**, 5266-5269.
- Toth, C.R., Hostutler, R.F., Baldwin, A.L.Jr. & Bender, T.P.** 1995. Members of the nuclear factor κ B family transactivate the murine *c-myb* gene. *J. Biol. Chem.*, **270**, 7661-7671.
- Toth, F.D., Kiss, J., Kiss, A., Telek, B., Ivanyi, J. & Rak, K.** 1994. Co-expression of *c-abl* and *c-myb* oncogenes in Philadelphia chromosome-negative, *bcr*-negative chronic myeloid leukemia. *Leuk. Res.*, **18**, 373-380.
- Trauth, K., Mutschler, B., Jenkins, N.A., Gilbert, D.J., Copeland, N.G., & Klempnauer, K.H.** 1994. Mouse *A-myb* encodes a *trans*-activator and is expressed in mitotically active cells of the developing central nervous system, adult testis and B lymphocytes. *EMBO J.*, **13**, 5994-6005.

- Travers, A.A.** 1995. Reading the minor groove. *Nature Struct. Biol.*, **2**, 615-618.
- Tremethick, D.J. & Molloy, P.L.** 1988. Effects of high mobility group proteins 1 and 2 on initiation and elongation of specific transcription by RNA polymerase II *in vitro*. *Nucleic Acids Res.*, **16**, 11107-11123.
- Trent, J.M., Thompson, F.H. & Meyskens, F.L.** 1989. Identification of a recurring translocation site involving chromosome 6 in human malignant melanoma. *Cancer Res.*, **49**, 420-423.
- Trieschmann, L., Postnikov, Y.V., Rickers, A. & Bustin, M.** 1995. Modular structure of chromosomal proteins HMG-14 and HMG-17: definition of a transcriptional enhancement domain distinct from the nucleosomal binding domain. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 6663-6669.
- Tsukiyama, T., Becker, P.B. & Wu, C.** 1994. ATP-dependent nucleosome disruption at a heat-shock promoter mediated by binding of GAGA transcription factor. *Nature*, **367**, 525-532.
- Tsukiyama, T. & Wu, C.** 1995. Purification and properties of an ATP-dependent nucleosome remodeling factor. *Cell*, **83**, 1011-1020.
- Tybulewicz, V.L.J., Crawford, C.E., Jackson, P.K., Bronson, R.T. & Mulligan, R.C.** 1991. Neonatal lethality and lymphopenia in mice with a homozygous disruption of the *c-abl* proto-oncogene. *Cell*, **65**, 1153-1163.
- Um, M., Li, C. & Manley, J.L.** 1995. The transcriptional repressor even-skipped interacts directly with TATA-binding protein. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 5007-5016.
- Umek, R.M., Friedman, A.D. & McKnight, S.L.** 1991. CCAAT-enhancer binding protein: A component of a differentiation switch. *Science*, **251**, 288-292.
- Vallejo, M., Ron, D., Miller, C.P. & Habener, J.F.** 1993. C/ATF, a member of the activating transcription factor family of DNA-binding proteins, dimerizes with CAAT/enhancer-binding proteins and directs their binding to cAMP response elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 4679-4683.
- Van Etten, R.A., Jackson, P. & Baltimore, D.** 1989. The mouse type IV *c-abl* gene product is a nuclear protein, and activation of transforming ability is associated with cytoplasmic localization. *Cell*, **58**, 669-678.
- Vannice, J.L., & Levinson, A.D.** 1988. Properties of the human hepatitis B virus enhancer: position effects and cell-type nonspecificity. *J. Virol.*, **62**, 1305-1313.
- Vinson, C.R., Hai, T. & Boyd, S.M.** 1993. Dimerization specificity of the leucine zipper-containing b-ZIP motif on DNA binding: prediction and rational design. *Genes Dev.*, **7**, 1047-1058.

- Vorbrueggen, G., Kalkbrenner, F., Guehmann, S., & Moelling, K.** 1994. The carboxyterminus of human c-myb protein stimulates activated transcription in *trans*. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 2466-2475.
- Waga, S., Mizuno, S. & Yoshida, M.** 1988. Nonhistone protein HMG1 removes the transcriptional block caused by left-handed Z-form segment in a supercoiled DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **153**, 334-339.
- Waga, S., Mizuno, S. & Yoshida, M.** 1990. Chromosomal protein HMG1 removes the transcriptional block caused by the cruciform in supercoiled DNA. *J. Biol. Chem.*, **265**, 19424-19428.
- Wang, J.Y.J.** 1992. Oncoprotein phosphorylation and cell cycle control. *Bioch. Biophys. Acta*, **1114**, 179-192.
- Wang, J.Y.J.** 1993. Abl tyrosine kinase in signal transduction and cell-cycle regulation. *Curr. Op. Genet. Devel.*, **3**, 35-43.
- Wang, S., Cosstick, R., Gardner, J.F. & Gumport, R.I.** 1995. The specific binding of *Escherichia coli* integration host factor involves both major and minor grooves of DNA. *Biochemistry*, **34**, 13082-13090.
- Watson, R.J., Robinson, C. & Lam, E.W.** 1993. Transcription regulation by murine B-myb is distinct from that by c-myb. *Nucleic Acids Res.*, **21**, 267-272.
- Watt, F. & Molloy, P.L.** 1988. High mobility group proteins 1 and 2 stimulate binding of a specific transcription factor to the adenovirus major late promoter. *Nucleic Acids Res.*, **16**, 1471-1486.
- Wedel, A., & Ziegler-Heitbrock, H.W.L.** 1995. The C/EBP family of transcription factors. *Immunobiology*, **193**, 171-185.
- Weinstein, Y., Ihle, J.N., Lavu, S. & Reddy, E.P.** 1986. Truncation of the c-myb gene by a retroviral integration in an interleukin 3-dependant myeloid leukemia cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 5010-5014.
- Weir, H.M., Kraulis, P.J., Hill, C.S., Raine, A.R., Laue, E.D. & Thomas, J.O.** 1993. Structure of the HMG box motif in the B-domain of HMG1. *EMBO J.*, **12**, 1311-1319.
- Welch, P.J. & Wang, J.Y.J.** 1993. A C-terminal protein-binding domain in the retinoblastoma protein regulates nuclear c-Abl tyrosine kinase in the cell cycle. *Cell*, **75**, 779-790.
- Welch, P.J. & Wang, J.Y.J.** 1995a. Disruption of retinoblastoma protein function by coexpression of its C pocket fragment. *Genes Dev.*, **9**, 31-46.

- Welch, P.J. & Wang, J.Y.J.** 1995b. Abrogation of retinoblastoma protein function by c-Abl through tyrosine kinase-dependant and -independent mechanisms. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 5542-5551.
- Wen, S.T., Jackson, P.K. & Van Etten, R.A.** 1996. The cytostatic function of c-Abl is controlled by multiple nuclear localization signals and requires the p53 and Rb tumor suppressor gene products. *EMBO J.*, **15**, 1583-1595.
- Wen, S.T. & Van Etten, R.A.** 1997. The *PAG* gene product, a stress-induced protein with antioxidant properties, is an Abl SH3-binding protein and a physiological inhibitor of c-Abl tyrosine kinase activity. *Genes Dev.*, **11**, 2456-2467.
- Westin, E.H., Gallo, R.C., Arya, S.K., Eva, A., Souza, L.M., Baluda, M.A., Aaronson, S.A. & Wong-Staal, F.** 1982. Differential expression of the *amv* gene in human hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 2194-2198.
- Weston, K. & Bishop, J.M.** 1989. Transcription activation by the *v-myb* oncogene and its cellular progenitor, *c-myb*. *Cell*, **58**, 85-93.
- Weston, K.** 1992. Extension of the DNA binding consensus of the chicken c-Myb and v-Myb proteins. *Nucleic Acids Res.*, **20**, 3043-3049.
- van de Wetering, M. & Clevers, H.** 1992. Sequence-specific interaction of the HMG box proteins TCF-1 and SRY occurs within the minor groove of a Watson-Crick double helix. *EMBO J.*, **11**, 3039-3044.
- van de Wetering, M., Oosterwegel, M., van Norren, K. & Clevers, H.** 1993. Sox-4, an SRY-like HMG box protein, is a transcriptional activator in lymphocytes. *EMBO J.*, **12**, 3847-3854.
- Williams, J.S. & Andrisani, O.M.** 1995. The hepatitis B virus X protein targets the basic region-leucine zipper domain of CREB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 3819-3823.
- Williams, S.C., Cantwell, C.A. & Johnson, P.F.** 1991. A family of C/EBP-related proteins capable of forming covalently linked leucine zipper dimers in vitro. *Genes Dev.*, **5**, 1553-1567.
- Wisniewski, J.R. & Schulze, E.** 1994. High affinity interaction of dipteran high mobility group (HMG) proteins 1 with DNA is modulated by COOH-terminal regions flanking the HMG box domain. *J. Biol. Chem.*, **269**, 10713-10719.
- Wisniewski, J.R., Schulze, E. & Sappetto, B.** 1994. DNA binding and nuclear translocation in insect high-mobility-group protein-1 (HMG1) proteins is inhibited by phosphorylation. *Eur. J. Biochem.*, **255**, 687-693.
- Wolff, L., Koller, R. & Davidson, W.** 1991. Acute myeloid leukemia induction by amphotropic murine retrovirus (4070A) : Clonal integrations involve *c-myb* in some but not all leukemias. *J. Virol.*, **65**, 3607-3616.

- Wong, J.M. & Bateman, E.** 1994. TBP-DNA interactions in the minor groove discriminate between A:T and T:A base pairs. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 1890-1896.
- Wong, K.K., Hardin, J.D., Boast, S., Cooper, C.L., Merrel, K.T., Doyle, T.G., Goff, S.P. & Calame, K.L.** 1995a. A role for c-Abl in c-myc regulation. *Oncogene*, **70**, 705-711.
- Wong, K.K., Zou, X., Merrell, K.T., Patel, A.J., Marcu, K.B., Chellappan, S. & Calame, K.L.** 1995b. v-Abl activates c-myc transcription through the E2F site. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 6535-6544.
- Wu, H.M. & Crothers, D.M.** 1984. The locus of sequence-directed and protein-induced DNA bending. *Nature*, **308**, 509-513.
- Yee, J.-K.** 1989. A liver-specific enhancer in the core promoter region of human hepatitis B virus. *Science*, **246**, 658-661.
- Young, R.A.** 1991. RNA polymerase II. *Annu. Rev. Biochem.*, **60**, 689-715.
- Yuan, Z.-M., Huang, Y., Whang, Y., Sawyers, C., Weichselbaum, R., Kharbanda, S. & Kufe, D.** 1996a. Role for c-Abl tyrosine kinase in growth arrest response to DNA damage. *Nature*, **382**, 272-274.
- Yuan, Z.-M., Huang, Y., Fan, M.M., Sawyers, C., Kharbanda, S. & Kufe, D.** 1996b. Genotoxic drugs induce interaction of the c-Abl tyrosine kinase and the tumor suppressor protein p53. *J. Biol. Chem.*, **271**, 26457-26460.
- Yuan, Z.-M., Huang, Y., Ishiko, T., Kharbanda, S., Weichselbaum, R. & Kufe, D.** 1997. Regulation of DNA-damage-induced apoptosis by the c-Abl tyrosine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 1437-1440.
- Yuh, C.H. & Ting, L.P.** 1993. Differentiated liver cell specificity of the second enhancer of hepatitis B virus. *J. Virol.*, **67**, 142-149.
- Zaiman, A.L. & Lenz, J.** 1996. Transcriptional activation of a retroviral enhancer by CBF (AML1) requires a second factor: evidence for the cooperativity with c-Myb. *J. Virol.*, **70**, 5618-5629.
- Zajak-Kaye, M., Gelmann, E.P. & Levens, D.** 1988. A point mutation in the c-myc locus of a Burkitt lymphoma abolishes binding of a nuclear protein. *Science*, **240**, 1776-1779.
- Zelevnik-Le, N.J., Harden, A.M. & Rowley, J.D.** 1994. 11q23 translocations split the "AT-hook" cruciform DNA binding region and the transcriptional repression domain from the activation domain of the mixed-lineage leukemia (MLL) gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 10610-10614.

- Zhou, X., Benson, K.F., Przybysz, K., Liu, J., Hou, Y., Cherath, L. & Chada, K. 1996. Genomic structure and expression of the murine *Hmgi-c* gene. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 4071-4077.
- Zhu, J. & Shore, S.K. 1996. C-ABL tyrosine kinase activity is regulated by association with a novel SH3-domain-binding protein. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 7054-7062.
- Zobel, A., Kalkbrenner, F., Guehmann, S., Nawrath, M., Vorbrueggen, G., & Moelling, K. 1991. Interaction of the v- and c-Myb proteins with regulatory sequences of the human c-myc gene. *Oncogene*, **6**, 1397-1407.
- Zwilling, S., Konig, H. & Wirth, T. 1995. High mobility group protein 2 functionally interacts with the POU domains of octamer transcription factors. *EMBO J.*, **14**, 1198-1208.

