

Les facteurs de transcription de la famille Ets et la morphogenèse du réseau vasculaire

par Virginie Mattot, Chantal Vercamer, Fabrice Soncin, Véronique Fafeur & Bernard Vandembunder*

CNRS EP560, Institut Pasteur de Lille, Institut de Biologie de Lille, 1, rue Calmette, 59021 Lille. France.

Adresse actuelle de Virginie Mattot : Center for Transgene Technology and Gene Therapy, Flanders InterUniversity Institute for Biotechnology, Campus Gasthuisberg, O & N, B 3000 Leuven, Belgium.

* e-mail: bernard.vandembunder@infobiogen.fr

Reçu le 26 mars 1999

RÉSUMÉ

L'expression de Ets1, Erg et Fli, tous membres de la famille des facteurs de transcription Ets a été associée au déroulement de processus invasifs, comme l'angiogenèse dans des situations normales ou pathologiques. La description du phénotype des cellules endothéliales en culture dans lesquelles est exprimé le domaine de fixation à l'ADN de Ets1 suggère que les membres de sa famille jouent un rôle dans la

morphogenèse de l'arbre vasculaire. Cependant, même si les expériences de transfection transitoire ont permis d'identifier des gènes dont la transcription peut être contrôlée par Ets1 au cours de la formation des vaisseaux sanguins, la détermination des réseaux de régulations dans lesquels interviennent Ets1 et les membres de sa famille est un objectif pour les prochaines années.

SUMMARY The transcription factors of the Ets family and the morphogenesis of the vascular tree

The expression of several members of the Ets family of transcription factors, Ets1, Erg and Fli, correlates with the occurrence of invasive processes such as angiogenesis during normal and pathological development. The description of the phenotype of cultured endothelial cells expressing the DNA binding domain

of Ets1 suggests that members of the Ets family take part in the morphogenesis of the vascular tree. Although transient transfection experiments allowed the identification of putative targets genes for Ets1 during angiogenesis, deciphering the Ets1 regulation networks remains a major goal for the future.

L'identification des facteurs de transcription susceptibles d'être impliqués dans la formation des vaisseaux sanguins est relativement récente. A chacune des étapes de la formation des vaisseaux sanguins on peut associer l'un ou l'autre de ces facteurs en fonction de leur patron d'expression, du phénotype des embryons dans lesquels les gènes codant ces facteurs ont été inactivés, ou encore du résultat des études de la régulation transcriptionnelle dans les cellules endothéliales *in vitro*. L'ensemble de ces travaux suggère qu'il n'y a pas de facteur de transcription spécifique des cellules endothéliales ou d'une seule étape de la formation des vaisseaux sanguins. Ainsi SCL/Tal-1 et GATA-1 et -2 s'expriment dans les îlots sanguins de l'aire extra-embryonnaire, et SCL/Tal-1 est essentiel à la fois pour la différenciation des cellules souches hématopoïétiques et pour le remodelage du réseau de capillaires sur le sac vitellin (Visvader *et al.*,

1998). Chacune des sous unités de HIF-1 dont l'expression est relativement ubiquiste est impliquée dans l'induction de l'angiogenèse par l'hypoxie. L'inactivation du gène codant LKLF qui s'exprime fortement dans le poumon, chez l'adulte, suggère que ce facteur joue un rôle dans la stabilisation de l'arbre vasculaire dans l'embryon.

Cette revue est consacrée aux rôles du facteur de transcription Ets1 et des membres de sa famille dans la mise en place du réseau endothélial.

LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION ETS1 ET LES MEMBRES DE SA FAMILLE

Le proto-oncogène Ets1 code un facteur de transcription dont le domaine de fixation à l'ADN reconnaît des séquences contenant un motif central GGAA/T. Ets1 est



capable de se fixer à l'ADN sous forme monomérique. Ets1 est le membre fondateur d'une famille qui comporte une trentaine de facteurs de transcription, dont la signature est le domaine Ets, domaine de fixation à l'ADN qui a été conservé au cours de l'évolution. Parmi les membres de cette famille, Ets1, Ets2, Erg et Fli1 présentent des homologies entre eux non seulement dans leurs domaines de fixation à l'ADN, mais aussi dans une région conservée distincte du domaine transactivateur.

Des expériences de co-transfection transitoire ont montré que Ets1 peut activer certains promoteurs cellulaires, comme par exemple celui de la stromélysine 1, ou inhiber d'autres promoteurs, comme par exemple celui de la chaîne α du récepteur des cellules T (voir les revues de Crépieux *et al.*, 1994; Ghysdael & Boureux, 1997 et le tableau I). La famille Ets comporte des protéines qui activent, ou des protéines qui répriment la transcription, comme Net et Erf (Sgouras *et al.*, 1995).

L'activité de Ets1 et des membres de sa famille est modulée par leur phosphorylation sur des résidus sérine et thréonine, et par leur capacité de coopérer avec d'autres facteurs de transcription tels que SP1, Fos/Jun, GATA-1 ou CBF. Cette coopération peut être le résultat d'une interaction directe avec des facteurs de transcription (voir les revues de Crépieux *et al.*, 1994; Ghysdael & Boureux, 1997). Ainsi Ets1 s'associe avec USF-1, un membre de la famille hélice-boucle-hélice (Sieweke *et al.*, 1998), avec Jun et MafB de la famille des glissières à leucine (Sieweke *et al.*, 1998). Erg peut interagir phy-

siquement avec Ets2, Fli1 et AP1 (Fos/Jun) (Carrère *et al.*, 1998); un autre membre de la famille Ets, Tel, fixe Fli1 et inhibe l'activité transcriptionnelle de celui-ci (Kwiatkowski *et al.*, 1998).

L'EXPRESSION DE ETS1 EST ASSOCIÉE AU DÉROULEMENT DE PROCESSUS INVASIFS

Les premières expériences de Northern blot et d'immunoprécipitation sur des tissus adultes ont permis de mettre en évidence une expression de Ets1 dans les lymphocytes T et B (Chen *et al.*, 1985; Ghysdael *et al.*, 1986). Grâce à la technique d'hybridation *in situ*, l'expression de Ets1 a été détectée dès la gastrulation, lorsque les cellules de l'épiblaste s'invaginent pour mettre en place le feuillet mésodermique. A ce stade, les transcrits Ets1 sont plus abondants dans les cellules du mésoderme ventral, proches de l'endoderme. Ces cellules, dans l'aire extra-embryonnaire se condensent et forment des îlots compacts appelés îlots sanguins. L'expression de Ets1 dans toutes les cellules des îlots immatures se restreint aux cellules endothéliales situées à la périphérie des îlots matures (Pardanaud & Dieterlen-Lièvre, 1993; Quéva *et al.*, 1993). Par la suite, les vaisseaux sanguins se forment dans l'embryon par différenciation *in situ* de précurseurs des cellules endothéliales (vasculogénèse) ou par bourgeonnement à partir de vaisseaux préexistants (angiogénèse); au cours de ces deux processus, Ets1

TABLEAU I. – Quelques cibles potentielles de Ets1.

Early Growth Response (Egr1) (gène)	Ets1	(Robinson <i>et al.</i> , 1997)
p53 (gène)	Ets2	(Venanzoni <i>et al.</i> , 1996)
Ets1 (gène)	Ets1	(Seth et Papas, 1990)
GATA-1 (promoteur)	Ets1, Ets2, Fli	(Seth <i>et al.</i> , 1993)
myc (promoteur)	Ets1	(Roussel <i>et al.</i> , 1994)
junB (promoteur)	Ets1, Ets2	(Coffer <i>et al.</i> , 1994)
VEGF-R1 (flt-1) (promoteur)	Ets1, Ets2, Erg	(Wakiya <i>et al.</i> , 1996)
Tie (promoteur)	Ets1, Ets2, NERF2	(Iljin <i>et al.</i> , 1999)
PDGF-BB (promoteur)		(Khachigian <i>et al.</i> , 1994)
von Willebrand factor (promoteur)	Ets1, Ets2, Erg	(Schwachtgen <i>et al.</i> , 1997)
Endoglin (promoteur)		(Rius <i>et al.</i> , 1998)
PF4 (promoteur)	Ets1	(Minami <i>et al.</i> , 1998)
Collagenase 1 (promoteur)	Ets1, Ets2, Erg (-)	(Buttice <i>et al.</i> , 1996; Buttice & Kurkinen, 1993)
Stromelysin 1 (promoteur)	Ets1, Ets2	(Wasylyk <i>et al.</i> , 1991)
u-PA (promoteur)	Ets1, Ets2	(Nerlov <i>et al.</i> , 1992)
TIMP (promoteur)	Ets1	(Logan <i>et al.</i> , 1996)
Cyclin D1 (promoteur)	Ets2	(Albanese <i>et al.</i> , 1995)
β 2 integrin (CD18) (promoteur)		(Bottinger <i>et al.</i> , 1994)
α 4 integrin (promoteur)		(Rosen <i>et al.</i> , 1994)
ICAM-1 (promoteur)	ERM, Ets2	(de Launoit <i>et al.</i> , 1998)
Endo A type II keratin (promoteur)	Ets1, Ets2	(Seth <i>et al.</i> , 1994)
VE-cadherin		(Gory <i>et al.</i> , 1998)
Endothelin-converting enzyme 1 β (promoteur)	Ets1	(Orzechowski <i>et al.</i> , 1998)
GM-CSF (promoteur)	Ets1	(Thomas <i>et al.</i> , 1997)
lck tyrosine kinase (promoteur)	Ets1, Ets2	(McCracken <i>et al.</i> , 1994)
Interleukin 2 receptor β -chain (promoteur)	Ets1, GABP	(Lin <i>et al.</i> , 1993)
T-cell receptor β -chain enhancer	Ets1 (-)	(Prosser <i>et al.</i> , 1992)
mim-1 (promoteur)	Ets2 (Myb)	(Dudek <i>et al.</i> , 1992)
Immunoglobulin μ heavy chain enhancer	Ets1 (PU1)	(Nelsen <i>et al.</i> , 1993)

s'exprime dans les cellules endothéliales. Dans les vaisseaux qui irriguent les tissus adultes, l'expression de Ets1 n'est plus détectée. Elle est activée au cours de la cicatrisation, de l'angiogenèse tumorale (Quéva *et al.*, 1993; Vanderbunder *et al.*, 1989; Wernert *et al.*, 1992) ou au cours de la réendothélialisation qui suit une angioplastie avec ballonnet (Tanaka *et al.*, 1998).

L'expression de Ets1 n'est pas spécifique des cellules endothéliales. Ets1 s'exprime aussi dans le mésenchyme proche des épithéliums au cours de l'organogenèse et dans les fibroblastes du stroma entourant des carcinomes invasifs (Grevin *et al.*, 1993; Quéva *et al.*, 1993; Vanderbunder *et al.*, 1989; Wernert *et al.*, 1994; Wernert *et al.*, 1992). L'expression de Ets1 n'est pas détectable dans les épithéliums de l'embryon et les cellules cancéreuses d'origine épithéliale. Cependant l'accumulation des transcrits pour Ets1 est induite dans les cellules épithéliales qui se dissocient et adoptent une morphologie mésenchymateuse, comme les cellules des crêtes neurales ou de la paroi ventrale des somites (Fafeur *et al.*, 1997).

Les patrons d'expression de Erg et Fli1, mais pas celui de Ets2, se superposent à ceux de Ets1 au début du développement, et en particulier dans les îlots sanguins et dans les cellules endothéliales (Dhordain *et al.*, 1995; Meyer *et al.*, 1995).

LES LEÇONS DE L'INACTIVATION

L'inactivation de Ets1 a été obtenue récemment en remplaçant les exons 3 et 4 qui codent pour le domaine transactivateur de Ets1 par le gène *neo*. Les souris *ets1*^{-/-} sont viables et fertiles; cependant la moitié d'entre elles meurt avant le sevrage, 4 semaines après la naissance. Le seul défaut qui ait été décrit précisément dans les souris *ets1*^{-/-} adultes est un déficit en cellules NK (Barton *et al.*, 1998). Bien que les causes de la mortalité périnatale n'aient pas été déterminées, ces résultats suggèrent que l'émergence des cellules souches hématopoïétiques et le développement du réseau vasculaire peuvent se dérouler normalement dans l'embryon en l'absence de Ets1. Il est possible que Erg et Fli-1, dont l'expression se superpose à celle de Ets1 au début du développement, prennent le relais de Ets1 en son absence. L'inactivation complète des gènes *erg* et *fli-1* n'a pas été décrite.

Le gène *tel*, qui code pour un facteur de transcription de la famille Ets, s'exprime de façon relativement ubiquiste dans l'embryon de Souris, à E 8,5 et E 9,5. Cependant les embryons *tel*^{-/-} présentent des défauts de la vascularisation du sac vitellin et une apoptose dans certaines régions spécifiques; ils ne survivent pas au delà de E 11,5 (Wang *et al.*, 1997). Sur le sac vitellin, les vaisseaux sanguins commencent à former une structure en nid d'abeille, mais le remodelage qui conduit à la mise en place de l'arbre vasculaire ne se déroule pas normalement, et l'intégrité du réseau vasculaire n'est pas maintenue.

LE DOMAINE DE FIXATION À L'ADN DE ETS1, UN MUTANT DOMINANT NÉGATIF PARADOXAL

Une stratégie efficace pour étudier le rôle des membres de la famille Ets est d'analyser les conséquences de l'expression d'un mutant dominant négatif. Ce type de mutant a déjà été utilisé dans des fibroblastes et des cellules épithéliales. Les domaines de fixation à l'ADN de Ets1, Ets2 et PU1 renversent la transformation des cellules NIH 3T3 par Ras (Foos *et al.*, 1998; Wasyluk *et al.*, 1994). Le domaine de fixation à l'ADN de Ets1 (Ets1-DB) inhibe les capacités d'invasion des cellules murines MMT dérivées d'une tumeur de la glande mammaire (Delannoy *et al.*, 1998). Les effets du domaine de fixation à l'ADN de Ets2 dans les cellules humaines BT20, dérivées d'un carcinome du sein, sont complexes. Ces cellules sont capables d'envahir le Matrigel (constitué des protéines de la lame basale), et cette activité est stimulée d'un facteur 10 par le CSF1. L'expression du domaine de fixation à l'ADN de Ets2 augmente par deux leur capacité d'envahir le Matrigel en absence de CSF1, mais elle supprime l'augmentation induite par le CSF1 (Sapi *et al.*, 1998).

Nous avons construit des rétrovirus contenant la séquence Ets1-DB pour infecter des cellules endothéliales murines issues de capillaires de cerveau (IBE) et d'aorte (MAE). L'expression de Ets1-DB modifie la morphologie de ces cellules et augmente leur adhérence. Nous avons étudié la capacité de ces cellules à former des structures ressemblant à des capillaires sur des gels de Matrigel. Dans des cultures à long terme, les cellules de capillaires de cerveau exprimant Ets1-DB ont une plus grande capacité de former des structures branchées; cet effet est potentialisé par le FGF2 (Mattot *et al.*, soumis pour publication).

Le mécanisme par lequel agit Ets1-DB n'a pas été déterminé. Ce mutant, qui a été conçu pour entrer en compétition avec Ets1 et les membres de sa famille pour la fixation à l'ADN, peut aussi inhiber l'activité de ces facteurs en se fixant à leurs partenaires. Il est également possible que Ets1-DB active l'expression de certains gènes dans les cellules endothéliales en déplaçant un membre de la famille Ets qui se comporte en inhibiteur. Cependant des tests de transactivation réalisés dans les cellules exprimant Ets1-DB suggèrent que cette protéine inhibe l'activité d'un promoteur contenant des sites de fixation à Ets (Mattot *et al.*, résultats non publiés).

DES PERSONNAGES EN QUÊTE DE SCÉNARIO

Pour définir le rôle de Ets1 et des membres de sa famille au cours de la vasculogenèse ou de l'angiogenèse, il faut identifier les gènes cibles de ces facteurs de transcription dans les cellules endothéliales. En se basant sur l'étude de l'activation de fragments de promoteurs par transfection transitoire (Tableau I), et sur le patron d'expression des gènes correspondants, on peut tenter

de reconstituer les événements déclenchés par l'expression de Ets1 au début de la gastrulation (Fig. 1). Ce scénario est une première tentative pour réunir quelques fragments de puzzle ; il ne prend pas en compte la contribution de Erg et de Fli-1. Il repose sur des corrélations entre des données obtenues *ex vivo* et *in vivo* ; il faut souligner que, pour le moment, aucune expérience fonctionnelle ne permet de le valider.

Ets1 est capable de stimuler son propre promoteur (Fig. 1A) (Seth & Papas, 1990). Cette première boucle de réaction positive permettrait d'augmenter la quantité de protéine Ets1 et d'activer différemment les promoteurs. Ets1 est capable d'activer le promoteur du gène codant pour le facteur de transcription GATA-1 (Seth *et al.*, 1993), dont l'expression est détectée dans les îlots sanguins du sac vitellin (Silver & Palis, 1997) et dans les premiers précurseurs des cellules hématopoïétiques qui émergent dans la paroi ventrale de l'aorte et dans l'allan-

toïde (Caprioli *et al.*, 1998). Ets1 active aussi les promoteurs des gènes codant les récepteurs Tie et Flt1 (VRGFR-1) (Iljin *et al.*, 1999 ; Wakiya *et al.*, 1996) dont l'expression suit celle de Ets1 dans les îlots sanguins (Fig. 1B). L'existence d'une seconde boucle de réaction positive peut être postulée à ce niveau, puisque le VEGF induit dans les cellules endothéliales l'expression de Ets1 (Chen *et al.*, 1997 ; Iwasaka *et al.*, 1996), qui lui-même active le promoteur du récepteur du VEGF. Les membres de la famille Ets sont impliqués dans la régulation du promoteur du gène codant pour la VE-cadhérine, dont l'expression est détectée dans les îlots sanguins (Gory *et al.*, 1998). Ets1 active le promoteur du gène codant le PDGF-B (Khachigian *et al.*, 1994), facteur de croissance qui s'exprime dans les cellules endothéliales et qui serait impliqué dans le recrutement des péricytes pour former des capillaires matures (Fig. 1C) (Lindahl *et al.*, 1997). Le promoteur du PDGF-B contient aussi un site de fixation pour Egr1, qui a été identifié comme un gène cible de Ets1 dans les cellules NIH 3T3 (Robinson *et al.*, 1997) et qui s'exprime dans les cellules endothéliales 30 minutes après dénudation de l'aorte (Khachigian *et al.*, 1996). Le patron d'expression de Egr1 n'a pas été décrit, mais on peut faire l'hypothèse que ce facteur de transcription participe aussi à l'angiogenèse, puisque son expression est stimulée par les forces de cisaillement qui jouent un rôle dans la morphogenèse de l'arbre vasculaire.

Cependant les résultats des expériences de transfection réalisées *in vitro*, le plus souvent dans des fibroblastes ou dans des cellules épithéliales, ne peuvent pas toujours s'extrapoler pour les cellules endothéliales *in vivo*. Ainsi le promoteur du gène codant le facteur de von Willebrand est lui aussi activé par Ets1 (Schwachtgen *et al.*, 1997), mais cette activation est peut être artefactuelle parce que le facteur von Willebrand est caractéristique des cellules endothéliales différenciées (Coffin *et al.*, 1991), alors que Ets1 est détecté dans des cellules plus immatures. De même Ets1 est capable d'activer les promoteurs des gènes codant pour la stromélysine, la collagénase 1 et l'activateur du plasminogène de type urokinase (u-PA) (Buttice *et al.*, 1996 ; Buttice & Kurkinen, 1993 ; Nerlov *et al.*, 1992 ; Wasylyk *et al.*, 1991) ; des oligonucléotides antisens qui réduisent l'expression de Ets1 dans les cellules endothéliales diminuent la quantité des ARNs pour l'u-PA et pour la collagénase 1, et inhibent la migration et la capacité d'invasion de ces cellules endothéliales *in vitro* (Chen *et al.*, 1997 ; Iwasaka *et al.*, 1996). Cependant la surexpression de Ets1 dans les cellules endothéliales n'augmente pas la quantité des ARNs pour l'u-PA dans ces cellules (cité dans Oda *et al.*, 1999). Au cours de l'oncogenèse et de l'ontogenèse, on ne détecte pas les ARNs pour l'u-PA ou la collagénase 1 dans les cellules endothéliales (Bolon *et al.*, 1996 ; Grevin *et al.*, 1993 ; Mattot *et al.*, 1995). L'expression de l'u-PA dans les cellules endothéliales a été observée uniquement dans les vaisseaux qui irriguent l'endomètre au cours de l'implantation de l'embryon ; dans ces cellules, l'expression des transcrits de l'u-PA et celle de Ets1 se superposent (Grevin *et al.*, 1993).

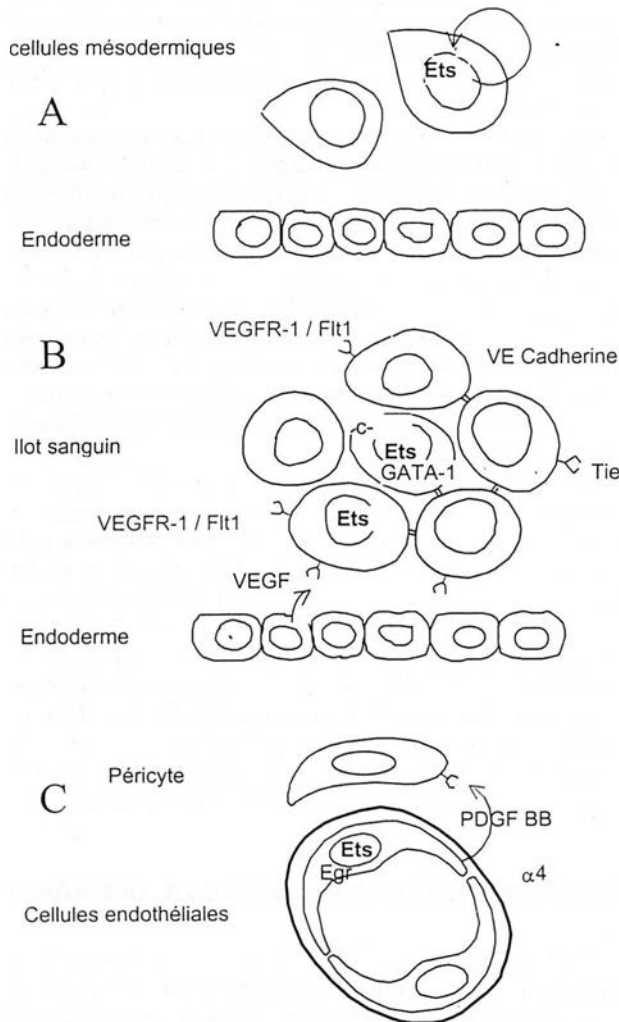


FIG. 1. — Au cours de la migration des cellules qui vont former les îlots sanguins (A), au cours de la maturation de ces îlots (B), au cours de la formations des capillaires (C), Ets1 est susceptible d'activer les gènes cibles indiqués.

PERSPECTIVES

L'expression du facteur de transcription Ets1 a été détectée dans les cellules endothéliales activées au cours de l'angiogenèse normale ou pathologique, dans les tissus adultes et embryonnaires. Les patrons d'expression de Ets1, Erg et Fli se superposent au début du développement dans les cellules endothéliales; l'existence d'une telle superposition dans les tissus adultes lors de l'angiogenèse reste à déterminer. Le phénotype des cellules dans lesquelles s'exprime le domaine de fixation à l'ADN de Ets1 suggère que les membres de la famille Ets peuvent agir comme des régulateurs positifs ou négatifs de l'angiogenèse. On ne connaît pas aujourd'hui de gène cible de Ets1 dans les cellules endothéliales. Les techniques de transgénèse ciblée sur l'endothélium ou de recombinaison homologue n'ont pas encore fourni des informations majeures sur les rôles de Ets1 et des membres de sa famille dont l'expression a été associée à l'angiogenèse. Dans le futur, l'ensemble de ces travaux devrait permettre de décrire les réseaux de régulations auxquels participent les membres de la famille Ets, et de comprendre les propriétés émergentes de ces réseaux, l'intégration des signaux selon des échelles de temps différentes, l'existence de boucles de contre-réaction qui se maintiennent elles mêmes, la stabilisation d'états différents selon l'amplitude et la durée des signaux extérieurs (Bhalla *et al.*, 1999).

BIBLIOGRAPHIE

- Albanese C., Johnson J., Watanabe G., Eklund N., Vu D., Arnold A. & Pestell R. G., Transforming p21ras mutants and c-Ets-2 activate the cyclin D1 promoter through distinguishable regions. *J. Biol. Chem.*, 1995, 270, 23589-23597.
- Bacharach E., Itin A. & Keshet E., *In vivo* patterns of expression of urokinase and its inhibitor PAI-1 suggest a concerted role in regulating physiological angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1992, 89, 10686-10690.
- Barton K., Muthusamy N., Fischer C., Ting C. N., Walunas T. L., Lanier L. L. & Leiden J. M., The Ets-1 transcription factor is required for the development of natural killer cells in mice. *Immunity*, 1998, 9, 555-563.
- Bhalla U. S. & Iyengar R., Emergent properties of networks of biological signaling pathways. *Science*, 1999, 283, 381-387.
- Bolon I., Brambilla E., Vandenbunder B., Robert C., Lantuejoul S. & Brambilla C., Changes in the expression of matrix proteases and of the transcription factor c-Ets-1 during progression of precancerous bronchial lesions. *Lab. Invest.*, 1996, 75, 1-13.
- Bottinger E. P., Shelley C. S., Farokhzad O. C. & Amaout M. A., The human beta 2 integrin CD18 promoter consists of two inverted Ets cis elements. *Mol. Cell Biol.*, 1994, 14, 2604-2615.
- Buttice G., Duterque C. M., Basuyaux J. P., Carrere S., Kurkinen M. & Stehelin D., Erg, an Ets-family member, differentially regulates human collagenase (MMP1) and stromelysin 1 (MMP3) gene expression by physically interacting with the Fos/Jun complex. *Oncogene*, 1996, 13, 2297-2306.
- Buttice G. & Kurkinen M., A polyoma enhancer A-binding protein-3 site and Ets-2 protein have a major role in the 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate response of the human stromelysin gene. *J. Biol. Chem.*, 1993, 268, 7196-7204.
- Caprioli A., Jaffredo T., Gautier R., Dubourg C. & Dieterlen-Lièvre F., Blood-borne seeding by hematopoietic and endothelial precursors from the allantois. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95, 1641-1646.
- Carrere S., Verger A., Flourens A., Stehelin D. & Duterque C. M., Erg proteins, transcription factors of the Ets family, form homo, heterodimers and ternary complexes via two distinct domains. *Oncogene*, 1998, 16, 3261-3268.
- Chen J. H., The proto-oncogene c-Ets1 is preferentially expressed in lymphoid cells. *Mol. Cell Biol.*, 1985, 5, 2993-3000.
- Chen Z. Q., Fisher R. J., Riggs C. W., Rhim J. S. & Lautenberger J. A., Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration by Ets1 antisense oligonucleotides. *Cancer Res.*, 1997, 57, 2013-2019.
- Coffer P., De Jonge M., Mettouchi A., Binetruy B., Ghysdael J. & Kruijer W., junB promoter regulation: Ras mediated transactivation by c-Ets-1 and c-Ets-2. *Oncogene*, 1994, 9, 911-921.
- Coffin J. D., Harrison J., Schwartz S. & Heimark R., Angioblast differentiation and morphogenesis of the vascular endothelium in the mouse embryo. *Dev. Biol.*, 1991, 148, 51-62.
- Crépieux P., Coll J. & Stehelin D., The Ets family of proteins: weak modulators of gene expression in quest for transcriptional partners. *Crin. Rev. Oncogen.*, 1994, 5, 615-638.
- de Launoit Y., Audette M., Pelczar H., Plaza S. & Baert J. L., The transcription of the intercellular adhesion molecule-1 is regulated by Ets transcription factors. *Oncogene*, 1998, 16, 2065-2073.
- Delannoy C. A., Mattot V., Fafeur V., Fauquette W., Pollet I., Calmels T., Vercamer C., Boilly B., Vandenbunder B. & Desbiens X., The expression of an Ets1 transcription factor lacking its activation domain decreases uPA proteolytic activity and cell motility, and impairs normal tubulogenesis and cancerous scattering in mammary epithelial cells. *J. Cell Sci.*, 1998, 111, 1521-1534.
- Dhordain P., Dewitte F., Desbiens X., Stehelin D. & Duterque-Coquillaud M., Mesodermal expression of the chicken erg gene associated with precartilaginous condensation and cartilage differentiation. *Dev. Biol.*, 1995, 170, 17-28.
- Dudek H., Tantravahi R. V., Rao V. N., Reddy E. S. & Reddy E. P., Myb and Ets proteins cooperate in transcriptional activation of the mim-1 promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, 89, 1291-1295.
- Fafeur V., Tulasne D., Queva C., Vercamer C., Dimster V., Mattot V., Stehelin D., Desbiens X. & Vandenbunder B., The Ets1 transcription factor is expressed during epithelial-mesenchymal transitions in the chick embryo and is activated in scatter-factor stimulated MDCK epithelial cells. *Cell Growth and Diff.*, 1997, 8, 655-665.
- Foos G., Garcia-Ramirez J. J., Galang C. K. & Hauser C. A., Elevated expression of Ets2 or distinct portions of Ets2 can reverse Ras-mediated cellular transformation. *J. Biol. Chem.*, 1998, 273, 18871-18880.
- Ghysdael J. & Boureux A., The Ets family of transcriptional regulators. In *Oncogenes as transcriptional regulators*, Karin M., ed. (Basel, Switzerland: Birkhäuser Verlag), 1997, pp. 29-89.
- Ghysdael J., Gégonne A., Pognonec P., Dermis D., Leprince D. & Stehelin D., Identification and preferential expression in thymic and bursal lymphocytes of a c-Ets1 oncogene-encoded Mr 54,000 cytoplasmic protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, 83, 1714-1718.
- Giovane A., Pintzas A., Maira S. M., Sobieszczuk P. & Wasyluk B., Net, a new ets transcription factor that is activated by ras. *Genes & Dev.*, 1994, 8, 1502-1513.
- Gory S., Dalmon J., Prandini M. H., Kortulewski T., DeL. Y. & Huber P., Requirement of a GT box (Spl site) and two Ets binding sites for vascular endothelial cadherin gene transcription. *J. Biol. Chem.*, 1998, 273, 6750-6755.

- Grevin D., Chen J. H., Raes M. B., Stehelin D., Vandenbunder B. & Desbiens X., Involvement of the proto-oncogene *c-ets 1* and the urokinase plasminogen activator during mouse implantation and placentation. *Int. J. Dev. Biol.*, 1993, 37, 519-529.
- Iljin K., Dube A., Kontusaari S., Korhonen J., Lahtinen I., Oettgen P. & Alitalo K., Role of Ets factors in the activity and endothelial cell specificity of the mouse Tie gene promoter. *Faseb J.*, 1999, 13, 377-386.
- Iwasaka C., Tanaka K., Abe M. & Sato Y., Ets-1 regulates angiogenesis by inducing the expression of urokinase-type plasminogen activator and matrix metalloproteinase-1 and the migration of vascular endothelial cells. *J. Cell Physiol.*, 1996, 169, 522-531.
- Khachigian L. M., Fries J. W., Benz M. W., Bonthron D. T. & Collins T., Navet cis-acting elements in the human platelet-derived growth factor B-chain core promoter that mediate gene expression in cultured vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, 1994, 269, 22647-22656.
- Khachigian L. M., Lindner V., Williams A. J. & Collins T., Egr-1-induced endothelial gene expression: a common theme in vascular injury. *Science*, 1996, 271, 1427-1431.
- Kwiatkowski B. A., Bastian L. S., Bauer T. R. Jr., Tsai S., Zielinska-Kwiatkowska A. G. & Hickstein D. D., The Ets family member Tel binds to the Fli-1 oncoprotein and inhibits its transcriptional activity. *J. Biol. Chem.*, 1998, 273, 17525-17530.
- Lin J. X., Bhat N. K., John S., Queale W. S. & Leonard W. J., Characterization of the human interleukin-2 receptor beta-chain gene promoter: regulation of promoter activity by Ets gene products. *Mol. Cell Biol.*, 1993, 13, 6201-6210.
- Lindahl P., Johansson B. R., Leveen P. & Betsholtz C., Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science*, 1997, 277, 242-245.
- Logan S. K., Garabedian M. J., Campbell C. E. & Werb Z., Synergistic transcriptional activation of the tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promoter via functional interaction of AP-1 and Ets-1 transcription factors. *J. Biol. Chem.*, 1996, 271, 774-782.
- Mattot V., Raes M., Henriot P., Eeckhout Y., Stéhelin D., Vandenbunder B. & Desbiens X., Expression of interstitial collagenase is restricted to skeletal tissue during mouse embryogenesis. *J. Cell. Sci.*, 1995, 108, 529-535.
- McCracken S., Leung S., Bosselut R., Ghysdael J. & Miyamoto N. G., Myb and Ets related transcription factors are required for activity of the human lck type I promoter. *Oncogene*, 1994, 9, 3609-3615.
- Meyer D., Stiegler P., Hindelang C., Mager A. M. & Remy P., Whole-mount *in situ* hybridization reveals the expression of the X1-Fli gene in several lineages of migrating cells in *Xenopus* embryos. *Int. J. Dev. Biol.*, 1995, 39, 909-919.
- Minami T., Tachibana K., Imanishi T. & Doi T., Both Ets-1 and GATA-1 are essential for positive regulation of platelet factor 4 gene expression. *Eur. J. Biochem.*, 1998, 258, 879-889.
- Nelsen B., Tian G., Erman B., Gregoire J., Maki R., Graves B. & Sen R., Regulation of lymphoid-specific immunoglobulin heavy chain gene enhancer by Ets-domain proteins. *Science*, 1993, 261, 82-86.
- Nerlov C., De Cesare D., Pergola F., Caracciolo A., Blasi F., Johnsen M. & Verde P., A regulatory element that mediates cooperation between a PEA3-AP-1 element and an AP-1 site is required for phorbol ester induction of urokinase enhancer activity in HepG2 hepatoma cells. *EMBO J.*, 1992, 11, 4573-4582.
- Oda N., Abe M. & Sato Y., Ets-1 converts endothelial cells to the angiogenic phenotype by inducing the expression of matrix metalloproteinases and integrin beta-3. *J. Cell Physiol.*, 1999, 178, 121-32.
- Orzechowski H. D., Gunther A., Menzel S., Funke K. H., Richter M., Bohnemeier H. & Paul M., Endothelial expression of endothelin-converting enzyme-1 beta mRNA is regulated by the transcription factor Ets-1. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 1998, S55-S57.
- Pardanaud L. & Dieterlen-Lièvre F., Expression of C-ETS1 in early chick embryo mesoderm: relationship to the hemangioblastic lineage. *Cell Adhesion and Communication*, 1993, 1, 151-160.
- Prosser H. M., Wotton D., Geggion A., Ghysdael J., Wang S., Speck N. A. & Owen M. J., A phorbol ester response element within the human T-cell receptor β -chain enhancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, 89, 9934-9938.
- Quéva C., Leprince D., Stéhelin D. & Vandenbunder B., p54^{c-ets-1} and p68^{c-ets-1}, the two transcription factors encoded by the *c-ets-1* locus, are differentially expressed during the development of the chick embryo. *Oncogene*, 1993, 8, 2511-2520.
- Rius C., Smith J. D., Almendro N., Langa C., Botella L. M., Marchuk D. A., Vary C.P. & Bernabeu C., Cloning of the promoter region of human endoglin, the target gene for hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1. *Blood*, 1998, 92, 4677-4690.
- Robinson L., Panayiotakis A., Papas T. S., Kola I. & Seth A., Ets target genes: identification of *egr1* as a target by RNA differential display and whole genome PCR techniques. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94, 7170-7175.
- Rosen G. D., Barks J. L., Iademaro M. F., Fisher R. J. & Dean D. C., An intricate arrangement of binding sites for the Ets family of transcription factors regulates activity of the alpha 4 integrin gene promoter. *J. Biol. Chem.*, 1994, 269, 15652-15660.
- Roussel M. F., Davis J. N., Cleveland J. L., Ghysdael J. & Hiebert S. W., Dual control of myc expression through a single DNA binding site targeted by Ets family proteins and E2F-1. *Oncogene*, 1994, 9, 405-415.
- Sapi E., Flick M. B., Rodov S. & Kacinski B. M., Ets-2 transdominant mutant abolishes anchorage-independent growth and macrophage colony-stimulating factor-stimulated invasion by BT20 breast carcinoma cells. *Cancer Res.*, 1998, 58, 1027-1033.
- Schwachtgen J. L., Janel N., Berek L., Duterque C. M., Ghysdael J., Meyer D. & Kerbiriou N. D., Ets transcription factors bind and transactivate the core promoter of the von Willebrand factor gene. *Oncogene*, 1997, 15, 3091-3102.
- Seth A. & Papas T. S., The *c-ets-1* proto-oncogene has oncogenic activity and isopositively autoregulated. *Oncogene*, 1990, 5, 1761-1767.
- Seth A., Robinson L., Panayiotakis A., Thompson D. M., Hodge D. R., Zhang X. K., Watson D. K., Ozato K. & Papas T. S., The EndoA enhancer contains multiple Ets binding site repeats and is regulated by Ets proteins. *Oncogene*, 1994, 9, 469-477.
- Seth A., Robinson L., Thompson D. M., Watson D. K. & Papas T. S., Transactivation of GATA-1 promoter with Ets1, Ets2 and ERGB/Hu-Fli-1 proteins: stabilization of the Ets1 protein binding on GATA-1 promoter sequences by monoclonal antibody. *Oncogene*, 1993, 8, 1783-1790.
- Sgouras D. N., Athanasiou M. A., Beal G. J. J., Fisher R. J., Blair D. G. & Mavrothalassitis G. J., ERF: an Ets domain protein with strong transcriptional repressor activity, can suppress Ets-associated tumorigenesis and is regulated by phosphorylation during cell cycle and mitogenic stimulation. *EMBO J.*, 1995, 14, 4781-4793.
- Sieweke M. H., Tekotte H., Jarosch U. & Graf T., Cooperative interaction of Ets-1 with USF-1 required for HIV-1 enhancer activity in T cells. *EMBO J.*, 1998, 17, 1728-1739.
- Silver L. & Palis J., Initiation of murine embryonic erythropoiesis: a spatial analysis. *Blood*, 1997, 89, 1154-1164.
- Tanaka K., Oda N., Iwasaka C., Abe M. & Sato Y., Induction of Ets-1 in endothelial cells during reendothelialization after denuding injury. *J. Cell Physiol.*, 1998, 176, 235-244.

- Thomas R. S., Tymms M. J., McKinlay L. H., Shannon M. F., Seth A. & Kola I., Ets1, NfκappaB and AP1 synergistically transactivate the human GM-CSF promoter. *Oncogene*, 1997, 14, 2845-2855.
- Vandenbunder B., Pardanaud L., Jaffredo T., Mirabel M. A. & Stehelin D., Complementary patterns of expression of c-Ets1, c-myb and c-myc in the blood-forming system of the chick embryo. *Development*, 1989, 107, 265-274.
- Venanzoni M. C., Robinson L. R., Hodge D. R., Kola I. & Seth A., Ets1 and Ets2 in p53 regulation: spatial separation of Ets binding sites (EBS) modulate protein: DNA interaction. *Oncogene*, 1996, 12, 1199-1204.
- Visvader J. E., Fujiwara Y. & Orkin S. H., Unsuspected role for the T-cell leukemia protein SCL/tal-1 in vascular development. *Genes Dev.*, 1998, 12, 473-479.
- Wakiya K., Stehelin D., Begue A. & Shibuya M., A cyclic AMP response element and an Ets motif are involved in the transcriptional regulation of flt-1 tyrosine kinase (VEGF receptor 1) gene. *J. Biol. Chem.*, 1996, 271, 30823-30828.
- Wang L. C., Kuo F., Fujiwara Y., Gilliland D. G., Golub T. R. & Orkin S. H., Yolk sac angiogenic defect and intra-embryonic apoptosis in mice lacking the Ets-related factor TEL. *EMBO J.*, 1997, 16, 4374-4383.
- Wasylyk C., Gutman A., Nicholson R. & Wasylyk B., c-Ets oncoprotein activates the stromelysin promoter through the same elements as several non-nuclear oncoproteins. *The Embo J.*, 1991, 10, 1127-1134.
- Wasylyk C., Maira S. M., Sobieszczuk P. & Wasylyk B., Reversion of Ras transformed cells by Ets transdominant mutants. *Oncogene*, 1994, 9, 3665-3673.
- Wernert N., Gilles F., Fafeur V., Bouali F., Raes M. B., Pyke C., Dupressoir T., Seitz G., Vandenbunder B. & Stehelin D., Stromal expression of c-Ets-1 transcription factor correlates with tumor invasion. *Cancer Res.*, 1994, 54, 5683-5688.
- Wernert N., Raes M. B., Lassalle P., Dehouck M. P., Gosselin B., Vandenbunder B. & Stehelin D., The c-Ets1 proto-oncogene is a transcription factor expressed in endothelial cells during tumor vascularisation and other forms of angiogenesis in man. *Am. J. Pathology*, 1992, 140, 119-127.