

Université des Sciences et Technologies de Lille
Institut de Biologie de Lille, UMR8161
Ecole Doctorale Biologie-Santé

DOCTORAT
Biologie-Santé

Présentée par
Kathye VERREMAN

**Identification et caractérisation de
nouveaux partenaires du facteur de
transcription ERM**

Soutenue en public le 03 novembre 2009

Jury :

Président :

Rapporteur :

Examineur :

Directeur de thèse :

Pr Joël MAZURIER

Dr Didier AUBOEUF

Pr Simon SAULE

Pr Claude BEAUDOIN

Dr Didier MONTE

Pr Yvan de LAUNOIT

Université de Lille 1

Université de Lyon 1

Université de Paris 11

Université de Clermont

Université de Lille 1

Université de Lille 1

Я Маман,

Remerciements

Je désire remercier l'ensemble des membres de mon jury qui ont accepté de juger mon travail. Merci au Dr Didier Auboeuf et au Pr Simon Saule d'avoir accepté d'être mes rapporteurs, au Pr Claude Beaudouin d'être mon examinateur et au Pr Joël Mazurier de présider ce jury.

Je tiens à remercier Yvan pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et pour m'avoir suivie, encouragée et fait confiance, et ce depuis le début. Bien qu'ayant de très nombreuses responsabilités, tu as pris à cœur ton rôle de directeur de thèse et je tiens à t'adresser un grand merci pour tout le temps que tu m'as consacré.

Un énorme merci à Didier qui m'a tout (ou presque !) appris pendant ces cinq années et qui a dû supporter mon « fichu » caractère. Nos nombreuses discussions m'ont beaucoup apporté et grâce à toi, j'ai appris à donner le meilleur de moi-même et à trouver des solutions alternatives face aux problèmes rencontrés. Merci également pour ta confiance, tes conseils et tout le temps que tu as consacré à m'encadrer et à corriger mes différents écrits et présentations. Je pense que tes railleries vont me manquer un peu quand même...

Jean-Luc, merci pour tes conseils toujours avisés, ta gentillesse et tes corrections toujours judicieuses de mes différents écrits ou présentations. Je te remercie également de m'avoir épaulée dans l'étude CoAA/sumoylation d'ERM et pour nos nombreuses discussions concernant ce sujet ou d'autres.

Elisabeth, merci pour tout ce que tu m'as appris et pour ton aide précieuse aussi bien technique que dans la relecture de mes rapports mais aussi pour m'avoir tenu compagnie si souvent le soir. Je tiens aussi à te remercier pour avoir toujours été là pour me soutenir dans les moments difficiles. Ta gentillesse et ta bonne humeur ont ponctué ces cinq années de bons moments.

Un grand merci à tous les membres du groupe TDC : Arnaud, mon voisin de bureau pour toutes nos discussions ; David pour tes conseils techniques ; Laurent pour tes remarques constructives (ou non d'ailleurs) et tes blagues ; Patrick, notre Bernard Pivot pour tout ton savoir scientifique et littéraire ; Isabelle, mon ex-voisine de paillasse pour ta gentillesse et ton aide en radioactivité ; Anne pour avoir accepté d'être ma tutrice de monitorat et m'avoir fait confiance pour les ateliers d'IUP ; Franck pour ta joie de vivre et ton aide pour la QPCR et Zou, notre australienne pour tes conseils et ton soutien. J'ai aussi une petite pensée pour mes trois stagiaires Marion, Olivier et Aurélien avec qui j'ai passé de bons moments et à qui j'espère avoir appris quelques petites choses.

Remerciements

Je remercie aussi toute l'équipe Cristallo de Vincent avec qui nous allons bientôt fusionner officiellement mais que nous côtoyons depuis si longtemps ! Je vous remercie pour votre bonne humeur le midi, pour avoir toujours répondu à mes questions et avoir toujours été de bons conseils. Mention spéciale pour Alexis pour tout le temps qu'il a consacré à la relecture du papier CoAA et de ma thèse ainsi que pour tous ses efforts pour enfin sumoyler cette satanée protéine ERM !

Je remercie aussi Hervé pour toutes les analyses spectrométriques que tu as faites pour moi (il y a eu nombre de fois où je t'ai dit « c'est le dernier gel cette fois ») et pour tes explications claires sur le Maldi-Tof.

Je remercie aussi toutes les autres personnes travaillant au 3^e étage de l'IBL pour votre aide au quotidien et pour avoir toujours répondu à mes questions et avoir été si gentils. Une petite pensée pour mes collègues de galère : Capucine (bonne chance pour les USA !), Suzanne (bonne chance pour la suite de ta thèse et promis j'essaierai de garder le rythme à Paris), Zoé, Souhaila, Marion, Béné, Fred, Alioune, Vanessa, Clélia, Emeric, Jonathan, Pierre, Audrey, Nicolas, Seb(s) ...

Je tiens également à remercier mes meilleures amies, Mélanie et Corinne, qui m'ont toujours suivies avec une amitié sans faille et qui ont toujours été là pour m'écouter et m'accueillir dans les bons comme dans les mauvais moments.

Enfin, je tiens à remercier tous ceux qui ont été présents pendant ces cinq années pour me soutenir et parfois supporter ma mauvaise humeur ou mes déprimés : mon père et ma famille bien sûr (un merci tout particulier à ma tante Sylviane) mais aussi ma mère qui, de là haut, a toujours veillé sur moi ; j'espère que tu es fière de moi et que je ne t'ai jamais déçue.

Pour finir, je ne sais comment remercier Nicolas, ma moitié. Merci pour ton soutien au quotidien, pour avoir toujours été à mes côtés pendant ces quatre années. Tu m'as encouragée lors des moments d'abattements et tu m'as toujours remonté le moral quand j'en avais besoin. Depuis plus de 4 ans, je suis heureuse grâce à toi. Merci car je ne suis pas sûre que j'aurai tenu le coup sans toi.

Juste pour finir, je remercie encore ma famille et mes amis ainsi que toutes mes connaissances qui, de près ou de loin, ont contribué à l'aboutissement de ce travail par leur aide ou leur soutien.

Résumé

Résumé

Résumé

ERM est un facteur de transcription de la famille ETS appartenant au groupe PEA3. Ce groupe se compose de trois protéines jouant un rôle important dans divers processus biologiques dont la tumorigenèse mammaire et plus particulièrement dans le processus métastatique. La régulation de l'activité transcriptionnelle de ces protéines nécessite des modifications post-traductionnelles et des interactions avec des partenaires protéiques. A ce jour, très peu d'interacteurs sont connus pour ces facteurs de transcription.

Dans le but d'identifier de nouveaux partenaires d'ERM, nous avons mis au point différentes techniques de chromatographie d'affinité qui ont permis d'isoler plusieurs partenaires potentiels d'ERM. Parmi ceux-ci, trois ont été confirmés comme partenaires directs d'ERM : la protéine CoAA (CoActivator Activator) et les protéines MED23 et MED25.

MED23 et MED25 sont des sous-unités du médiateur. Ce complexe comporte une trentaine de sous-unités et régule la transcription en intégrant les signaux entre des facteurs de transcription fixés sur les enhancers et la machinerie transcriptionnelle (ARN polymérase II + Facteurs généraux de la transcription) située au niveau du promoteur proximal. Nous avons démontré que ces protéines interagissent *in vitro* et *in vivo* avec ERM et sont nécessaires à l'activation transcriptionnelle induite par ce facteur de transcription. Toutefois, ces sous-unités ont une capacité différente de recrutement du médiateur sur ERM *in vitro*. Il reste donc à déterminer si ces protéines agissent de concert ou séparément par exemple en recrutant des complexes médiateurs différents.

CoAA appartient à la famille des ribonucléoprotéines. Cette protéine régule l'expression de certains gènes et l'épissage alternatif des ARN messagers. CoAA interagit *in vitro* et *in vivo* avec ERM. D'un point de vue fonctionnel, l'activité d'ERM est augmentée par la surexpression de CoAA tandis qu'elle est diminuée par sa sous-expression. Cette activation médiée par CoAA est liée à la levée de l'inhibition exercée par la partie N-terminale d'ERM sur son domaine transactivateur. Forts de résultats antérieurs montrant que cette inhibition est liée à la sumoylation, nous avons démontré que CoAA module le taux de sumoylation d'ERM. Ce même phénomène est observé sur les autres membres du groupe PEA3. Néanmoins, le mécanisme moléculaire impliqué dans cette régulation du taux de sumoylation reste encore à élucider. CoAA étant surexprimée dans de nombreux cancers, elle pourrait être un régulateur important de l'activité d'ERM dans cette pathologie.

Ces travaux ont permis de définir de nouvelles voies de régulation de l'activité transcriptionnelle d'ERM et des deux autres membres du groupe PEA3. Il reste maintenant à préciser les mécanismes impliqués dans la modulation de l'activité des membres du groupe PEA3 par ces nouveaux interacteurs.

Mots-clés : ERM, facteur de transcription, régulation transcriptionnelle, partenaires protéiques, CoAA, complexe médiateur.

Résumé

ERM is an ETS transcription factor which belongs to the PEA3 group. This group is comprised of three proteins involved in several processes such as migration and dissemination during organogenesis and cancer development. Regulation of their transcriptional activity requires post-translational modifications and interactions with partner proteins. Nowadays, only a few interactors of these transcription factors are known.

In order to identify new ERM partners, we have developed various affinity chromatography techniques to isolate new potential partners. Among these candidates, CoAA (CoActivator Activator), MED23 and MED25 directly interact with ERM.

MED23 and MED25 are subunits of the mediator. The mediator is a 30 sub-units multi-protein complex which mediates signals from transcription factors bound at upstream promoter elements or enhancers to RNA polymerase II and the general initiation factors bound at the core promoter. We found that MED23 and MED25 interact with ERM *in vitro* and *in vivo* and are required for transcriptional activation induced by ERM. However, these sub-units display various ability to recruit the mediator on ERM *in vitro*. It remains now to determine whether these proteins act together or separately by recruiting for example different mediator complexes.

The heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-like protein CoAA regulates gene expression and RNA splicing. We demonstrated that ERM interacts *in vitro* and *in vivo* with CoAA. ERM transcriptional activity is enhanced upon CoAA overexpression and is decreased by CoAA knock-down. Furthermore, we demonstrated that CoAA modulates ERM transcriptional activity by decreasing sumoylated ERM levels. The same phenomenon was observed on the two other PEA3 group members. The precise molecular mechanism involved in this regulation remains to be elucidated. Since CoAA is overexpressed in many cancers, this protein might be an important regulator of ERM activity in this pathology.

This work demonstrated new ways to regulate the activity of ERM and the two other PEA3 group members. The molecular mechanisms involved in the modulation of PEA3 member activity by these partners remain to be clarified.

Keywords: ERM, transcription factor, transcriptional regulation, proteins partners, CoAA, mediator complex.

Title: Identification and characterisation of new partners of the transcription factor ERM

Sommaire

Sommaire

RESUME	3
SOMMAIRE	7
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	11
ABREVIATIONS	15
INTRODUCTION.....	19
I LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION DU GROUPE PEA3.....	21
A LA FAMILLE ETS	21
1 <i>Présentation générale</i>	21
2 <i>Le domaine ETS</i>	23
3 <i>Rôle des facteurs de la famille ETS</i>	25
4 <i>La famille ETS et cancer</i>	27
B LES MEMBRES DU GROUPE PEA3.....	29
1 <i>Présentation</i>	29
2 <i>Les domaines fonctionnels</i>	30
3 <i>Expression</i>	31
4 <i>Les fonctions biologiques normales</i>	37
5 <i>Implication dans les cancers</i>	41
6 <i>Les gènes cibles connus</i>	47
II MODULATION DE L'ACTIVITE TRANSCRIPTIONNELLE DES MEMBRES DU GROUPE PEA3	51
A MODULATION DE L'ACTIVITE PAR DES INTERACTEURS PROTEIQUES.....	51
1 <i>Facteurs de transcription généraux</i>	51
2 <i>Facteurs de transcription</i>	52
3 <i>Les corégulateurs</i>	61
B MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DES MEMBRES DU GROUPE PEA3	67
1 <i>Phosphorylation</i>	67
2 <i>Acétylation</i>	70
3 <i>Ubiquitination</i>	71
4 <i>Sumoylation</i>	72
5 <i>Conclusions</i>	75
CONCLUSIONS ET OBJECTIF DE LA THESE.....	77
RESULTATS	79
I RECHERCHE DE PARTENAIRES PROTEIQUES D'ERM.....	81
A PURIFICATIONS D'AFFINITE EN TANDEM.....	81
1 <i>Présentation</i>	81
2 <i>Résultats obtenus</i>	87
B PURIFICATIONS SUR DES SUPPORTS DE GST-ERM	89
1 <i>Présentation</i>	89
2 <i>Résultats obtenus</i>	89
C PURIFICATIONS SUR DES SUPPORTS DE ERM BIOTINYLE.....	91
1 <i>Présentation</i>	91

Sommaire

2 Résultats obtenus	91
D TABLEAU RECAPITULATIF DES PARTENAIRES POTENTIELS D'ERM TROUVES LORS DES PURIFICATIONS	93
E VALIDATION DES INTERACTIONS	93
II ERM ET LE COMPLEXE MEDIATEUR.....	95
A PRESENTATION DU MEDIATEUR	95
B QUELLES SOUS-UNITES DU MEDIATEUR INTERAGISSENT AVEC ERM ?	99
C MED23	101
1 Présentation.....	101
2 Interaction entre MED23 et ERM in vivo.....	103
3 Cartographie des domaines d'interaction	105
4 Modulation de l'activité transcriptionnelle d'ERM.....	107
D MED25	109
1 Présentation.....	109
2 Interaction entre MED25 et ERM in vivo.....	111
3 Cartographie des domaines d'interaction	113
4 Modulation de l'activité transcriptionnelle d'ERM.....	115
E IMPLICATION DE MED23 ET MED25 DANS LE RECRUTEMENT DE COMPLEXES MEDIATEURS IN VITRO PAR ERM	117
1 MED23	117
2 MED25	119
F CONCLUSIONS	119
III COAA ET ERM.....	120
A PRESENTATION	120
B CoAA ET ERM : INTERACTION ET FONCTIONNALITE	123
C CoAA MODULE LE TAUX DE SUMOYLATION D'ERM.....	127
1 CoAA n'augmente pas l'activité transcriptionnelle des formes non sumoylables d'ERM.....	127
2 CoAA diminue la sumoylation d'ERM et des autres membres du groupe PEA3.....	129
3 L'augmentation d'activité de G4-ERM 1-298 induite par CoAA est liée à sa sumoylation	131
4 CoAA n'agit pas comme une sumo-protéase sur ERM et n'influence pas la sumoylation globale de la cellule	133
D CONCLUSION	134
DISCUSSION.....	135
I DE L'INTERET D'UTILISER PLUSIEURS APPROCHES DE PURIFICATION.....	137
II ERM INTERAGIT AVEC LE COMPLEXE MEDIATEUR	139
III ERM ET LE COACTIVATEUR COAA.....	147
IV AUTRES PARTENAIRES POTENTIELS D'ERM.....	153
V CONCLUSION ET PERSPECTIVES	156
BIBLIOGRAPHIE	159
ANNEXES	177

Table des illustrations

Figure 1 : Représentation des groupes et de certains membres de la famille ETS. _____	22
Figure 2 : Représentation du domaine de liaison à l'ADN du facteur ETS-1 fixé à l'ADN. _____	23
Tableau 1 : Phénotypes obtenus suite à l'inactivation des membres de la famille ETS. _____	24
Tableau 2 : Implication des facteurs ETS dans différents types de tumeurs. _____	26
Figure 3 : Représentation des domaines conservés entre les membres du groupe PEA3. _____	29
Figure 4 : Domaines fonctionnels de la protéine ERM _____	30
Figure 5 : Expression d'erm, er81 et pea3 dans des coupes de poumon d'embryon de souris à E15.5. _____	32
Tableau 3 : Profil d'expression des membres du groupe PEA3 au niveau neuronal et génital. _____	32
Figure 6. Intervention du GDNF et de l'HGF dans la différenciation des motoneurones (MN). _____	34
Figure 7 : Phénotype observé pour les souris invalidées par recombinaison homologue pour le GDNF, Pea3 ou Er81. _____	38
Figure 8. L'expression d'ERM dans les cellules de Sertoli est essentielle au maintien de la niche des spermatogonies souches. _____	38
Tableau 4 : Corrélations et données fonctionnelles impliquant les facteurs du groupe PEA3 dans les cancers. _____	42
Figure 9 : Modèle du rôle des membres du groupe PEA3 dans l'apparition du phénotype métastatique dans les cellules épithéliales cancéreuses _____	43
Figure 10 : Taux de survie de patientes atteintes d'un cancer du sein en fonction du niveau d'expression d'ERM. _____	45
Tableau 5 : Gènes cibles connus des membres du groupe PEA3. _____	48
Tableau 6 : Les facteurs de transcription et corégulateurs interagissant avec les membres du groupe PEA3 _____	50
Figure 11 : Représentation schématique de l'interaction entre ERM et USF1 par proximité de leur sites de fixation permettant une augmentation de la fixation à l'ADN _____	54
Figure 12 : Recrutement de p300 par PEA3 et β -caténine/Lef-1 sur le promoteur matrilysine. _____	55
Figure 13 : Représentation schématique du recrutement de c-Jun par ERM sur le promoteur de her2/neu induisant une synergie fonctionnelle. _____	57

Sommaire

Figure 14 : Modèle du recrutement du récepteur aux androgènes (AR) par ERM sur le promoteur mmp-1 induisant une diminution de la capacité transactivatrice d'ERM _____	58
Figure 15 : Représentation schématique du recrutement de PEA3 par USF1 sur le promoteur bax. _____	58
Figure 16 : Les protéines de la famille Id empêchent la fixation à l'ADN de PEA3 en se fixant sur leur domaine ETS. _____	60
Figure 17 : Recrutement de corépresseurs par les membres du groupe PEA3 _____	61
Figure 18 : Recrutement de coactivateurs par les membres du groupe PEA3 _____	62
Tableau 7 : Les interacteurs enzymatiques entraînant une modification post-traductionnelle des membres du groupe PEA3 _____	66
Figure 19 : Schéma des différentes voies de phosphorylation des membres du groupe PEA3. _____	68
Figure 20 : Voie de conjugaison de SUMO et localisation subcellulaire de ses différents acteurs. _____	72
Figure 21 : Représentation d'un membre prototype du groupe PEA3 avec ses domaines fonctionnels et ses modifications post-traductionnelles. _____	74
Figure 22 : La régulation de l'activité transcriptionnelle des membres du groupe PEA3 par leurs interacteurs. _____	78
Figure 23 : Caractéristiques du couple d'étiquettes SBP-CBP _____	82
Figure 24 : Représentation schématique des étapes de la Purification d'Affinité en Tandem utilisant les étiquettes CBP-SBP _____	82
Figure 25: Séparation par chromatographie d'exclusion d'extraits nucléaires de cellules MDA-MB-231 exprimant constitutivement CBP-SBP-ERM _____	84
Figure 26 : Les différentes étapes de la purification de CBP-SBP-ERM à partir d'extraits nucléaires de cellules HeLa _____	86
Figure 27 : Séparation par SDS-PAGE et coloration au nitrate d'argent des protéines issues de la purification en tandem d'extraits de cellules HeLa sauvages (WT) ou exprimant CBP-SBP-ERM. _____	86
Figure 28 : Purifications successives sur des supports de GST-ERM _____	88
Figure 29 : Exemple de coloration au coomassie des protéines issues de la purification sur des supports de GST ERM séparées par SDS-PAGE. _____	88
Figure 30 : Exemple de coloration au coomassie des protéines issues de la purification sur des supports d'ERM 1-370 biotinylée séparées par SDS-PAGE. _____	90
Tableau 8 : Récapitulatif des partenaires protéiques potentiels d'ERM identifiés par les différentes techniques de purification. _____	92
Figure 31 : ERM interagit <i>in vitro</i> avec CoAA, PARP1, MED23 et MED25 _____	94
Figure 32 : Le rôle du médiateur _____	95
Figure 33 : La structure du médiateur. _____	96

Sommaire

Figure 34 : Modèle d'activation de la transcription par le médiateur, d'après (Malik and Roeder, 2005)	96
Figure 35 : ERM interagit <i>in vitro</i> avec MED23 et MED25	98
Figure 36 : Le recrutement du médiateur nécessite l'interaction entre le domaine CR3 de E1A (ou de Elk1 phosphorylé) et MED23.	100
Figure 37 : MED23 interagit <i>in vivo</i> avec ERM	103
Figure 38 : La région 1-72 d'ERM est suffisante pour l'interaction avec MED23.	104
Figure 39 : Recherche de la zone d'interaction sur MED23	104
Figure 40 : Impact de l'expression de MED23 sur l'activité transcriptionnelle d'ERM.	106
Figure 41 : Impact de MED23 sur l'activité transcriptionnelle d'ERM	106
Figure 42 : Domaines fonctionnels de MED25.	108
Figure 43 : Modèle de recrutement du médiateur sur VP16 via MED25	108
Figure 44 : MED25 interagit <i>in vivo</i> avec ERM	111
Figure 45: La région 1-72 d'ERM est suffisante pour interagir avec MED25.	112
Figure 46: Le domaine ACID de MED25 est nécessaire pour interagir avec ERM.	112
Figure 47: Le domaine ACID de MED25 est suffisant pour interagir avec ERM.	112
Figure 48 : Impact de la surexpression de MED25 sur l'activité transcriptionnelle d'ERM.	114
Figure 49: Impact de la surexpression de MED25-Nterm sur l'activité transcriptionnelle d'ERM	114
Figure 50 : Implication de MED23 dans le recrutement <i>in vitro</i> du médiateur sur ERM dans les cellules MEF.	116
Figure 51 : Implication de MED23 dans le recrutement <i>in vitro</i> du médiateur sur ERM dans les cellules HeLa.	116
Figure 52 : Implication de MED25 dans le recrutement <i>in vitro</i> du médiateur sur ERM.	118
Figure 53 : Domaines fonctionnels de la protéine CoAA	120
Figure 54: Modèle de l'activation de CoAA dans les cancers.	121
Figure 55 : CoAA n'augmente pas l'activité transcriptionnelle d'ERM KR et ERM EA.	126
Figure 57: CoAA diminue le taux de protéines ER81 et PEA3 conjuguées à SUMO.	128
FIGURE 58. L'augmentation d'activité de G4-ERM 1-298 induite par CoAA est liée à sa sumoylation	130
Figure 59 : CoAA n'agit pas comme une sumo-protéase sur ERM et n'influence pas la sumoylation globale de la cellule	132

Sommaire

Figure 60 : Définition au sein de MED23 d'un domaine d'interaction avec les facteurs de transcription (DIFT). _____	141
Figure 61 : Alignement des domaines acides de VP16 et ERM _____	141
Figure 62 : Schéma illustrant les différentes hypothèses possibles sur le rôle de MED23 et MED25 dans le recrutement du médiateur ou de coactivateurs sur ERM. _____	146
Figure 63 : Représentation schématique du modèle proposé de régulation de l'activité transcriptionnelle d'ERM par CoAA _____	151
Tableau 9 : Rôle connu dans la transcription de partenaires potentiels d'ERM _____	155

Abréviations

AA: Acides aminés
ABL: v-abl Abelson murine leukemia oncogene
ACID: ACtivor Interaction Domain
ACTR: Activator of Thyroid and Retinoic acid Receptor
ADN: Acide DésoxyriboNucléique
ADNc: ADN complémentaire ou copie
AIB1: Amplified In Breast cancer-1 protein
ANOVA: ANalysis Of VAriance
AR: Androgen receptor
ARC-L: activator–recruited factor–large
ARNm: Acide ribonucléique messenger
CBP: CREB binding protein
CBP: Calmodulin Binding Peptide
CDK: cyclin dependant kinase
C/EBP: CCAAT/enhancer-binding protein
CHD3: Chromodomain helicase DNA binding protein 3
ChIP: Chromatin immunoprecipitation
CMV: cytomégalovirus
CoAA: Coactivator activator
CoAM: Coactivator Modulator
COP1: Constitutive photomorphogenetic 1
cox: Cyclooxygenase
CPI: Complexe de pré-initiation
CRE: cAMP (adénosine monophosphate cyclique) responsive element
CRSP: cofactor required for Sp1 activation
DBD: DNA binding domain
DIF: Domaine d’inhibition de la fixation à l’ADN
DIF: Differentiation Inducing Factor
DRIP: vitamin D receptor–interacting proteins
DRN: Domaine de régulation négative
E2F: E2 factor
EBS: ETS Binding Site
EGF: Epithelial growth factor
Egr: early response gene
EGTA: Acide glycoléthylènediamine tétraacétique
ELF: E74 like factor
ELK-1: ETS-like gene-1
ER: estrogen receptor
ER81: Ets-related 81
ERK: Extracellular signalregulated protein kinase
ERM: Ets related molecule
ERF: Ets2 repressor factor
ERG: Early response gene
ESE: Epithelium specific ets
ETS: E-twenty six
ETV: Ets variant

Sommaire

EWS : Ewing's sarcoma protein
MEF : mouse embryonic fibroblast
FGF : Fibroblast growth factor
FLI-1 : Friend leukaemia integration I
F-MuLV : Friend murine leukemia virus
GABP : GA-binding protein
galT1 : β 1,4-galactosyltransferase I
GDNF : Glial derived neurotrophic factor
GH: growth hormone (hormone de croissance)
GHBP : GH-binding protein
GR : Glucocorticoid receptor
GRIP1 : Glucocorticoid receptor-interacting protein
GST : Glutathione S-Tranf rase
HDAC : Histone d sac tylase
HGF : Hepatocyte growth factor
HIF-1 : Hypoxia-inducible factor 1
HLH : helix-loop-helix
hnRNP : heterogenous nuclear ribonucleoprotein
HSF : Heat shock factor
icam-1 :Intracellular adhesion molecule 1
Id: Inhibitor of DNA binding
IE62 : Intermediate Early phase 62kDa
IL : Interleukine
inos : inducible nitric oxide synthase
JNK : Janus kinase
KAP1 : KRAB domain-associated protein
KRAB : Kr ppel-associated box
LEF : Lympho id enhancing factor
LIM : Lin-11 Isl-1 Mec-3 domain
LPP : Lipoma-preferred partner
MALDI-TOF : Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Time of Flight
MAPK : Mitogen activated protein kinase
MEF2 : Myocyte enhancer factor 2
MK2 = MAPKAP : MAPK-activated protein kinase
MMP : Matrix metalloproteinase
MMTV : Mouse mammary tumor virus
MN : Motoneurone
MSK1 : Mitogen- and stress-activated protein kinase 1
mt1-mmp : Membrane-type 1-MMP
muc : Mucine
MybBP1a : MYB binding protein 1a
MYM : Myeloproliferative and mental retardation motif
NCoR : Nuclear receptor corepressor 1
NF B : Nuclear factor  B
NLS : Nuclear localization signal
NRD : Negative regulatory domain
PARP1 : PolyADP-Ribose Polymerase I
P/CAF : p300/ CBP associated factor
PBS : Phosphate Buffer Saline
PDEF : Prostate epithelium-derived Ets transcription factor
PDGFR : Platelet-derived growth factor receptor
PEA3 : Polyomavirus enhancer activator
PIAS : Protein Inhibitor of Activated STAT
PKA : Protein kinase A
PMA : Phorbol myristate ac tate

Sommaire

PML : Promyelocytic leukaemia protein
PoI II : ARN polymérase II
PPAR : Peroxisome proliferator-activated receptor
PSF : PTB associated splicing factor
P-TEFb : Positive transcription elongation factor b
RNAi : ARN interference
RRM : RNA recognition motif
RSK1 : Ribosomal protein s6 kinase
RSRF : Related to SRF
RT-PCR : Retrotranscription polymerase chain reaction
RUNX2 : Runt-related transcription factor 2
SAF-A : Scaffold attachment factor A
SBP : Streptavidin Binding Peptide
SDS : sodium dodecyl sulfate
SENP : Sentrin protease
SFPQ : Splicing factor proline and glutamate-rich
shRNA : small hairpin RNA
SIM : SUMO interacting Motif
SMRT : Silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor
Sp100 : Staphylococcal nuclease domain-containing protein 100
SRC-1 : Steroid receptor coactivator-1
STAT : Signal transducer and activator of transcription
SUMO : Small ubiquitin-related modifier
SYT : Synovial sarcoma translocation protein
TAD : Transactivation domain
TAF : TATA binding protein (TBP) associated factor
TAP : Tandem Affinity Purification
TCF : ternary complex factor
TEL : translocation Ets Leukemia
TERT : Telomerase reverse transcriptase
TFIID : Transcription factor of RNA pol II
TGF β : Transforming growth factor β
TIF1 β : Transcription intermediary factor 1 β
TLS/FUS : Translocation/fusion in liposarcoma
TMPRSS2 : Androgen-regulated trans-membrane protease 2
TORU : TPA oncogene response unit
TRAF : TNF receptor-associated factor
TRAP/SMCC : Thyroid hormone receptor-associated proteins/SRB-Med containing cofactor
TRBP : Thyroid hormone receptor-binding protein
TTF1 : Thyroid transcription factor-1
uPA : Urokinase plasminogen activator
USF1 : Upstream Stimulatory Factor 1
VEGF : vascular endothelial growth factor
VWA : Von Willebrand factor type A

Sommaire

Introduction

Introduction

I Les facteurs de transcription du groupe PEA3

A la Famille ETS

1 Présentation générale

Les protéines de type ETS (Erythroid Twenty Six) forment une famille de facteurs de transcription caractérisés par un domaine de liaison à l'ADN conservé nommé domaine ETS (pour revue (Graves and Petersen, 1998)).

Initialement, la découverte de cette famille fut réalisée lors de l'étude du rétrovirus aviaire E26 qui entraîne l'apparition rapide de leucémies chez le Poulet (Ivanov X, 1962). L'ARN viral est traduit en une protéine de fusion p135GAG-MYB-ETS constituée de deux oncogènes v-MYB et v-ETS et d'une protéine virale GAG (Leprince et al., 1983) (Nunn et al., 1983). La caractérisation de v-ETS, qui induit *in vitro* la transformation de fibroblastes, myéloblastes et érythroblastes (Watson et al., 1987) a ensuite permis l'identification de ses homologues cellulaires, dans un premier temps chez le Poulet avec ck-ETS-1 (Gegonne et al., 1987) et ck-ETS-2 (Boulukos et al., 1988) puis chez l'Homme avec h-ETS-1 et h-ETS-2 (Watson et al., 1988).

De nombreuses autres protéines de la famille ETS ont ensuite été identifiées par homologie de leur domaine de fixation à l'ADN avec celui de ETS-1. De nombreux paralogues ont ainsi été décrits dans divers organismes de la lignée des Métazoaires, aussi bien invertébrés (Hsu and Schulz, 2000) que vertébrés, dont environ trente membres identifiés chez les Mammifères ((Laudet et al., 1999), Figure1) où les gènes de la famille ETS sont répartis sur l'ensemble du génome (Laudet et al., 1999). Les protéines ETS se subdivisent en 13 groupes (présentés dans la figure 1) sur la base du degré d'identité de séquence au sein de leur domaine ETS mais aussi sur la base de leurs structures. Certaines protéines ETS contiennent en effet des domaines conservés autres que le domaine ETS. Ainsi les groupes ETS, GABP, ERG, PDEF, ESE et TEL contiennent également un domaine Pointed qui se structure en un cœur hydrophobe formé par le repliement de 5 hélices α (Slupsky et al., 1998) et qui est impliqué dans les processus d'interaction protéique et plus particulièrement dans les processus d'homo- et d'hétéro-dimérisation de certaines protéines ETS (Slupsky et al., 1998).

Introduction

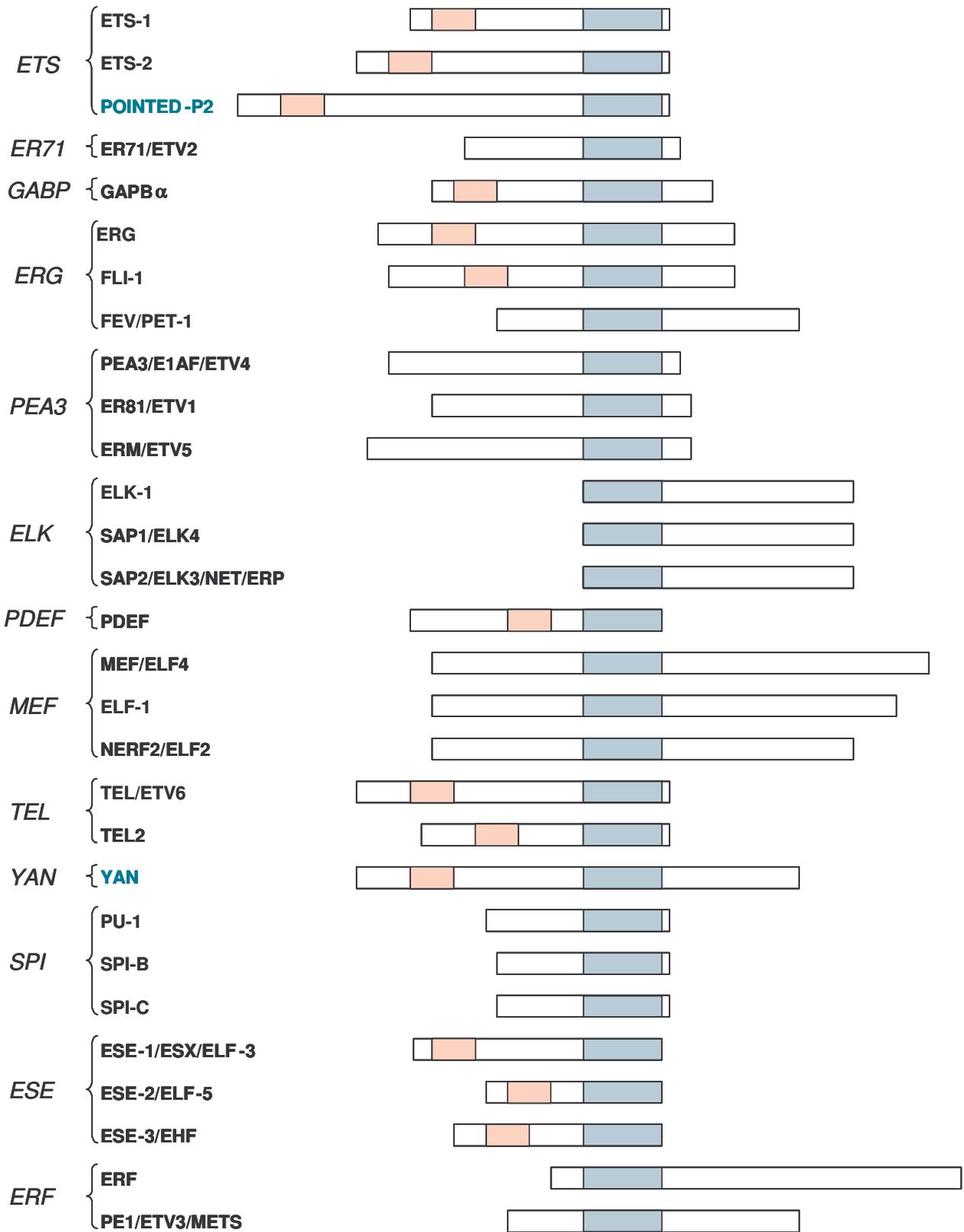


Figure 1 : Représentation des groupes et de certains membres de la famille ETS.

Le domaine ETS est représenté en bleu et le domaine Pointed en rose. Les protéines indiquées en noir sont celles présentes chez les Mammifères et en vert celles chez la Drosophile. D'après (Laudet et al., 1999).

2 Le domaine ETS

Chez la plupart des protéines ETS, le domaine ETS se positionne dans la région C-terminale (Figure 1). Ce domaine d'environ 85 résidus, présente une structure tridimensionnelle hélice-tour-hélice de type ailé (revue (Sharrocks et al., 1997), figure 2). Il est structuré en trois hélices α et quatre brins β antiparallèles organisés de la manière suivante : $\alpha 1 \beta 1 \beta 2 \alpha 2 \alpha 3 \beta 3 \beta 4$. Grâce à ce domaine, les protéines ETS se fixent sous forme monomérique à l'ADN au niveau d'une séquence consensus minimale 5' GGA(A/T) 3' nommée EBS (ETS Binding Site). Le contact entre le domaine ETS et l'ADN est principalement assuré par deux résidus arginine de l'hélice 3 avec les deux guanines de l'EBS au niveau du grand sillon de l'ADN. D'autres jonctions mineures se produisent au niveau des boucles entre $\beta 3 \beta 4$ et $\alpha 2 \alpha 3$ (pour revue (Sharrocks et al., 1997)). La spécificité de reconnaissance des protéines ETS envers les sites du promoteur du gène cible est assurée par les nucléotides flanquant cette séquence minimale (Nye et al., 1992). Néanmoins, une étude récente par « ChIP on chip » a montré que plusieurs membres de la famille ETS pouvaient se fixer sur un même site EBS, prouvant ainsi que la spécificité de fixation sur les sites EBS est relativement faible (Hollenhorst et al., 2007).

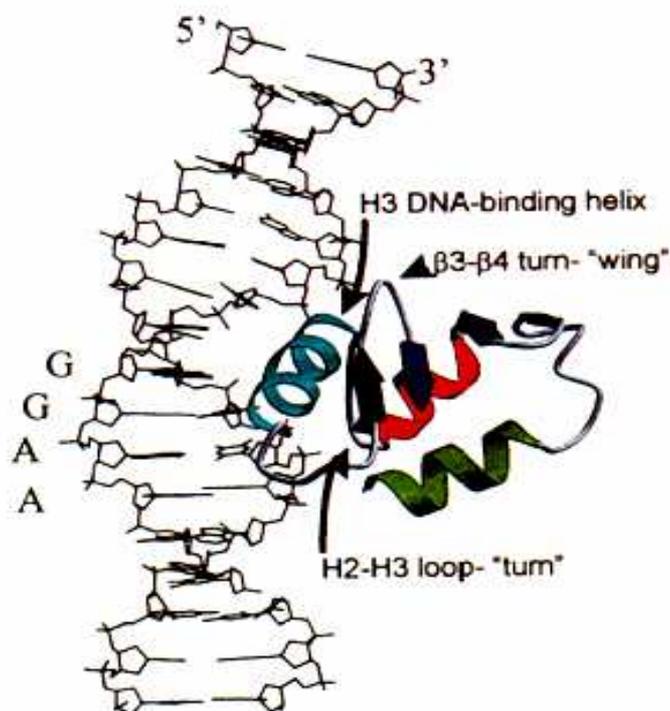


Figure 2 : Représentation du domaine de liaison à l'ADN du facteur ETS-1 fixé à l'ADN.

Les 3 hélices et les 4 feuilletés définis par l'étude de la structure secondaire sont représentés par des structures colorées. Le motif consensus de fixation à l'ADN est indiqué à gauche de la figure. Les 3 points de contact sont signalés par des flèches. D'après (Sharrocks et al., 1997)

Introduction

Groupe	Gène	Phénotype	Anomalies observées	Références
PEA3	Pea3	Viable, les mâles sont stériles	Dysfonctionnement de l'éjaculation	(Laing et al., 2000)
	Erm	Viable, les mâles deviennent stériles	Perturbation de la spermatogenèse	(Chen et al., 2005)
	Er81	Létalité post-natale, à 3-5 semaines	Perte des connexions synaptiques entre les propriorécepteurs et les motoneurones	(Arber et al., 2000)
ETS	Ets1	Viable et fertile, 50% de mortalité néonatale	Réduction du nombre de cellules T et B et accroissement de l'apoptose de ces cellules, problème d'activation du récepteur des lymphocytes T	(Bories et al., 1995) (Muthusamy et al., 1995)
	Ets2	Létalité embryonnaire (< E8,5)	Malformation de l'ectoplacenta, perte de migration du trophoblaste, pas de formation d'amnios et du chorion	(Yamamoto et al., 1998)
ERG	Fli-1	Létalité embryonnaire (< E12,5)	Hémorragies au niveau céphalique, réduction du nombre de cellules progénitrices érythroïdiennes, perturbation de l'hématopoïèse foetale	(Spyropoulos et al., 2000)
	Pet-1 (Fev)	Viable et fertile	Blocage de la différenciation du système central à neurotransmission sérotonergique, comportement agressif	(Hendricks et al., 1999)
ELK	Elk-1	Viable	ND	(Cesari et al., 2004)
	Elk-3 (Net)	Létalité post-natale (1-6 semaines)	Défaillance respiratoire, chylothorax congénital, dilatation des vaisseaux lymphatiques	(Ayadi et al., 2001)
	Elk-4 (SAP1)	Viable	Défaut dans la sélection positive des thymocytes	(Costello et al., 2004)
MEF	Elf-1	Viable	ND	(Lacorazza and Nimer, 2003)
	Elf-4 (MEF)	Viable	Réduction du nombre de cellules NK-T et NK	(Lacorazza et al., 2002)
GABP	Gabp	Létalité embryonnaire (< E7,5)	Pas d'obtention de blastocystes	(Ristevski et al., 2004)
SPI	Pu-1	Létalité embryonnaire (E17,5-18,5) ou post-natale (24-48h) selon la souche de souris	Blocage de la maturation érythrocytaire, défaut de la lignée lymphoïde et de la lignée myéloïde	(Iwama et al., 1998; McKercher et al., 1996; Scott et al., 1997; Scott et al., 1994)
	SpiB	Viable	Défaut dans la signalisation des récepteurs des lymphocytes B	(Su et al., 1997)
TEL	tel	Létalité embryonnaire (E 10,5-11,5)	Echec de la formation et du maintien des vaisseaux vitellins. Apoptose des cellules mésenchymateuses et des cellules neurales	(Wang et al., 1997)
ESE	Elf-5	Létalité embryonnaire (<E7,5)	Chez les souris hétérozygotes, un arrêt du développement de l'épithélium alvéolaire de la glande mammaire pendant la grossesse et la lactation a été observé	(Zhou et al., 2005)
ER71	Er71	Létalité embryonnaire (E9.5)	Echec de développement des vaisseaux, de l'endocarde et des cellules sanguines	(Lee et al., 2008)
ERF	Erf	Létalité embryonnaire à 10.5 jours post coitum	Défauts dans le développement du placenta : problème de différenciation de l'ectoderme extra-embryonnaire	(Papadaki et al., 2007)

Tableau 1 : Phénotypes obtenus suite à l'inactivation des membres de la famille ETS.

ND : non déterminé.

A l'inverse du domaine ETS, les domaines modulateurs de la transcription sont peu, voire pas, conservés au sein de la famille (Graves and Petersen, 1998).

3 Rôle des facteurs de la famille ETS

Dans la famille ETS, on trouve à la fois des activateurs transcriptionnels possédant un ou plusieurs domaines transactivateurs (TAD) et des répresseurs transcriptionnels comme TEL, YAN, NET, ERF, METS et FEV (Mavrothalassitis and Ghysdael, 2000). Ces facteurs de transcription présentent des profils d'expression très variés et s'expriment dans de nombreux tissus où ils régulent un nombre important de gènes cibles. Parmi ces gènes cibles, nous pouvons citer des gènes codant des récepteurs de facteurs de croissance ou de cytokines (*VEGFRs*, *c-met*, *her2/neu*) mais aussi des gènes codant des protéines impliquées dans l'apoptose (*bcl-2*, *bax*, *rc1*), dans l'angiogenèse (*VE-cadherine*, *flt1*), dans la différenciation hématopoïétique (*SCL/Tal1*, *c-kit*), dans la différenciation neuronale (*synaptin II*, *preseniline*), ou encore dans la régulation de la prolifération cellulaire (*p21waf1*, *hTert*, *c-myc*) ou le remodelage de la matrice extracellulaire (*mmp1*, *mmp3*, *heparinase*) (pour revue (Oikawa and Yamada, 2003)). Néanmoins, la spécificité de reconnaissance des sites EBS semble relativement faible au sein de la famille ETS ce qui entraîne une redondance de fixation (Hollenhorst et al., 2007).

A l'heure actuelle, 19 gènes de la famille Ets ont été étudiés par perte de fonction par recombinaison homologue. Certaines de ces inactivations entraînent une létalité précoce ce qui démontre le rôle essentiel de protéines Ets dans le développement embryonnaire. Le tableau 1 présente l'ensemble des phénotypes obtenus et des anomalies de développement constatées. Les résultats des approches de recombinaison homologue ou de transgénése ont montré leur implication dans divers processus cellulaires tels que la régulation de la prolifération cellulaire, la différenciation hématopoïétique, neuronale, myogénique et ostéogénique, l'angiogenèse et l'apoptose (Pour revues (Bartel et al., 2000; Oikawa and Yamada, 2003)). Ces processus nécessitent en effet l'expression de gènes cibles des protéines Ets (pour revue (Oikawa and Yamada, 2003)).

Introduction

Groupe	Membre	Cancer	Anomalies
ETS	ETS1	Thyroïde, côlon, sein, utérus, endomètre, peau, système vasculaire, gastrique, prostate, pancréas, ovaire, cerveau, os/cartilage, foie, poumon, tissu lymphoïde, thymus	Surexpression
	ETS2	Poumon, sein, œsophage, foie, côlon, thyroïde, prostate, utérus	Surexpression
ERG	FLI-1	Tumeurs d'Ewing Leucémie, prostate	Translocation Surexpression
	ERG	Tumeurs d'Ewing, prostate, Leucémie, prostate, utérus, ovaire	Translocations Surexpression
	FEV	Tumeurs d'Ewing	Translocation
PEA3	PEA3	Tumeurs d'Ewing, prostate Sein, poumon, ovaire, utérus, côlon, foie	Translocations Surexpression
	ERM	Tumeurs d'Ewing, prostate Sein, endomètre	Translocations Surexpression
	ER81	Tumeurs d'Ewing, prostate	Translocations
MEF	ELF-1	Leucémie, prostate, endomètre, ovaire	Surexpression
	NERF	Leucémie	Surexpression
	MEF	Leucémie	Surexpression
TEL	TEL	Leucémie, sein	Translocations Mutation ponctuelle
SPI	PU-1	Leucémie	Mutation ponctuelle
	SPI-B	Leucémie	Surexpression
PDEF	PDEF	Sein, prostate	Surexpression
ESE	ESX	Sein	Surexpression

Tableau 2 : Implication des facteurs ETS dans différents types de tumeurs.

D'après la revue de (Seth and Watson, 2005)

4 La famille ETS et cancer

Les premiers liens entre le cancer et les facteurs de transcription ETS ont été proposés dès l'identification du membre fondateur de la famille, ETS-1 (Leprince et al., 1983). Par la suite, de nombreuses protéines de la famille ETS ont été associées au cancer par leur surexpression, leur implication dans des translocations chromosomiques ou leur mutation. Un résumé de leurs implications dans les cancers est présenté dans le tableau 2.

Chez l'Homme, les gènes *ets* ont souvent des profils d'expression modifiés dans des leucémies et des tumeurs solides. Ils y sont fréquemment surexprimés, phénomène souvent associé à un mauvais pronostic de survie (Seth and Watson, 2005). Dans les tumeurs, de nombreuses études ont également démontré une corrélation entre l'expression de facteurs de transcription ETS et celle de certaines métalloprotéases, enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire favorisant le processus métastatique ((Seth and Watson, 2005), (Oikawa and Yamada, 2003)). Les protéines ETS pourraient donc contribuer à l'oncogenèse en favorisant les processus métastatiques et angiogéniques, comme le laisse supposer le fait que des gènes codant des protéases ou des facteurs angiogéniques fassent partie de leurs cibles potentielles (Seth and Watson, 2005).

Cette surexpression des membres de la famille ETS peut être causée par une activation anormale des voies de signalisation régulant leur expression (pour revues (Seth and Watson, 2005), (Oikawa and Yamada, 2003)). Dans quelques cas particuliers, la surexpression d'un gène *ets* est causée par une intégration provirale. C'est le cas du gène *Fli-1* qui est activé par intégration du provirus F-MuLV (Friend Murine Leukemia Virus) ou du gène *pu-1* par le SFFV (Spleen focus forming virus) (pour revue (Seth and Watson, 2005)). Enfin, dans le cancer de la prostate, cette surexpression est causée par un réarrangement chromosomique (pour revue (Narod et al., 2008), voir paragraphe translocations).

Quelques membres de la famille ETS sont également impliqués dans des réarrangements chromosomiques. Certains facteurs de transcription ETS sont fusionnés à divers partenaires suite à une translocation chromosomique et les protéines de fusion ainsi générées participent au processus de cancérisation. Ainsi, les Tumeurs d'Ewing (tumeurs osseuses non différenciées chez l'enfant) sont caractérisées par une translocation chromosomique entraînant la fusion du gène *ews* (codant pour une protéine fixant l'ARN) et d'un gène *ets* (dans 95% des cas, il s'agit de *erg* ou *fli-1* ; dans 5% des cas de *er81*, *fev* ou *pea3*) (Janknecht, 2005). Ces translocations génèrent des protéines de fusion possédant le domaine transactivateur de la protéine EWS et le domaine de fixation à l'ADN du facteur de

Introduction

transcription ETS impliqué. Ceci provoque une forte activation des gènes cibles des protéines ETS car l'activité du domaine transactivateur d'EWS est plus importante que celles des membres de la famille ETS impliqués. Les protéines EWS-ETS ont un pouvoir transformant et transactivent des gènes impliqués dans le cycle cellulaire, la prolifération ou l'apoptose (Janknecht, 2005).

Le gène *tel* est également fréquemment impliqué dans des réarrangements chromosomiques. Il se trouve alors en phase avec de nombreux gènes codant des protéines à activité tyrosine kinase comme le PDGFR β , c-ABL ou Jak-2. L'induction de l'activité kinase, résultant de la fusion, participe alors à la transformation des cellules (Sjoblom et al., 1999) (Lacronique et al., 1997) (Hannemann et al., 1998).

Enfin, la majorité des cancers de la prostate présentent un réarrangement chromosomique de la région non codante du gène *tmprss2* (androgen-regulated transmembrane protease 2) avec un gène d'un membre de la famille ETS (pour revues (Kumar-Sinha et al., 2008; Narod et al., 2008)). Il s'agit le plus souvent du gène *erg* (plus de 50% des cancers de la prostate) (Kumar-Sinha et al., 2008)) mais il a également été décrit que 10% de ces cancers comportaient une fusion avec l'un des membres du groupe PEA3 (Helgeson et al., 2008; Tomlins et al., 2006). Ce réarrangement provoque une forte surexpression de ces membres de la famille ETS en réponse aux androgènes. Cette surexpression pourrait être un élément initiateur dans la tumorigenèse de la prostate ou tout au moins en permettre la progression (Carver et al., 2009; Tomlins et al., 2007). Dans ces cancers, d'autres réarrangements moins fréquents peuvent également avoir lieu entre d'autres gènes et *erm*, *er81* ou *pea3* (pour revue (Narod et al., 2008)).

Pour finir, en marge des phénomènes de surexpression et de translocation chromosomique, des mutations ponctuelles affectant certains gènes *ets* ont été mises en évidence dans certains cancers. Ainsi la mutation du gène *pu-1* a été décrite chez des patients atteints de leucémie myéloïde aiguë. Les mutations générées sont retrouvées principalement dans le domaine ETS et la protéine mutée ne peut ni transactiver ses gènes cibles ni interagir avec ses partenaires protéiques (Mueller et al., 2002).

Chez des patients atteints de leucémies aiguës myéloblastiques, le gène *tel* est parfois muté, en particulier au niveau du domaine ETS ou du domaine Pointed. Les protéines mutées sont alors incapables de réprimer la transcription et agissent comme des dominants négatifs (Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani et al., 2005).

B Les membres du groupe PEA3

1 Présentation

Le groupe PEA3 se compose de trois protéines : PEA3 (E1AF ou ETV4) (Higashino et al., 1993; Xin et al., 1992), ERM (ETV5) (Chotteau-Lelievre et al., 1997; Monte et al., 1994) et ER81 (ETV1) (Brown and McKnight, 1992; Monte et al., 1995; Roussigne and Blader, 2006). Ces protéines d'environ 500 résidus sont des activateurs transcriptionnels et se caractérisent par leur domaine ETS et par un domaine riche en résidus acides, appelé domaine acide (figure 3). Ces protéines présentent 95% d'identité de séquence dans le domaine ETS. Le domaine acide situé en position N-terminale est conservé à plus de 80% et la région C-terminale, située en aval du domaine ETS, présente plus de 50% d'identité (figure 3, (de Launoit et al., 2006)). Ces trois gènes ont été mis en évidence chez de nombreux vertébrés tels que le poisson zèbre, le xénope ou le chimpanzé (pour revue (de Launoit et al., 2006)).

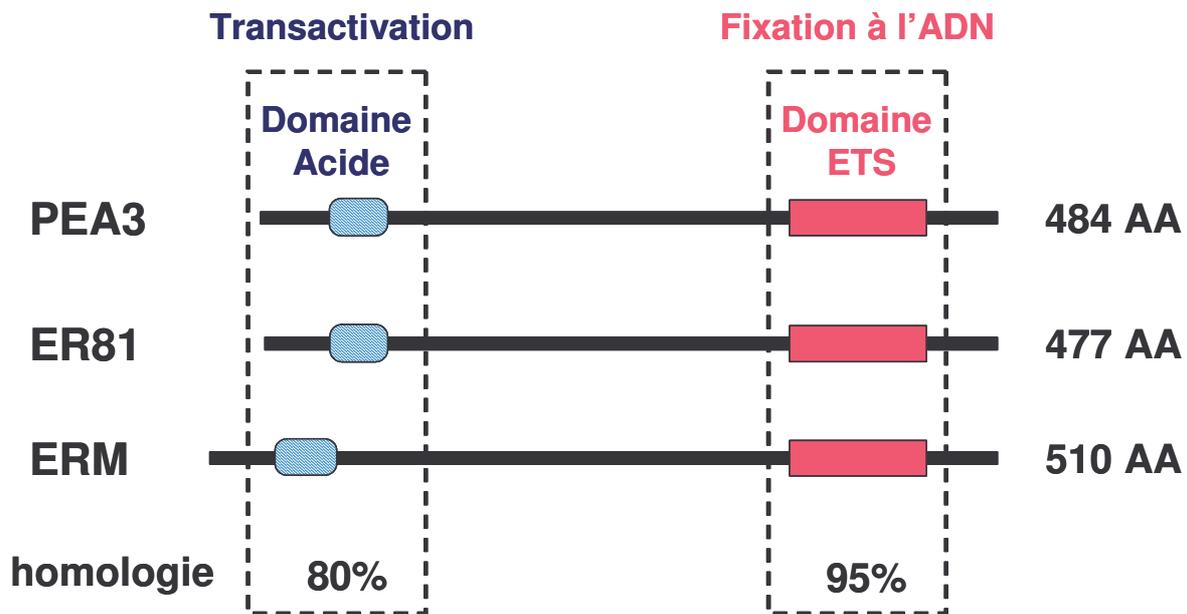


Figure 3 : Représentation des domaines conservés entre les membres du groupe PEA3.

Les pourcentages d'homologie et le nombre d'AA indiqués sont donnés pour les protéines humaines.

Les études phylogénétiques indiquent que les gènes codant ERM et ER81 sont très proches alors que celui codant PEA3 est plus divergent (de Launoit et al., 2000). Chez l'Homme et la souris, les gènes *erm*, *er81* et *pea3* sont constitués de 13 à 14 exons s'étendant sur environ 15kb d'ADN génomique (de Launoit et al., 2000; Monte et al., 1995;

Monte et al., 1996). Dans le génome humain, *erm* est situé sur le chromosome 3 en position 3q27-29, *pea3* sur le chromosome 17 en position 17q21, et *er81* sur le chromosome 7 à la position 7p21. Dans le génome murin, *erm* est situé sur le chromosome 16, *pea3* sur le chromosome 11 et *er81* sur le chromosome 12 (pour revue (de Launoit et al., 2000)).

2 Les domaines fonctionnels

Le domaine ETS, responsable de la fixation à l'ADN, se situe dans la partie C-terminale des protéines du groupe PEA3. Il a été montré que l'affinité des membres du groupe PEA3 pour l'ADN est inférieure à celle du domaine ETS seul (Bojovic and Hassell, 2001; Greenall et al., 2001; Monte et al., 1994). En effet, deux domaines inhibiteurs de la fixation à l'ADN (DIF) jouxtent le domaine ETS (Laget et al., 1996). Toutefois, le mécanisme d'inhibition précis mis en jeu reste inconnu. Ce type d'inhibition n'est pas propre aux membres du groupe PEA3, en effet la fixation de ETS-1 à l'ADN est également inhibée par deux régions flanquant son domaine ETS et cette inhibition s'explique par une coopération intramoléculaire de ces régions structurées en hélices α (pour revue (Graves and Petersen, 1998)). L'interaction avec un partenaire protéique pourrait contribuer à la levée de l'inhibition de la fixation à l'ADN. Ainsi, l'interaction de PEA3 ou de ETS-1 avec USF1 augmente l'affinité des facteurs ETS pour l'ADN (Greenall et al., 2001) (Sieweke et al., 1998).

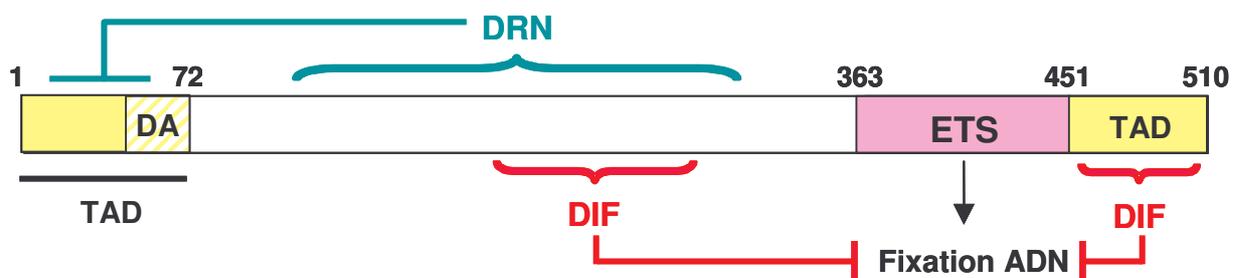


Figure 4 : Domaines fonctionnels de la protéine ERM

TAD : domaine transactivateur. Domaine ETS : domaine de fixation à l'ADN. DIF : régions inhibant la fixation à l'ADN. DRN : domaine réprimant l'activité du domaine transactivateur N-terminal. DA : Domaine acide.

ERM possède deux domaines de transactivation (TAD) : le domaine N-terminal comprenant le domaine acide (DA) et la région C-terminale (figure 4) qui présente une faible activité transcriptionnelle et qui est dépendante du type cellulaire (Defossez et al., 1997). Le domaine N-terminal, qui est donc le principal domaine transactivateur, possède une très forte

Introduction

activité transcriptionnelle dans le système hétérologue Gal4 (Defossez et al., 1997; Laget et al., 1996). Des observations similaires ont été faites pour ER81 (Janknecht, 1996). PEA3 possède également un TAD dans la région N-terminale mais sa région C-terminale ne semble pas posséder d'activité transactivatrice (Bojovic and Hassell, 2001).

L'activité du domaine transactivateur N-terminal des protéines du groupe PEA3 est régulée par des domaines internes. Ainsi, son activité transcriptionnelle est inhibée par un large domaine appelé DRN, pour domaine de régulation négative (Bojovic and Hassell, 2001; Janknecht, 1996; Nakae et al., 1995) situé entre le domaine acide et le domaine ETS (fig. 5). Récemment, il a été démontré que l'inhibition exercée par le domaine DRN est liée à sa sumoylation au niveau de quatre sites consensus, chaque site fonctionnant comme un motif inhibiteur indépendant. La levée de cette répression est en effet possible par mutation des sites de sumoylation ou l'utilisation d'une sumoprotéase (Bojovic and Hassell, 2008; Degerny et al., 2008), (voir paragraphe II B4, page 72).

Ainsi, outre les différents domaines fonctionnels permettant la fixation à l'ADN et la transactivation, les protéines du groupe PEA3 possèdent aussi des régions régulant l'activité de ces domaines.

3 Expression

a- Sites d'expression

Par hybridation *in situ* il a été montré que les trois gènes *pea3*, *erm* et *er81* sont exprimés lors du développement embryonnaire. Dans les stades précoces, le gène *erm* est exprimé à partir de E6,5 dans la portion distale de l'embryon au niveau de l'ectoderme, alors que l'expression de *pea3* apparaît à partir de E7,5 dans la partie postérieure. Ces deux facteurs présentent un patron d'expression qui se recouvre en partie à tous les stades embryonnaires précoces. A contrario, les transcrits de *er81* ne sont pas détectés avant E9,0-9,5 (Chotteau-Lelievre et al., 2001).

Au cours de l'organogenèse, ces gènes s'expriment au niveau de nombreux organes comme le cerveau, le rein, le poumon ou le cœur mettant en jeu des interactions entre le compartiment épithélial et le mésenchyme adjacent. Les trois membres du groupe PEA3 présentent un patron d'expression spécifique associé aux organes se mettant en place par morphogenèse de branchement tels que les poumons, les glandes salivaires ou encore la glande mammaire. La morphogenèse de branchement correspond à un compartiment épithélial progressant dans un compartiment mésenchymateux en formant une arborescence.

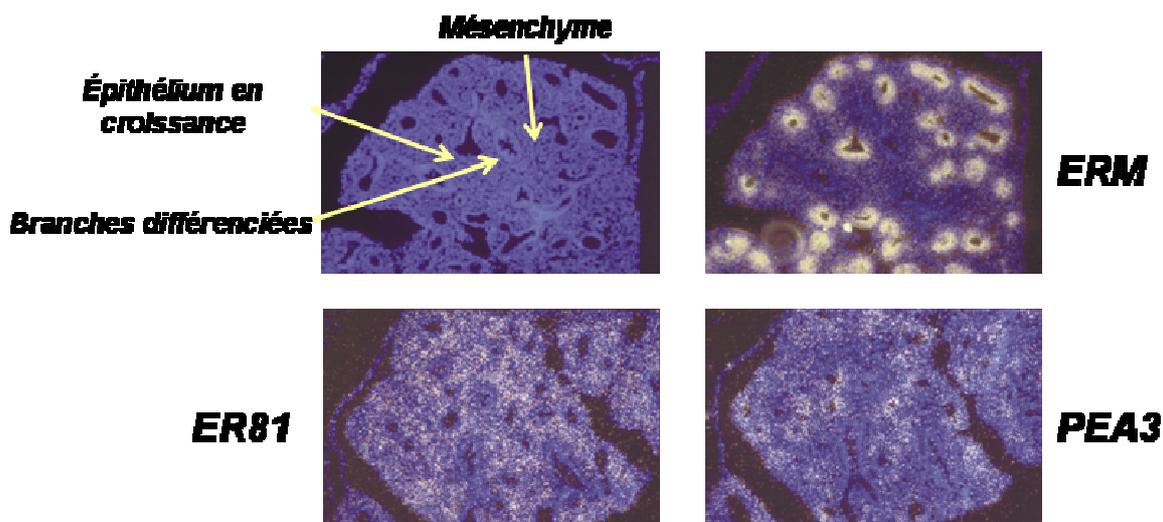


Figure 5 : Expression d'*erm*, *er81* et *pea3* dans des coupes de poumon d'embryon de souris à E15.5.

D'après (Chotteau-Lelievre et al., 2003).

Cellules ou organes	Expression des transcrits	Références
Motoneurones	<i>er81</i> , <i>pea3</i>	(Arber et al., 2000)
Corpuscules de Pacini	<i>er81</i> , <i>pea3</i>	(Sedy et al., 2006)
Zone ventriculaire du néocortex	<i>er81</i> , <i>pea3</i> , <i>erm</i>	(Hasegawa et al., 2004)
Cellules de Schwann	<i>er81</i> , <i>erm</i>	(Parkinson et al., 2002)
Neurones pyramidaux	<i>er81</i>	(Yoneshima et al., 2006)
Cellules pluripotentes de la crête neurale	<i>erm</i>	(Paratore et al., 2002)
Neurones dopaminergiques	<i>er81</i>	(Flames and Hobert, 2009)
Tête de l'épididyme	<i>er81</i> , <i>pea3</i> , <i>erm</i>	(Hsia and Cornwall, 2004) (Yang et al., 2006)
Cellules de Sertoli	<i>erm</i>	(Chen et al., 2005)
Stroma utérin	<i>er81</i> , <i>pea3</i> , <i>erm</i>	(Koo et al., 2005)

Tableau 3 : Profil d'expression des membres du groupe PEA3 au niveau neuronal et génital.

Introduction

Dans ces organes, *erm* est exprimé dans les parties distales des bourgeons épithéliaux, *pea3* dans une région plus restreinte de l'épithélium en croissance, et *er81* dans le mésenchyme adjacent (Chotteau-Lelievre et al., 2003) (Figure 5).

Ce modèle n'est pas limité à la morphogenèse de branchement mais est également retrouvé lors de la conversion du mésenchyme en épithélium (par exemple dans le développement du rein) et pendant le développement du système nerveux. Ceci suggère un rôle de ces facteurs dans le dialogue entre ces deux compartiments, dialogue permettant la migration, la prolifération et la morphogenèse cellulaires (Chotteau-Lelievre et al., 1997; Chotteau-Lelievre et al., 2001; Chotteau-Lelievre et al., 2003).

Lors du développement embryonnaire murin, *erm*, *er81* et *pea3* sont exprimés en de multiples sites du système nerveux central avec, pour certaines régions bien spécifiques telles que le diencephale ou le télencéphale, une coexpression d'*erm* et *pea3* (Chotteau-Lelievre et al., 1997). *Erm* est aussi exprimé dans les cellules pluripotentes de la crête neurale chez la souris, ainsi qu'au niveau des neurones périphériques et des cellules gliales satellites (Paratore et al., 2002).

Chez l'adulte, que ce soit chez l'homme ou chez la souris, les gènes codant les membres du groupe PEA3 sont coexprimés dans de nombreux tissus et organes. L'analyse de leur expression par Northern-blot a révélé que les gènes *erm* et *er81* présentent une expression plutôt ubiquiste. En effet, on retrouve l'expression d'*erm* dans tous les organes testés sauf le foie. Citons parmi les organes exprimant le plus haut niveau d'ARNm d'*erm* le cerveau, le côlon, les testicules ou les poumons (Chotteau-Lelievre et al., 1997; Monte et al., 1994). *er81* est aussi exprimé dans de nombreux organes. Ainsi l'on retrouve des taux élevés d'ARNm de ce facteur de transcription notamment au sein des tissus cérébraux, pulmonaires et cardiaques humains comme murins (Chotteau-Lelievre et al., 1997; Monte et al., 1995).

L'expression de *pea3* est plus restreinte que celle des deux autres membres du groupe chez l'adulte. Les ARNm de *pea3* s'expriment principalement dans l'épididyme, le cerveau et plus faiblement dans le rein ou la glande mammaire (pour revues (Kurpios et al., 2003) (de Launoit et al., 2000)). Concernant la glande mammaire murine, un pic de transcription de *pea3* a été récemment observé lors de la puberté et de la gestation : *pea3* est alors exprimé dans les cellules myoépithéliales des canaux et des alvéoles sécrétrices de lait afin de permettre aux cellules qui prolifèrent de se différencier correctement (Kurpios et al., 2009).

Suite aux phénotypes obtenus par l'inactivation des gènes codant les membres du groupe PEA3, des études d'expression plus fines ont été menées au niveau neuronal et au niveau des organes génitaux. Les différents territoires d'expression sont présentés dans le tableau 3.

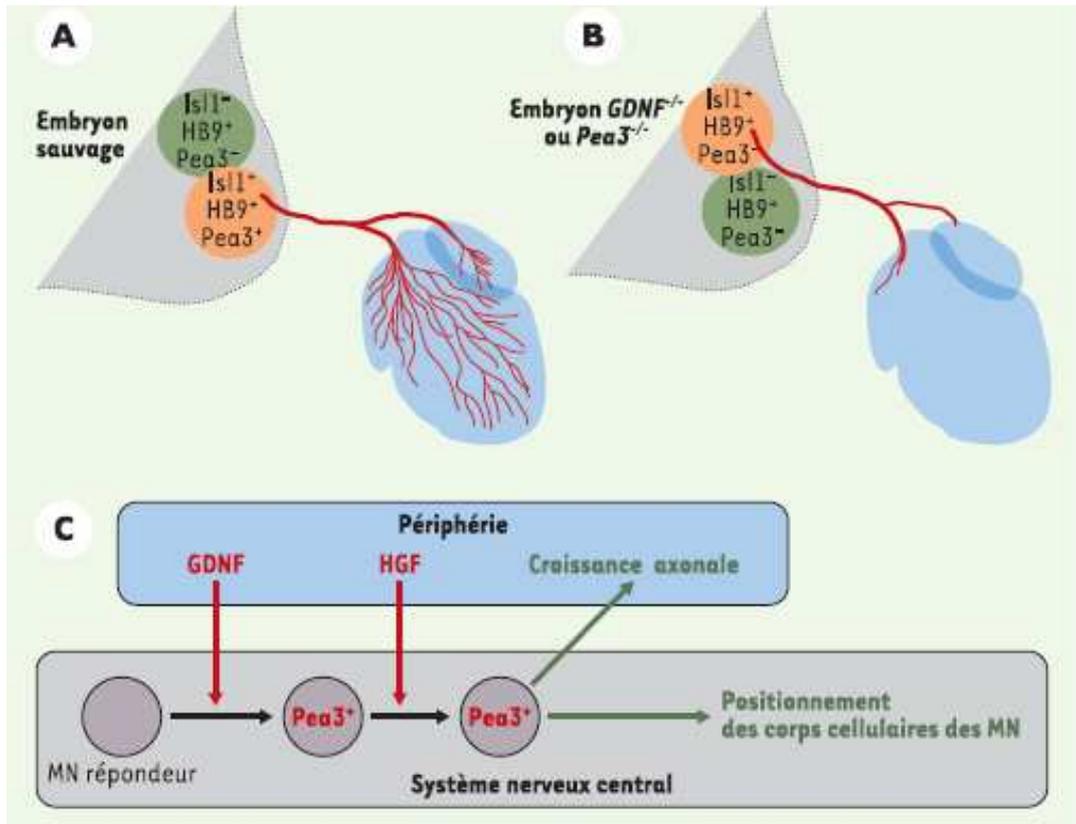


Figure 6. Intervention du GDNF et de l'HGF dans la différenciation des motoneurones (MN).

Le GDNF puis le HGF, synthétisés à la périphérie, contrôlent la différenciation d'une sous population de MN en contrôlant l'expression de Pea3. Schémas montrant le positionnement des corps cellulaires des MN ainsi que leur croissance axonale à 12,5 du développement embryonnaire dans un embryon sauvage (A) et dans un embryon mutant pour GDNF ou Pea3 (B). L'absence du signal GDNF ou Pea3 entraîne le mauvais positionnement des MN qui auraient exprimé PEA3 ainsi qu'une arborisation axonale déficiente. Pour plus de clarté, seuls les MN impliqués ont été schématisés. (C) Schéma résumant le rôle de GDNF et de HGF dans la différenciation des groupes de MN *via* l'expression de PEA3. D'après (Chauvet et al., 2004)

b- Régulation de leur expression

A l'heure actuelle, peu de données sont disponibles en ce qui concerne la régulation transcriptionnelle des facteurs du groupe PEA3. Le promoteur humain du gène *pea3* a été cloné. C'est un promoteur sans TATA box, régulé par le récepteur aux œstrogènes (ER α et ER β) et le facteur Pea3 lui-même (Ishida et al., 2006). En ce qui concerne le gène *erm*, sa transcription est activée par la voie de la PKC dans les cellules Molt-4. La régulation se fait au niveau proximal du promoteur (-420, -115) (T'Sas et al., 2005). Néanmoins, on sait que les membres du groupe PEA3 sont régulés par plusieurs voies de signalisation telles que la voie FGF ou GDNF/HGF.

Voie FGF

Différentes études ont permis d'établir un lien entre les facteurs du groupe PEA3 et la voie de signalisation du FGF (fibroblast growth factor) dans différents types cellulaires.

Ainsi, l'expression des membres du groupe PEA3 est dépendante du FGF chez le xénope, le poisson zèbre ou encore l'embryon de poulet. En effet, dans ces différents organismes, l'inhibition de la voie FGF entraîne une perte de l'expression des gènes du groupe PEA3 (Munchberg and Steinbeisser, 1999) (Raible and Brand, 2001) (Roehl and Nusslein-Volhard, 2001) (Firnberg and Neubuser, 2002).

Ce type de régulation par la voie FGF a également été mise en évidence dans le poumon chez la souris (Liu et al., 2003) et pourrait donc être importante dans la régulation des transitions épithélio-mésenchymateuses dans lesquelles les facteurs de transcription du groupe PEA3 sont impliqués.

Il a également été mis en évidence que le FGF2 induisait l'expression d'*erm* dans les cellules de Sertoli de souris. L'effet du FGF2 est partiellement médié par les voies MAPK et PI3K (Simon et al., 2007) et pourrait jouer un rôle dans le contrôle de la spermatogenèse dépendante d'ERM.

Très récemment, deux équipes ont montré que dans le mésenchyme des membres d'embryons de souris, le FGF stimule l'expression d'*erm* et *pea3*, ces deux facteurs contrôlant la croissance en longueur des membres mais aussi le nombre de doigts (Zhang et al., 2009) (Mao et al., 2009).

Voies GDNF et HGF

Le GDNF (glial derived neurotrophic factor) joue un rôle déterminant pour l'expression de *pea3*. En effet, dans les souris *gdnf* *-/-*, l'expression de *pea3* disparaît dans la plupart des motoneurones (MN) (Haase et al., 2002) (Livet et al., 2002). Une étude a permis de mettre en évidence une organisation séquentielle de l'expression de *pea3* requise pour le

Introduction

positionnement et la migration corrects de ces MN (figure 6) : dans un premier temps, le GDNF induit l'expression de *pea3* dans les MN en position caudale. Ensuite sous l'influence du HGF (Hepatocyte Growth Factor), l'expression de *pea3* est induite dans les MN situés en position rostrale (Helmbacher et al., 2003) (Figure 6). GDNF et HGF sont donc des facteurs sécrétés en périphérie du trajet des axones qui régulent, dans certains MN, l'expression de *pea3* contrôlant ainsi l'expression des gènes responsables de la position des corps cellulaires et du trajet des axones (Figure 6).

Autres voies

Chez la souris, le facteur ERM est exprimé dans les lymphocytes CD4+ T helper de type I (Th1), cette expression est régulée par l'IL-12 *via* STAT4 (Signal transducer and activator of transcription 4) (Ouyang et al., 1999). En revanche, l'expression des autres membres du groupe PEA3 n'est pas affectée par cette cytokine (Ouyang et al., 1999). Chez l'homme, Erm est principalement exprimé au niveau des Th1 et très peu au niveau des lymphocytes naïfs et de type Th2 (Cousins et al., 2002), ce qui fait de ce facteur de transcription un marqueur spécifique des lymphocytes CD4+ de type Th1 (Ouyang et al., 1999) (Cousins et al., 2002).

Les voies de signalisation induites par les cytokines et affectant l'expression d'*erm* ne sont pas totalement connues. L'implication des voies de MAPkinases est cependant probable car une de ces voies a déjà été impliquée dans la régulation de l'expression d'*erm*. Ainsi, dans une lignée cellulaire de myélome dépendant d'IL6 (ANBL-6), la surexpression d'une forme de Ras constitutivement activée conduit à une très forte surexpression d'*erm* (Croonquist et al., 2003). D'autres kinases peuvent aussi moduler l'expression de ce gène. En effet, dans la lignée lymphoblastique Molt4, un traitement au PMA (phorbol myristate acétate) induit une augmentation du taux d'ARNm codant ERM. Cette régulation implique la voie PKC mais les facteurs de transcription cibles impliqués dans la régulation du promoteur du gène *erm* n'ont pas été déterminés (T'Sas et al., 2005). Indépendamment de la translocation *tmprss2-er81*, l'expression du gène *er81* est également induite par les androgènes dans une lignée de cellules prostatiques dépendantes des androgènes (LNCaP) (Cai et al., 2007). De manière intéressante, dans des lignées prostatiques androgéno-indépendantes, l'expression de *er81* est très élevée et non inductible par les androgènes suggérant qu'il existe d'autres mécanismes de régulation transcriptionnelle (Cai et al., 2007).

Ainsi l'expression des membres du groupe PEA3 est régulée spatio-temporellement par les facteurs de croissance ou des cytokines. Toutefois, dans la plupart des cas, les acteurs des voies de signalisation mis en jeu ne sont pas connus et les facteurs de transcription cibles n'ont pas été identifiés. Par ailleurs, les études d'expression ont souvent

été réalisées pour un seul des membres du groupe PEA3 et il est impossible de savoir si les mécanismes de régulation sont spécifiques ou non d'une protéine définie.

4 Les fonctions biologiques normales

Les recombinaisons homologues ont pu mettre en avant le rôle des membres du groupe PEA3 dans les neurones mais aussi dans la fonction reproductrice mâle. En effet, les souris *er81* *-/-* meurent dans un délai maximal de 5 semaines après la naissance suite à de graves dysfonctionnements moteurs (Arber et al., 2000). Les souris *pea3* *-/-* et *erm* *-/-* sont viables mais les mâles présentent un défaut de leur fonction reproductrice (Laing et al., 2000) (Chen et al., 2005).

a- Les membres du groupe PEA3 et les neurones

Nous avons vu précédemment que ces facteurs sont exprimés dans de nombreuses cellules du système nerveux central et périphérique. L'utilisation de la recombinaison homologue a permis de déterminer leur rôle dans la mise en place du système nerveux.

Les souris *er81* *-/-* présentent de graves dysfonctionnements moteurs s'expliquant par un défaut de connexions monosynaptiques entre les neurones afférents et les motoneurons de la moelle épinière ventrale : les axones des neurones sensoriels proprioceptifs sont incapables de créer une arborisation à proximité des dendrites des neurones moteurs, se terminant prématurément au niveau dorsal dans la moelle épinière (Figure 7) (Arber et al., 2000). En parallèle, la perte de fonction d'*er81* conduit à un défaut de développement et de fonctionnement des fibres musculaires. Ces défauts apparaissent dès les premiers jours suivant la naissance et entraînent la mort des animaux homozygotes dans un délai maximal de 5 semaines (Arber et al., 2000).

Par ailleurs, ER81 est essentiel à la formation d'un mécanorécepteur, le corpuscule de Pacini. En effet, les souris *er81* *-/-* n'en possèdent pas (Sedy et al., 2006) et présentent également une déficience des neurones de la racine dorsale de la moelle épinière. D'autres études ont ensuite conforté le rôle essentiel d'ER81 pour la mise en place du système nerveux et notamment une étude récente qui montre l'implication essentielle d'ER81 en tant que régulateur des neurones dopaminergiques (Flames and Hobert, 2009). Compte tenu du fait que *pea3* s'exprime avec *er81* dans certains neurones, il pourrait exister une certaine forme de redondance fonctionnelle entre ces protéines dans ce modèle. Toutefois, la sévérité du phénotype indique que cette compensation, si elle existe, ne pourrait être que très partielle et qu'ER81 doit être un régulateur transcriptionnel spécifique de certains gènes nécessaires à la mise en place de connexions synaptiques.

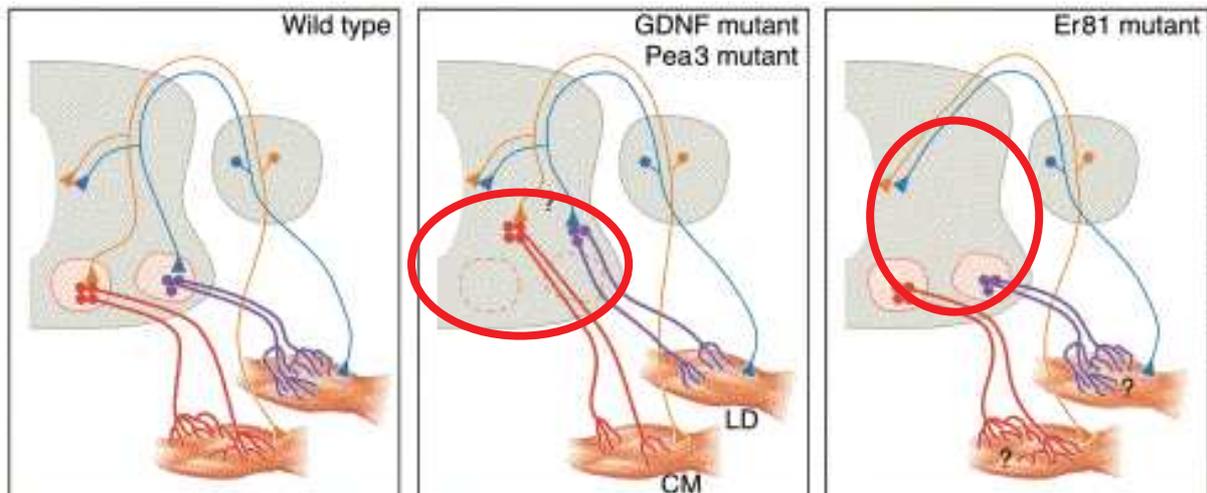


Figure 7 : Phénotype observé pour les souris invalidées par recombinaison homologue pour le *GDNF*, *Pea3* ou *Er81*.

pea3 et *er81* sont exprimés au niveau des neurones sensoriels (en bleu et orange) et des motoneurons (en violet et rouge). Le GDNF est exprimé au niveau des bourgeons des membres. Dans les mutants pour le *GDNF* et *pea3*, l'arborisation au niveau des muscles est anormale et les corps cellulaires des motoneurons sont mal positionnés. Dans les mutants pour *er81* les projections ventrales des neurones sensoriels afférents sont absentes. D'après (Koo and Pfaff, 2002).

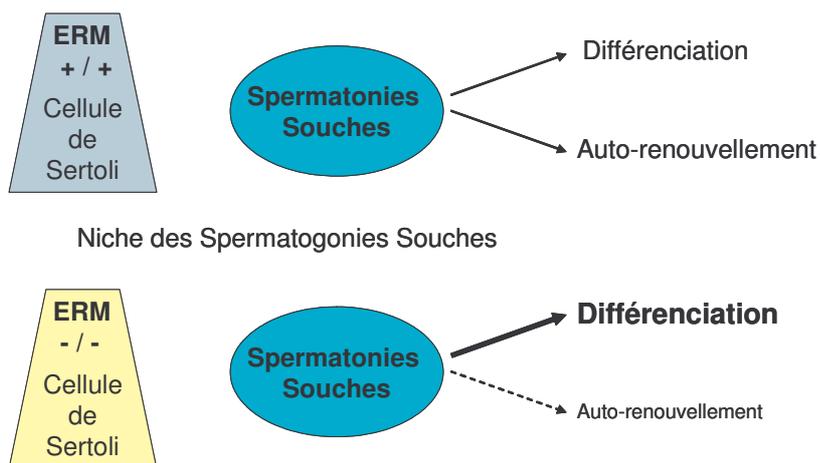


Figure 8. L'expression d'ERM dans les cellules de Sertoli est essentielle au maintien de la niche des spermatogonies souches.

Chez les souris *erm* $-/-$, les cellules de Sertoli ne maintiennent pas le renouvellement des spermatogonies souches mais provoquent leur différenciation continue. Adapté de (Hess et al., 2006)

Introduction

Contrairement aux souris *er81* *-/-*, les souris *pea3* *-/-* n'ont pas de phénotype morbide. Les mâles sont stériles alors que la spermatogenèse et la spermiogenèse des animaux homozygotes apparaissent normales et les spermatozoïdes sont capables de féconder des ovules *in vitro*. Le phénotype est lié à un probable dysfonctionnement éjaculatoire dont l'origine pourrait être nerveuse (Laing et al., 2000). En outre, les souris *pea3* *-/-* présentent une réduction du nombre de motoneurones dans la région ventrale de la moelle épinière (Ladle and Frank, 2002). Il est donc possible que le phénotype de stérilité mâle observé chez ces souris soit lié à une défaillance des connexions synaptiques entre les motoneurones et les muscles responsables de l'éjaculation. Le facteur Pea3, stimulé par le GDNF et l'HGF, contrôle en effet l'arborisation terminale et le positionnement final des corps cellulaires des motoneurones (Figures 6 (voir page 34) et 7) (Helmbacher et al., 2003). En revanche, l'absence du facteur PEA3 n'a pas d'influence sur les neurones sensoriels ou sur les connexions interneuronales (Figure 7) (Ladle and Frank, 2002).

En ce qui concerne ERM, sa recombinaison homologue n'a pas permis de démontrer un rôle dans la mise en place du système nerveux. Toutefois, ERM semble jouer un rôle dans la mise en place des crêtes neurales. En effet, *erm* est exprimé dans les cellules neurales des racines ganglionnaires dorsales, du ganglion sensoriel crânien et du ganglion sympathique (Chotteau-Lelievre et al., 1997; Hagedorn et al., 2000). L'utilisation d'un dominant négatif de ce facteur dans les cellules de la crête neurale réduit leur différenciation en neurones et stimule leur différenciation en cellules de la glie. Néanmoins, le facteur ERM est requis pour la prolifération des cellules de la glie sans que cela n'affecte leur destinée (Paratore et al., 2002).

b- Les membres du groupe PEA3 dans la fonction reproductrice mâle

Contrairement aux souris *pea3* *-/-* présentant une stérilité mâle due à une origine nerveuse, l'inactivation d'*erm* provoque des défauts de la fonction reproductrice dont l'origine n'est pas nerveuse. En effet, les souris *erm* *-/-* mâles deviennent stériles par un blocage de la spermatogenèse (Chen et al., 2005). Cette stérilité est due à une déficience des cellules de Sertoli qui sont les seules cellules du testicule à exprimer *erm* en réponse au FGF2 (Simon et al., 2007). Dans les souris *erm* *-/-*, ces cellules présentent des défauts de sécrétion à l'origine du non-renouvellement des spermatogonies souches (Figure 8). Ce défaut de renouvellement provoque une disparition progressive des spermatogonies et aboutit à l'absence de spermatogenèse (Chen et al., 2005). Les défauts de sécrétion des cellules de Sertoli seraient dus selon une hypothèse à des défauts de la barrière testicule/sang formée par les jonctions serrées présentes entre les cellules de Sertoli chez les souris *erm* *-/-* mâles. Très récemment, il a en effet été montré que ces souris présentent

une diminution de la présence de la protéine Claudine 5 qui est impliquée dans ces jonctions (Morrow et al., 2009). Néanmoins, les souris *erm*^{-/-} mâles sont infertiles même avant la disparition totale des spermatozoïdes, indiquant que la perte d'*erm* a d'autres effets en plus du non-renouvellement des spermatogonies souches (Schlesser et al., 2008). En outre, le poids des souris *erm*^{-/-} mâles est légèrement inférieur à celui des souris sauvages et la taille des testicules de ces animaux est très réduite (Schlesser et al., 2008).

Il a été démontré que le FGF2 était nécessaire pour le renouvellement des spermatogonies souches et pour la survie des cellules de Sertoli (Kubota et al., 2004; Van Dissel-Emiliani et al., 1996). Récemment, il a été mis en évidence que l'expression d'*erm* stimulée par le FGF2 induit l'expression de *sdf-1*, un gène codant une protéine impliquée dans la différenciation et l'auto-renouvellement de cellules souches (Yoon et al., 2009).

c- les membres du groupe PEA3 dans la morphogenèse

Nous avons décrit précédemment qu'au cours de l'organogenèse, les trois membres du groupe PEA3 présentaient un patron d'expression spécifique associé aux organes se mettant en place par morphogenèse de branchement tels que les poumons, les glandes salivaires ou encore la glande mammaire (figure 5, page 32) (Chotteau-Lelievre et al., 2003). Ceci suggère un rôle de ces facteurs dans le dialogue entre ces deux compartiments, dialogue permettant la migration, la prolifération et la morphogenèse cellulaires (Chotteau-Lelievre et al., 1997; Chotteau-Lelievre et al., 2001; Chotteau-Lelievre et al., 2003). Le rôle des membres du groupe PEA3 a plus particulièrement été étudié dans la glande mammaire et le poumon.

Dans le modèle mammaire, l'utilisation des souris *pea3*^{-/-} (Livet et al., 2002) montre que la perte d'expression de *pea3* résulte en une diminution du nombre d'alvéoles sécrétrices de lait et une augmentation du nombre de cellules en prolifération. *pea3* permet donc aux cellules qui prolifèrent de se différencier correctement (Kurpios et al., 2009).

Au niveau du poumon, l'expression d'un transgène dominant négatif, EngR-*erm* (dans cette construction, le domaine répresseur Engrailed est fusionné juste après le domaine ETS d'ERM) entraîne un blocage du développement du poumon, aussi bien dans la morphogenèse de branchement que dans la différenciation des cellules précurseurs : la différenciation des cellules distales en alvéoles matures de type I ou II n'ayant pas lieu (Mitchell et al., 2006). Néanmoins, ces effets pourraient ne pas être attribués uniquement à ERM car cette construction ne cible pas uniquement ERM mais aussi les deux autres membres du groupe PEA3 d'après des études *in vitro* (Shepherd et al., 2001) voire d'autres membres de la famille ETS. Une construction de ce type a d'ailleurs été utilisée très récemment pour montrer que l'expression d'*erm* et *pea3* dans le mésenchyme des membres

embryonnaires de souris permet de contrôler le développement des membres (Zhang et al., 2009) (Mao et al., 2009).

5 Implication dans les cancers

Très tôt, de nombreuses observations ont conduit à l'émergence d'un rôle des protéines du groupe PEA3 dans le cancer mammaire et principalement dans le processus invasif. Par la suite, de nombreuses études ont montré que ces facteurs de transcription sont impliqués dans d'autres cancers.

a- Surexpression des membres du groupe PEA3 et cancers

Données de surexpression

Divers travaux ont montré une corrélation entre la surexpression des facteurs ETS dont les membres du groupe PEA3 et le caractère cancéreux de cellules de différentes origines (essentiellement intestin, poumon, ovaire, prostate et sein) (pour revues (Oikawa, 2004; Oikawa and Yamada, 2003)).

Dès 1993, il a été montré que PEA3 est surexprimée dans les tumeurs mammaires murines induites par les oncogènes neu ou ras (Trimble et al., 1993). En fait, les tumeurs épithéliales mammaires induites par l'oncogène neu surexpriment les trois protéines du groupe PEA3. Chez des souris surexprimant Neu, l'expression d'un dominant négatif de ces facteurs de transcription ralentit significativement l'apparition des tumeurs qui sont également plus petites et moins nombreuses (Shepherd et al., 2001). Cependant, la proportion de souris présentant des métastases pulmonaires n'est pas affectée par l'expression de ce dominant négatif (Shepherd et al., 2001). Cette étude suggère que les membres du groupe PEA3 sont requis pour la tumorigenèse mammaire induite par Neu mais ne seraient peut-être pas suffisants pour induire un phénotype invasif. De même, en comparant différentes lignées cellulaires normales et des tumeurs mammaires induites chez la souris, on peut remarquer une forte augmentation de l'expression des facteurs du groupe PEA3 dans les tumeurs (Galang et al., 2004).

Chez l'Homme, de nombreuses études ont démontré la corrélation d'expression entre les gènes *her2/Neu* et *pea3*. Ainsi une augmentation du taux d'ARNm de *pea3* est retrouvée dans 93% des tumeurs mammaires surexprimant HER2/Neu (Benz et al., 1997) et PEA3 est un régulateur transcriptionnel de ce gène (Matsui et al., 2006). Cependant certaines études ont donné des résultats contradictoires. En effet, diverses expériences ont mis en évidence que le facteur Pea3 inhibe *in vitro* comme *in vivo* la croissance des cellules cancéreuses

Introduction

Cancer	Facteur	Observations	Références
Sein	Surexpression PEA3	Induction du phénotype invasif	(Kaya et al., 1996)
	Sous-expression	Diminution du caractère invasif des cellules	(Firlej et al., 2008)
	Surexpression PEA3	Marqueur de l'agressivité tumorale Surexpression de <i>mmp1</i> et <i>mmp2</i>	(Bieche et al., 2004)
	Surexpression ERM	Facteur de mauvais pronostic	(Chotteau-Lelievre et al., 2004)
Squameux du tractus oral	Surexpression PEA3	Surexpression de <i>mmp1</i> et <i>9</i>	(Hida et al., 1997)
	Sous-expression PEA3	Diminution du potentiel invasif	(Nishida et al., 2007)
Fibrosarcome	Surexpression PEA3	Induction de <i>mt1-mmp</i> Augmentation du pouvoir invasif	(Habelhah et al., 1999)
Tumeur lymphoproliférative	Surexpression ERM	ND	(Korz et al., 2002)
Colorectal	Surexpression PEA3	Surexpression <i>cox2</i> et <i>mmp7</i>	(Boedefeld et al., 2005)
	Surexpression PEA3	Surexpression de <i>mmp1</i> , <i>7</i> , <i>9</i> , <i>cox</i> et <i>inos</i>	(Nosho et al., 2005)
	Sous-expression PEA3	Diminution du potentiel invasif	(Moss et al., 2006)
Poumon	Surexpression PEA3	Induction de <i>galT1</i> Augmentation du pouvoir invasif	(Zhu et al., 2005)
Prostate	Sous-expression ER81	Diminution du pouvoir invasif	(Cai et al., 2007)
	Surexpression d'ERM	Augmentation du pouvoir invasif	(Helgeson et al., 2008)
Endomètre	Surexpression ERM	Activation de <i>mmp2</i> Augmentation du pouvoir invasif	(Monge et al., 2007)
	Surexpression ERM	Facteur de mauvais pronostic et d'invasion	(Planaguma et al., 2005)
Ovaire	Surexpression PEA3	Activation des <i>mmp9</i> et <i>14</i>	(Cowden Dahl et al., 2007)
Foie	Surexpression PEA3	Surexpression d'IL8	(Iguchi et al., 2000)

Tableau 4 : Corrélations et données fonctionnelles impliquant les facteurs du groupe PEA3 dans les cancers.

Les corrélations sont surlignées en gris. Les expériences menées dans des lignées cancéreuses sont en blanc. ND : non déterminé.

exprimant le gène HER2/Neu, et qu'il réprime l'activité du promoteur du gène HER2/Neu (Xing et al., 2000).

Les facteurs de transcription du groupe PEA3 sont également surexprimés dans des cancers autres que mammaires. Ceux-ci sont présentés dans le tableau 4.

Surexpression des membres du groupe PEA3 et métastase

Les facteurs de transcription du groupe PEA3 sont donc surexprimés dans différentes tumeurs et de nombreuses études ont mis en avant leur relation avec le processus invasif. Ainsi, les tumeurs mammaires invasives induites par *neu* ou *ras* engendrent des métastases pulmonaires caractérisées par une surexpression des membres du groupe PEA3 (Trimble et al., 1993). De plus, il existe une forte expression de ces trois gènes dans les lignées cancéreuses mammaires humaines hautement métastatiques comme les cellules MDA-MB-231. En revanche cette expression est très faible dans des lignées de cellules peu métastatiques telles que les cellules MCF-7 (Baert et al., 1997) (Bieche et al., 2004). Il a aussi été démontré que la surexpression de PEA3 par transfection, dans cette lignée cancéreuse peu métastatique suffit à induire un phénotype invasif (Kaya et al., 1996). De même, l'utilisation d'un ARN antisens de PEA3 réduit la capacité d'invasion des cellules surexprimant cette protéine (Hida et al., 1997).

L'invasion et la métastase nécessitent que les cellules perdent le contact avec leurs voisines, deviennent motiles et envahissent les surfaces environnantes où elles prolifèrent et acquièrent un comportement agressif. Le processus invasif induit par les membres du groupe PEA3 est une conséquence de l'activation de la transcription de certains gènes impliqués dans ces modifications (Figure 9).

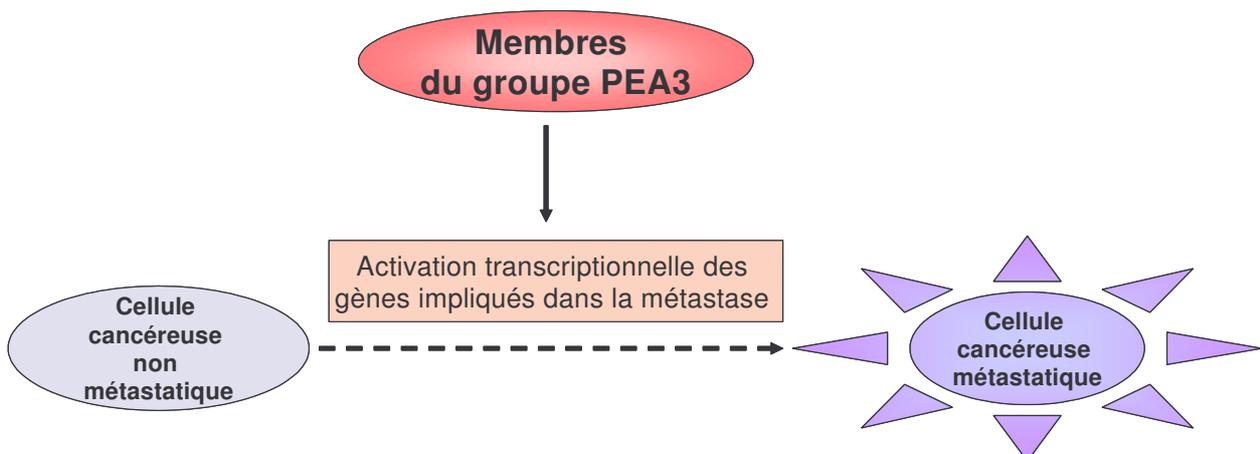


Figure 9 : Modèle du rôle des membres du groupe PEA3 dans l'apparition du phénotype métastatique dans les cellules épithéliales cancéreuses

Les membres du groupe PEA3 activent le phénotype métastatique des cellules épithéliales cancéreuses en régulant certains gènes cibles impliqués dans la métastase tels que les *mmp*. D'après (de Launoit et al., 2006)

Introduction

En effet, les molécules impliquées dans ce processus sont des molécules d'adhérence qui interviennent dans l'architecture de la matrice extracellulaire et facilitent la croissance tumorale, l'invasion et la métastase (comme la molécule d'adhérence Icam1, le complexe Muc4/sialomucine, l'ostéopontine, la vimentine ou la cavéoline) et les protéases extracellulaires dites MMP (métalloprotéases de la matrice extracellulaire) qui sont impliquées dans la dégradation protéolytique de nombreuses protéines de la matrice extracellulaire, mais aussi de protéines non matricielles.

De nombreuses corrélations d'expression entre les protéines du groupe PEA3 et ces gènes cibles impliqués dans le processus métastatique ont en effet été établies et sont présentées dans le tableau 4. L'expression des membres du groupe PEA3 est également corrélée à celle de facteurs angiogéniques tels que la cyclooxygénase2, iNos, l'IL8 et certaines intégrines (Iguchi et al., 2000) (Nosho et al., 2005) (Boedefeld et al., 2005). De plus, l'activation dépendante d'HER2/neu cible également ER81 par la voie Ras-RAF-MAPK, en augmentant l'activité transcriptionnelle de ce facteur sur différents gènes cibles, tels que la *MMP1* (Bosc et al., 2001; Goel and Janknecht, 2004), le gène *Smad7* codant l'inhibiteur du TGFb (Dowdy et al., 2003) et le gène *hTERT* codant la transcriptase inverse de la télomérase (Goueli and Janknecht, 2004).

Ces données montrent une relation nette entre l'expression des protéines du groupe PEA3 et la métastase. Récemment, l'utilisation de shRNA dirigés contre *pea3* ou *erm* dans des cellules agressives de tumeurs mammaires murines (MMT) a permis de diminuer leur prolifération, leur migration ainsi que leur capacité à s'organiser en 3D et à faire des clones en agar. De plus, lorsque ces cellules sont injectées à des souris immunodéficientes, on observe une diminution de la taille des tumeurs par rapport à celles obtenues avec les cellules non modifiées (Firlej et al., 2008). Cette étude confirme que les membres du groupe PEA3 sont des acteurs de la mise en place du processus tumoral dans le modèle mammaire et sont des cibles de choix pour une thérapie anti-métastatique.

Valeur pronostique

En liaison probable avec le rôle des facteurs de transcription du groupe PEA3 dans les processus métastatiques, la surexpression de ceux-ci est associée à une mauvaise valeur pronostique dans certains cancers. Ainsi, une étude menée sur 364 patientes atteintes d'un cancer du sein a révélé que plus l'expression d'*erm* est importante, plus les chances de survie diminuent (Chotteau-Lelievre et al., 2004) , figure 10).

Introduction

En revanche, dans une autre étude sur le cancer du sein, la comparaison de l'expression de *pea3* entre tissus normaux et cancéreux indique que cette protéine est un facteur d'agressivité mais aucune corrélation entre l'expression de *pea3* et les chances de survie et de récurrence du cancer n'a été retrouvée (Benz et al., 1997). Néanmoins, la coexpression de *pea3* et de *her2/neu* est associée à une augmentation significative du taux de récurrence du cancer du sein comparée à la seule expression de *her2/neu* (Myers et al., 2006). Cependant, des données contradictoires au sujet de l'expression de *pea3* dans des cancers du sein montrent une survie plus favorable quand ce facteur est présent (Kinoshita et al., 2002). Cela pourrait être dû, en partie, à l'origine ethnique des patientes. En effet, cette étude a été réalisée dans une population de patientes japonaises.

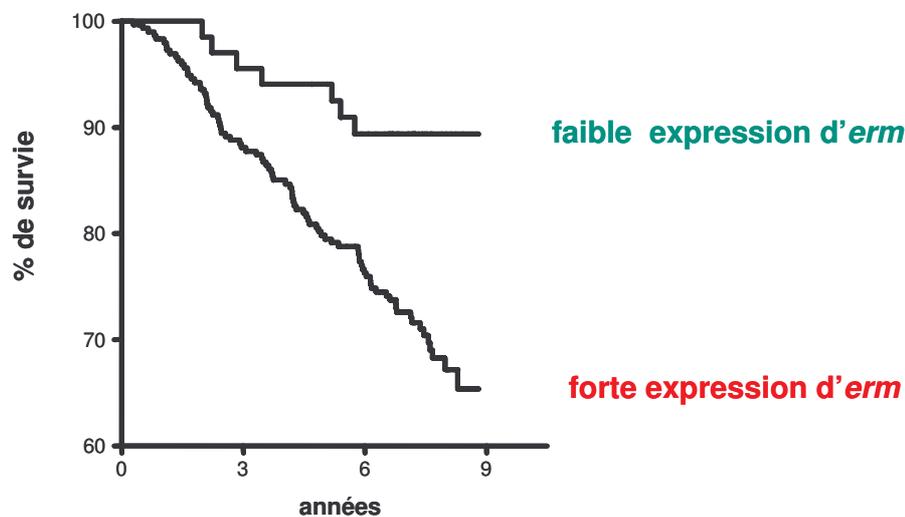


Figure 10 : Taux de survie de patientes atteintes d'un cancer du sein en fonction du niveau d'expression d'ERM.

D'après (Chotteau-Lelievre et al., 2004)

L'expression d'ERM est également corrélée à l'invasion et au mauvais pronostic dans le cancer endométrial (Planaguma et al., 2005). Enfin, dans les cancers ovariens, l'expression de PEA3 a été décrite comme un marqueur de mauvais pronostic (Davidson et al., 2003).

Les membres du groupe PEA3 ne sont probablement pas des oncogènes

Les membres du groupe PEA3 étant souvent surexprimés dans les cancers, des travaux ont été réalisés afin de déterminer s'ils pouvaient induire le processus de cancérisation. Au niveau cellulaire, ces facteurs de transcription ont été surexprimés de façon ectopique dans des cellules mammaires murines normales. Suite à la surexpression

de membres du groupe PEA3, ces cellules présentent non seulement la capacité de faire de la morphogénèse de branchement spontanée mais aussi une capacité accrue d'invasion *in vitro* (Chotteau-Lelievre et al., 2001; Chotteau-Lelievre et al., 2003). Toutefois, aucune donnée n'est disponible quant à leur phénotype dans un modèle animal.

Cependant, il est peut probable que ces gènes puissent être considérés comme des oncogènes. En effet, la surexpression de ER81 dans la glande mammaire normale n'entraîne pas chez les souris transgéniques un phénotype cancéreux, malgré l'induction de certains gènes cibles comme *uPA* ou *stromélysine* (Netzer et al., 2002). Les membres du groupe PEA3, s'ils ne sont pas des oncogènes, peuvent toutefois être considérés comme des relais d'autres oncogènes pour favoriser l'invasion.

b- Translocations chromosomiques

En marge des phénomènes de surexpression, certains membres du groupe PEA3 sont aussi impliqués dans différents cancers suite à des translocations chromosomiques. Ainsi, dans les tumeurs d'Ewing, PEA3 (Kaneko et al., 1996) et ER81 (Jeon et al., 1995) ont été identifiées à raison d'une prévalence de 1% chacun dans les réarrangements chromosomiques à l'origine de ces tumeurs (pour revue (Janknecht, 2005)). La protéine de fusion induit une forte activation des gènes cibles des protéines du groupe PEA3 tels que *htert* qui est plus transactivé par EWS/PEA3 que par le facteur PEA3 seul (Takahashi et al., 2003). En revanche, EWS/ER81 semble jouer le rôle d'un dominant négatif sur la transcription du récepteur du TGF β et réprime la transcription de ce récepteur (Im et al., 2000).

Environ 10% des cancers de la prostate présentent un réarrangement chromosomique de la région non codante du gène *tmprss2* (androgen-regulated transmembrane protease 2) avec un membre du groupe PEA3 (Helgeson et al., 2008; Tomlins et al., 2006; Tomlins et al., 2005). TMPRSS2 est une sérine protéase de la surface cellulaire spécifique de la prostate dont l'expression est stimulée par les androgènes. Suite à ce réarrangement, l'expression des membres du groupe PEA3 passe sous le contrôle d'un promoteur répondant aux androgènes entraînant ainsi leur surexpression. Cette surexpression pourrait être un élément initiateur de la tumorigénèse de la prostate ou tout au moins en permettre la progression (Carver et al., 2009; Tomlins et al., 2007). D'autres réarrangements moins fréquents entre d'autres gènes et les membres du groupe PEA3 ont également été retrouvés dans des cancers de la prostate. La plupart de ces réarrangements aboutit à une surexpression de ces protéines en réponse aux androgènes (pour revues (Narod et al., 2008) (Kumar-Sinha et al., 2008)).

6 Les gènes cibles connus

Une liste des gènes cibles des membres du groupe PEA3 est reprise dans le tableau 5. Dans tous les cas, l'identification de ces gènes cibles est liée à la surexpression d'une ou plusieurs protéines du groupe PEA3. Les transactivations observées sont généralement relativement modestes.

Catégorie	Gène cible	Activé par	Références
Enzymes de remodelage de la matrice extracellulaire	<i>*collagénase de type I (mmp1)</i>	PEA3	(Bosc et al., 2001; Higashino et al., 1995)
	<i>*mmp2</i>	PEA3	(Monge et al., 2007) (Qin et al., 2009)
	<i>*stromélysine (mmp3)</i>	PEA3, ER81	(Higashino et al., 1995; Netzer et al., 2002)
	<i>*matrilysine (mmp7)</i>	PEA3, ERM, ER81	(Crawford et al., 2001)
	<i>*collagénase de type IV (mmp9)</i>	PEA3	(Cowden Dahl et al., 2007; Higashino et al., 1995)
	<i>*mmp14</i>	PEA3	(Habelhah et al., 1999; Izumiyama et al., 2005) (Cowden Dahl et al., 2007)
	<i>*uPA</i>	ER81	(Netzer et al., 2002)
	<i>*Héparanase</i>	PEA3, ER81	(Galang et al., 2004)
Molécules d'adhérence et cytosquelette	<i>*Icam1</i>	PEA3, ERM, ER81	(de Launoit et al., 1998)
	<i>*ostéopontine</i>	PEA3, ERM	(El-Tanani et al., 2006)
	<i>vimentine</i>	PEA3	(Stevens et al., 2002)
	<i>*muc4</i>	PEA3 mais pas ERM et ER81	(Fauquette et al., 2005; Perez et al., 2003)
	<i>*cavéoline1</i>	PEA3, ERM	(Kathuria et al., 2007)
Prolifération cellulaire	<i>*hTERT</i>	PEA3, ERM, ER81	(Goueli and Janknecht, 2004)
	<i>*p21waf1</i>	PEA3	(Funaoka et al., 1997)
	<i>cycline D3</i>	PEA3, ERM, ER81	(Jiang et al., 2007)
	<i>*her2/neu</i>	PEA3, ER81	(Bosc et al., 2001; Fauquette et al., 2005; Matsui et al., 2006; Xing et al., 2000)
Apoptose	<i>*bax</i>	PEA3, ERM, ER81	(Firlej et al., 2005)
Angiogenèse	<i>*cyclooxygénase 2</i>	PEA3, ERM, ER81	(Howe et al., 2001; Mitchell et al., 2006)
	<i>*IL8</i>	PEA3	(Iguchi et al., 2000)
	<i>vegf</i>	PEA3	(Wang et al., 2009)

Introduction

Facteurs de transcription	<i>*Ets1</i>	PEA3	(Chen and Wright, 1993)
	<i>*pea3</i>	PEA3	(Ishida et al., 2006)
	<i>*Twist</i>	PEA3, ERM, ER81	(Howe et al., 2003; Qin et al., 2009)
	<i>*Wt1</i>	PEA3	(Discenza et al., 2004)
	<i>Zhx1</i>	PEA3	(Shou et al., 2003)
Sécrétoglobine	<i>*mammaglobine</i>	PEA3	(Hesselbrock et al., 2005)
Cytokine	<i>Sdf-1</i>	ERM	(Yoon et al., 2009)
Enzyme du métabolisme nucléotidique	<i>*Rcl</i>	ER81	(Shin et al., 2008)
Enzyme du stress oxydatif	<i>*Hep27</i>	ERM	(Monge et al., 2009)
Glycoprotéine membranaire	<i>*b1,4-galactosyltransférase I</i>	PEA3, ERM, ER81	(Zhu et al., 2005)
Protéine membranaire à activité enzymatique	<i>Presenilin1</i>	ERM, ER81	(Pastorcic and Das, 2003) (Pastorcic and Das, 2004)
Récepteur à activité tyrosine kinase	<i>*Récepteur TGF-β type II</i>	PEA3	(Kopp et al., 2004)
Antagoniste d'un récepteur	<i>*smad7</i>	PEA3, ERM mais pas ER81	(Dowdy et al., 2003)

Tableau 5 : Gènes cibles connus des membres du groupe PEA3.

*= Rôle connu dans la tumorigenèse ou le processus métastatique

Seuls les membres du groupe PEA3 testés sont indiqués

Les facteurs de transcription du groupe PEA3 sont notamment impliqués lors des processus biologiques nécessitant un remodelage tissulaire dans l'organogenèse, mais aussi dans le cas des cellules tumorales envahissant le tissu environnant. Il apparaît donc normal qu'ils régulent la transcription de gènes impliqués dans ces processus (métalloprotéases de la matrice extracellulaire et molécules d'adhérence).

Les protéines du groupe PEA3 régulent de nombreux gènes impliqués également dans des fonctions cellulaires telles que l'apoptose ou l'angiogenèse.

Introduction

L'efficacité de transactivation des trois facteurs de transcription a rarement été comparée sur un même gène cible. A ce jour, seules quelques études ont montré une différence sensible entre ces trois membres. Ainsi, par exemple, le gène *muc4* est activé par PEA3 et non par les deux autres membres du groupe PEA3 dans la lignée épithéliale mammaire murine HC11 (Perez et al., 2003) ou dans des lignées cancéreuses pancréatiques CAPAN (Fauquette et al., 2005). Cet exemple montre qu'un facteur de transcription du groupe PEA3 peut avoir des gènes cibles spécifiques. Il faut toutefois relativiser la notion de « gène cible » d'un facteur de transcription de la famille ETS car il a été démontré par « ChIP on chip » que plusieurs membres de la famille ETS pouvaient se fixer sur un même site EBS, indiquant que la spécificité de fixation sur les sites EBS est relativement faible (Hollenhorst et al., 2007). De plus, dans la plupart des cas, les gènes cibles identifiés le sont par des approches de surexpression du facteur de transcription d'intérêt. Dans ces conditions, compte tenu de la grande conservation de séquence du domaine ETS au sein de la famille ETS, on ne peut exclure qu'un gène cible ainsi identifié soit un gène régulé par un autre membre de la famille ETS, la relevance physiologique de ces régulations restant donc à certifier.

Néanmoins, une récente étude transcriptomique utilisant des siRNA dirigés contre ERM et PEA3 a permis de confirmer la régulation d'un certain nombre des gènes cités dans le tableau 5 (Firlej et al., 2008). Cette étude a également permis de mettre en évidence d'autres gènes cibles potentiels tels que des gènes impliqués dans la prolifération ou la régulation du cycle cellulaire comme *Fgfr1* (Fibroblast growth factor receptor 1), *Ccnd1* (cyclin D1), *Ccnd2* (cyclin D2), *Sesn2* (Sestrin2, protéine induite par p53) et *Igfbp7* (insulin like growth factor binding protein 7) ou des gènes connus pour être impliqués dans la migration ou l'invasion comme *Fst* (follistatin), *Has2* (Hyaluronane synthetase 2) et *Maged2* (melanoma antigen family D 2) (Firlej et al., 2008). Des études des promoteurs de ces gènes, en particulier par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) sont néanmoins nécessaires pour confirmer leur régulation directe par les membres du groupe PEA3.

Introduction

Catégorie	Partenaire protéique	Interacteur			Effet	Références
		PEA3	ERM	ER81		
Facteurs de transcription généraux	TBP		oui			(Defossez et al., 1997)
	TAFII40		oui			(Defossez et al., 1997)
	TAFII60		oui			(Defossez et al., 1997)
Facteurs de transcription	Jun	oui	oui	Oui	A	(Crawford et al., 2001; El-Tanani et al., 2004; Higashino et al., 1995; Matsui et al., 2006; Nakae et al., 1995; Nerlov et al., 1992)
	β-caténine /Lef-1	oui	oui	Oui	A	(Crawford et al., 2001; El-Tanani et al., 2004)
	USF1	oui	oui	Oui	A	(Firlej et al., 2005; Greenall et al., 2001)
	Protéines Id	oui			R	(Greenall et al., 2001)
	TTF1		oui		A	(Lin et al., 2006)
	MEF2	oui			A	(Taylor et al., 1997)
	AR	oui	oui		R	(Schneikert et al., 1996)
Corégulateurs	LPP	oui	non	Oui	A	(Guo et al., 2006)
	CHD3		oui		R	(Pastorcic and Das, 2007)
	ZNF237		oui		R	(Pastorcic and Das, 2006)
	CBP/p300	oui	oui	Oui	A	(Goel and Janknecht, 2003; Goel and Janknecht, 2004) (Papoutsopoulou and Janknecht, 2000) Baert, données non publiées
	ACTR	oui	oui	Oui	A	(Goel and Janknecht, 2004) (Qin et al., 2008) (Qin et al., 2009; Yang et al., 2008)
	P/CAF			Oui	A	(Goel and Janknecht, 2003)

Tableau 6 : Les facteurs de transcription et corégulateurs interagissant avec les membres du groupe PEA3

Effet : Effet observé sur l'activité transcriptionnelle des membres du groupe PEA3 : A=Activateur
R=Répresseur

II Modulation de l'activité transcriptionnelle des membres du groupe PEA3

Les facteurs de transcription du groupe PEA3 sont des activateurs transcriptionnels exprimés dans de nombreux tissus et régulant des gènes impliqués dans de multiples fonctions cellulaires. Aussi, leur activité transcriptionnelle doit être finement régulée, soit par contrôle de leur niveau d'expression, soit directement au niveau de leur activité transcriptionnelle. Cette régulation de leur activité est principalement liée à leur capacité d'interaction avec des partenaires protéiques et à l'existence de modifications post-traductionnelles.

A Modulation de l'activité par des interacteurs protéiques

De façon générale, les interactions entre protéines nucléaires jouent un rôle crucial dans la régulation de la transcription. En ce qui concerne les facteurs de transcription, les interactions protéines-protéines interviennent à plusieurs niveaux : régulation de la localisation cellulaire, de la fixation à l'ADN et sélection des gènes cibles, de l'activité transcriptionnelle ou encore du turn-over des facteurs de transcription. Pour les membres du groupe PEA3, ces interactions mettent en jeu différents types de partenaires (récapitulés dans le tableau 6) en l'occurrence des facteurs de transcription généraux, d'autres facteurs de transcription ou des corégulateurs.

1 Facteurs de transcription généraux

Les membres du groupe PEA3, en tant que facteurs de transcription, doivent en théorie permettre le recrutement de la machinerie de transcription au niveau du promoteur de leurs gènes cibles. Ainsi, il a été décrit qu'ERM est capable d'interagir directement avec des éléments de la machinerie basale de transcription tels que la TATA binding Protein (TBP) et deux TBP associated factors (TAF) TAFII60 et TAFII40, tous trois dans le complexe TFIID (Transcription Factor for RNAPolymerase II D) (Defossez et al., 1997). Il a été défini que TAFII60 interagit grâce au domaine activateur N-terminal d'ERM (Defossez et al., 1997).

2 Facteurs de transcription

Les protéines de la famille ETS présentent une faible sélectivité en ce qui concerne la fixation à l'ADN au niveau des sites EBS, comme c'est le cas de nombreuses autres familles de facteurs de transcription (Sharrocks et al., 1997). Ceci suggère qu'en plus de l'interaction ADN-protéine, la spécificité de fixation des facteurs de la famille ETS sur un promoteur donné va dépendre de leur coopération avec d'autres protéines telles que d'autres facteurs de transcription. Ces contacts avec d'autres facteurs de transcription permettent d'exercer un contrôle combinatoire sur l'expression de gènes de façon cellule-spécifique (Lin et al., 2006). En fonction du type cellulaire et du tissu étudié, les membres de la famille ETS exprimeront des gènes cibles différents car ils interagiront avec différents facteurs de transcription.

Plusieurs types d'interactions entre les membres du groupe PEA3 et des facteurs de transcription ont été décrits :

- l'interaction de deux facteurs de transcription fixés tous les deux sur leurs éléments de réponse.

- le recrutement par les membres du groupe PEA3 d'un autre facteur de transcription indépendamment de sa fixation à l'ADN

- et inversement, le recrutement des membres du groupe PEA3 sur un promoteur indépendamment de leur fixation à l'ADN

- l'interaction avec un facteur de transcription qui inhibe la fixation à l'ADN des membres du groupe PEA3

a- Interaction entre deux facteurs de transcription fixés sur leurs éléments de réponse

Différentes études ont montré qu'une coopération entre les membres du groupe PEA3 et d'autres facteurs de transcription pouvait s'établir lorsqu'un site EBS se trouve à proximité d'un site de fixation pour d'autres facteurs. Cette interaction se traduit par une augmentation de l'activité transcriptionnelle du complexe. Cet exemple d'interaction a été décrit pour les facteurs de transcription c-Jun, TTF1, MEF2, USF1 ou encore β -caténine-Lef.

c-Jun : paradigme de l'interaction avec un facteur de transcription situé à proximité

Les protéines de la famille Jun fonctionnent comme des facteurs de transcription dimériques avec les protéines de la famille Fos et les protéines de la famille CREB/ATF pour se fixer respectivement sur des sites consensus AP-1 ou CRE. Ces facteurs jouent un rôle important dans la réponse à de nombreux stimuli (Wisdom et al., 1999). Après la découverte

Introduction

de l'activation synergique de l'enhancer du polyomavirus via un site AP-1 et un site EBS (Martin et al., 1988), de nombreuses synergies fonctionnelles ont été observées sur des promoteurs présentant un site EBS proche d'un site AP-1 ou CRE (Wasylyk et al., 1990).

En ce qui concerne les membres du groupe PEA3, ce type de synergie a été observée sur de nombreux promoteurs : *matrilysine (mmp-7)* (Crawford et al., 2001), *ostéopontine* (El-Tanani et al., 2004), *uPA* (Urokinase-type plasminogen factor) (Nerlov et al., 1992), *stromélysine (mmp-3)* et *collagénase de type IV mmp-9* (Higashino et al., 1995). Le même type de coopération est suggéré dans la régulation du gène *IL-8* codant un facteur angiogénique (Iguchi et al., 2000).

D'un point de vue structural, une interaction directe a pu être mise en évidence entre c-Jun et la partie C-terminale d'ERM contenant le domaine ETS (Nakae et al., 1995). Il a en effet été démontré que l'interaction de c-Jun avec les membres de la famille ETS nécessitait les domaines de fixation à l'ADN des deux partenaires (Bassuk and Leiden, 1995).

TTF1: le développement du poumon

TTF1 (Thyroid transcription factor-1) est un facteur de transcription de la famille Nkx qui régule la transcription de gènes spécifiquement exprimés dans la thyroïde, le poumon et le diencéphale. Il permet, entre autres, de réguler l'expression de la protéine C du surfactant (SP-C), un marqueur de différenciation des cellules alvéolaires (Lin et al., 2006).

Le promoteur de *SP-C* contient un site EBS sur lequel ERM, qui est exprimé dans le poumon en développement, peut se fixer. Néanmoins, la surexpression seule d'ERM a peu d'effet sur ce promoteur. En revanche, associée à celle de TTF1, elle augmente de façon significative l'activation induite par ce facteur de transcription. ERM permet donc d'augmenter de façon synergique l'activité transcriptionnelle de TTF1 (Lin et al., 2006). Bien que les mécanismes moléculaires responsables de cette synergie ne soient pas connus, les protéines co-immunoprécipitent et les domaines d'interaction ont été déterminés par double hybride : le domaine ETS d'ERM interagit avec la partie N-terminale et l'homéodomaine de TTF1 (Lin et al., 2006).

MEF2 : la différenciation des myoblastes

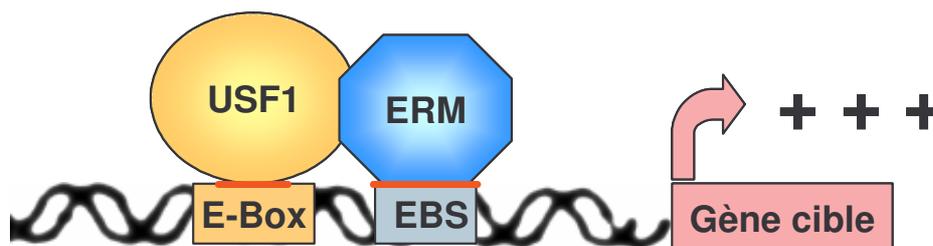
Les protéines MEF2 (myocyte enhancer factor-2) aussi appelées RSRF (Related to SRF) forment une famille de facteurs de transcription qui sont d'importants régulateurs de la différenciation cellulaire et par conséquent jouent un rôle critique dans le développement

embryonnaire. Chez l'adulte, elles interviennent suite à une dégénération musculaire pour permettre la régénération musculaire par prolifération puis différenciation des myoblastes (Potthoff and Olson, 2007). De manière intéressante, PEA3 est exprimé dans ces myoblastes pendant la prolifération et les stades précoces de différenciation. Sa surexpression promeut la différenciation tandis que son blocage par un dominant négatif l'inhibe (Taylor et al., 1997). PEA3 se fixe sur un site EBS situé sur l'enhancer du gène β -enolase, gène impliqué dans la différenciation de ces cellules. Sur cet ADN, PEA3 et MEF2 forment un complexe ternaire identifiable par retard sur gel et super shift conduisant à une augmentation de l'activité transcriptionnelle de PEA3 (Taylor et al., 1997).

USF1 : augmentation de la capacité de fixation à l'ADN

USF1 (Upstream Stimulatory factor-1) fait partie des facteurs de transcription basic-HLH (domaine basic-helix-loop-helix) qui forment des homo- ou hétéro-dimères par leurs domaines HLH. La formation de ces dimères permet de créer un domaine de fixation à l'ADN constitué des deux domaines basiques et qui reconnaît les sites appelés « E-box » (Corre and Galibert, 2006).

Chez le poisson zèbre, le mécanisme moléculaire de la synergie fonctionnelle entre les facteurs de transcription du groupe PEA3 et USF1 est connu : PEA3 interagit avec le domaine bHLH-Zip de USF1 ce qui mène à une levée de l'inhibition intramoléculaire exercée sur le domaine ETS et à la fixation coopérative des deux facteurs sur l'ADN pour former un complexe ternaire (Figure 11) (Greenall et al., 2001).



Augmentation de la fixation à l'ADN

Figure 11 : Représentation schématique de l'interaction entre ERM et USF1 par proximité de leurs sites de fixation permettant une augmentation de la fixation à l'ADN

La proximité entre les sites E-box et EBS permet une interaction entre ERM fixé sur le site EBS et USF1 fixé sur le site E-box. Cette interaction provoque la formation d'un complexe ternaire et une augmentation de la fixation à l'ADN des deux facteurs.

Les domaines de PEA3 impliqués dans cette inhibition intramoléculaire sont en fait les sites d'interaction avec USF1. Cette augmentation de la capacité de fixation à l'ADN des deux

facteurs se traduit par une augmentation de leur activité transcriptionnelle sur un promoteur synthétique contenant un motif E-box-EBS dupliqué issu du LTR (long terminal repeat) du virus HIV-1 (Greenall et al., 2001) (Figure 11). De manière similaire, le domaine ETS de ETS-1 interagit avec le domaine bHLH-Zip de USF1 pour former un complexe ternaire avec l'ADN ce qui augmente, d'une part la capacité de fixation à l'ADN des deux facteurs et d'autre part leur activité transcriptionnelle (Sieweke et al., 1998).

Complexe β -caténine-LEF : recrutement du coactivateur CBP

En absence de signal Wnt, la famille de facteurs TCF/LEF agit en tant que répresseur des gènes cibles de cette voie en se fixant sur des sites TCF. L'activation de la voie Wnt provoque la translocation de la β -caténine dans le noyau qui se fixe sur ces facteurs afin de les convertir en activateurs (Shitashige et al., 2008).

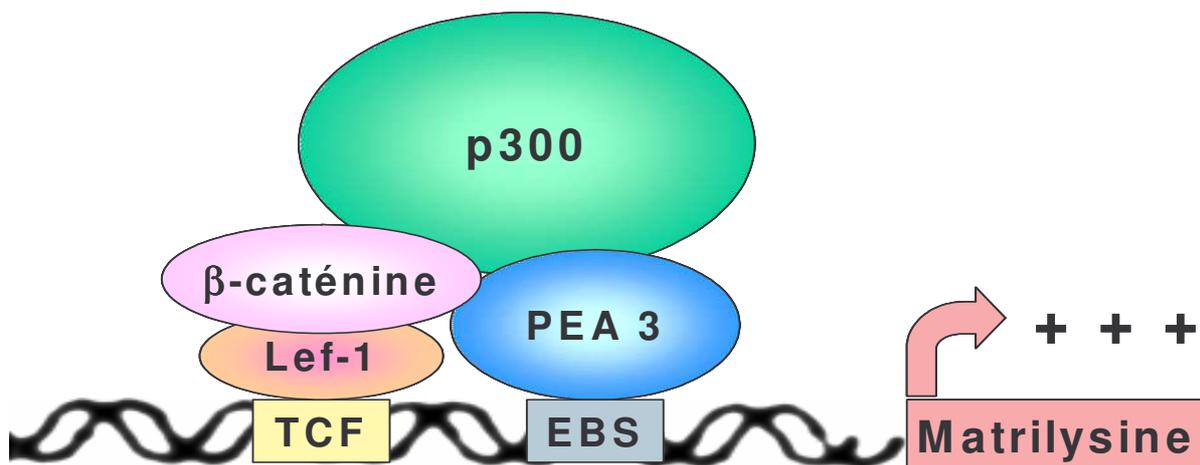


Figure 12 : Recrutement de p300 par PEA3 et β -caténine/Lef-1 sur le promoteur *matrilysine*.

Le complexe β -caténine/Lef-1 fixé sur un site TCF coopère avec les protéines du groupe PEA3 situés sur un site EBS pour coordonner le recrutement de p300 sur le promoteur *matrilysine*.

Le complexe β -caténine-LEF co-immunoprécipite avec PEA3 mais il n'a pas été démontré si l'interaction est directe (Crawford et al., 2001). Ce complexe coopère en effet avec les protéines du groupe PEA3 sur les promoteurs *matrilysine* et *ostéopontine* (Crawford et al., 2001) (El-Tanani et al., 2004). Cette coopération nécessite la présence des sites EBS situés à proximité des sites Tcf (Crawford et al., 2001). Le mécanisme moléculaire de la synergie observée entre PEA3 et β -caténine a été démontré : celui-ci passe par la capacité à coordonner le recrutement de p300 (probablement en augmentant sa stabilisation) sur le promoteur de la *matrilysine* (figure 12). Cette même coopération serait également observée sur le gène de la cycline D1 (données non montrées, (Crawford et al., 2001)). Par ailleurs, El

Tanani *et al.* ont établi que la réponse du gène de l'*ostéopontine* à la β -caténine et à Lef1 est considérablement augmentée en présence de ETS1 et ETS2 mais aussi d'ERM et surtout de PEA3 (El-Tanani et al., 2004).

Conclusions

Il existe donc de nombreux cas d'interaction entre les membres du groupe PEA3 et un facteur de transcription fixé à proximité. Cette interaction peut induire une synergie fonctionnelle. Néanmoins, les modalités de cette synergie ne sont pas toujours connues. Il peut s'agir par exemple d'une augmentation de la capacité de fixation à l'ADN ou du recrutement d'un coactivateur. A ce jour, l'implication de ce type d'interaction dans la diminution de l'activité transcriptionnelle des facteurs impliqués n'a pas été rapportée pour les membres du groupe PEA3. Néanmoins, ce type de phénomène a été observé lors de l'interaction entre ETS1 et le facteur de transcription GF11 sur le promoteur *bax* (Nakazawa et al., 2007). Cette situation est donc envisageable pour les membres du groupe PEA3.

Les contacts avec d'autres facteurs de transcription permettent également d'exercer un contrôle combinatoire sur l'expression de gènes de façon cellule-spécifique : La sélectivité des gènes cibles dans certains types cellulaires peut en effet dépendre de la présence d'un partenaire, ce dernier permettant la création d'une synergie fonctionnelle avec les membres du groupe PEA3. C'est le cas de TTF1 dans les cellules pulmonaires ou de MEF2 dans les myoblastes.

b- Recrutement par les membres du groupe PEA3 d'un autre facteur de transcription indépendamment de sa fixation à l'ADN

Les membres du groupe PEA3, fixés sur un site EBS peuvent permettre le recrutement d'un facteur de transcription sans que celui-ci ne se fixe à l'ADN. C'est le cas de c-Jun sur le promoteur de *her2/neu* (Figure 13) et du récepteur aux androgènes (AR) sur le promoteur de *mmp-1* (Figure 14).

Recrutement de c-Jun sur le promoteur de *her2/neu* : synergie fonctionnelle

Une synergie entre PEA3 et c-Jun est observée sur le promoteur de *her2/neu* bien que ce dernier ne contienne ni site AP-1 ni site CRE. Le recrutement de c-Jun se fait par la zone N-terminale (1-278) de PEA3 qui se fixe sur le site EBS (Figure 13). Dans ce cas, le recrutement du coactivateur p300 est observé (Matsui et al., 2006).

Introduction

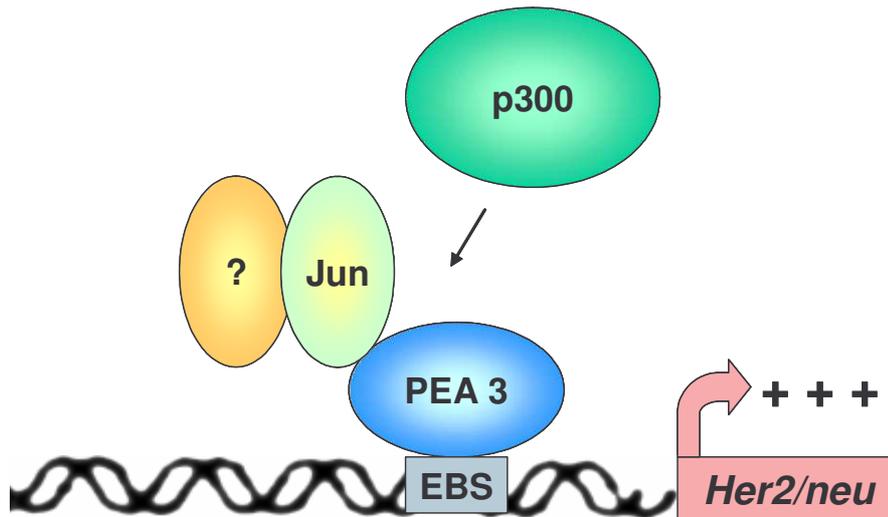


Figure 13 : Représentation schématique du recrutement de c-Jun par ERM sur le promoteur de *her2/neu* induisant une synergie fonctionnelle.

Le promoteur de *her2/neu* ne contient pas de site AP-1 ou CRE à proximité d'un site EBS. La fixation des membres du groupe PEA3 sur le site EBS entraîne le recrutement du facteur de transcription Jun sans que celui-ci ne soit fixé à l'ADN ce qui a pour conséquence une synergie nécessitant le recrutement de p300. Il n'a pas été déterminé si c-Jun est recruté seul ou en dimère avec une protéine de la famille Fos ou de la famille CREB/ATF.

La zone d'interaction de PEA3 impliquée dans cette interaction est différente de celle observée lorsque c-Jun est fixé à l'ADN (Nakae et al., 1995). Ceci est peut-être dû à une conformation différente de c-Jun lorsque ce facteur est fixé ou non à l'ADN. De plus, il n'a pas été déterminé si c-Jun est recruté seul ou en dimère avec une protéine de la famille Fos ou de la famille CREB/ATF.

Recrutement d'AR sur le promoteur de *mmp1* : diminution de la capacité transactivatrice

Dans les cellules de carcinome de prostate DU145, ERM contrôle l'expression du gène de la collagénase interstitielle (*mmp-1*). Le recrutement du récepteur aux androgènes (AR) par ERM sur ce promoteur diminue la capacité transactivatrice d'ERM. Cette répression n'est pas dépendante de la fixation d'AR à l'ADN et nécessite la partie N-terminale du récepteur. Le domaine de fixation à l'ADN ou celui de fixation aux hormones de ce récepteur semble néanmoins nécessaire pour interagir avec ERM. Cette interaction induit probablement soit une répression directe de l'activité transcriptionnelle d'ERM soit un obstacle au recrutement d'autres facteurs intermédiaires (Schneikert et al., 1996) (Figure 14).

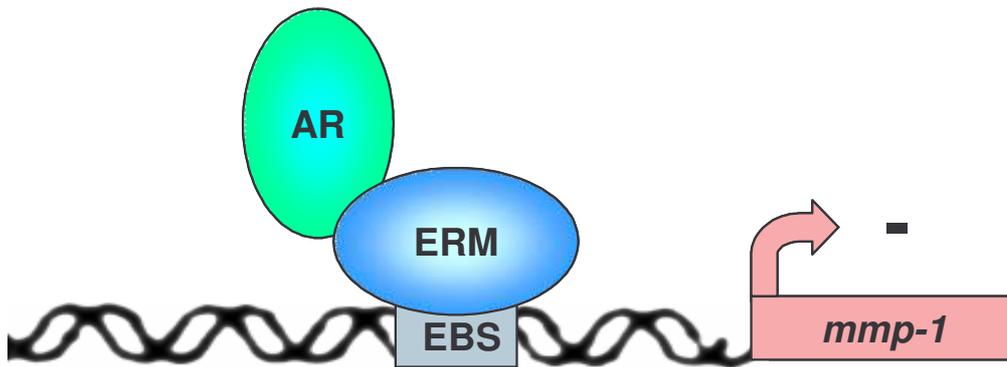


Figure 14 : Modèle du recrutement du récepteur aux androgènes (AR) par ERM sur le promoteur *mmp-1* induisant une diminution de la capacité transactivatrice d'ERM

L'interaction entre AR et ERM fixé sur un site EBS induit une répression de son activité transcriptionnelle.

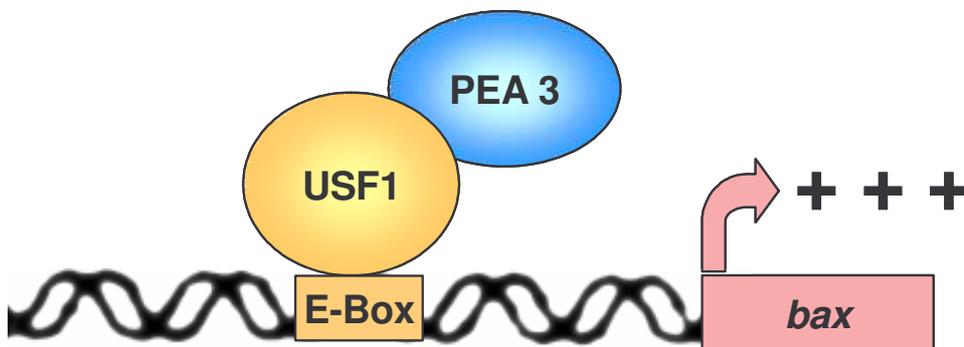


Figure 15 : Représentation schématique du recrutement de PEA3 par USF1 sur le promoteur *bax*.

Le promoteur de *bax* ne contient pas de site EBS. PEA3 agit via le facteur de transcription USF-1 et le site E-box pour transactiver le promoteur murin *bax*, sans fixer lui-même l'ADN. D'après (Firlej et al., 2005)

Depuis cette découverte, d'autres membres de la famille ETS ont été démontrés comme interagissant avec AR. Ainsi, PDEF interagit avec le domaine de fixation à l'ADN de AR ce qui augmente l'activation androgéno-dépendante du promoteur du gène PSA (Prostate-specific antigen) (Oettgen et al., 2000). Plus récemment, Massie et *al.* ont montré que ETS1 interagit avec AR sur certains des promoteurs cibles de ce récepteur (Massie et al., 2007).

Ainsi, le recrutement d'un facteur de transcription par les membres du groupe PEA3 peut aboutir à une synergie fonctionnelle (Matsui et al., 2006) comme à une diminution de sa capacité transactivatrice (Schneikert et al., 1996).

c- Recrutement des membres du groupe PEA3 sur un promoteur indépendamment de leur fixation à l'ADN

Les membres du groupe PEA3 peuvent recruter sur un promoteur des facteurs de transcription. *A contrario*, ces facteurs PEA3 peuvent également être recrutés par un facteur de transcription fixé à l'ADN sans qu'il y ait présence d'un site EBS (Figure 15). C'est le cas d'USF1 sur le promoteur *bax*. Chez la souris, les trois membres du groupe PEA3 sont capables d'interagir avec USF-1 afin de réguler de façon synergique la transcription du gène activateur de l'apoptose *bax* bien qu'il n'y ait pas de sites EBS fonctionnels sur le promoteur de ce gène (Firlej et al., 2005). Le recrutement de PEA3 se fait sans fixation à l'ADN mais via USF-1 qui se fixe sur deux boîtes-E (E-boxes). Ainsi l'interaction entre les domaines de fixation à l'ADN de USF1 et de PEA3, permettent à ce membre de la famille ETS de transactiver le promoteur sans se fixer directement à l'ADN, agissant ainsi comme un coactivateur transcriptionnel (Firlej et al., 2005) (Figure 15).

d- Interaction avec un facteur de transcription qui inhibe la fixation à l'ADN des membres du groupe PEA3

Enfin, l'interaction des membres du groupe PEA3 avec un facteur de transcription peut également inhiber leur fixation à l'ADN, c'est le cas des protéines Id. Les protéines Id (Inhibitor of differentiation/DNA binding) sont des facteurs de transcription impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et la néo-angiogenèse. Ces protéines sont des facteurs HLH (helix-loop-helix), auxquels il manque le domaine basique. Elles agissent comme des dominants négatifs des facteurs de transcription basic-HLH en s'hétérodimérisant avec eux, ce qui empêche leur fixation à l'ADN (faute d'un deuxième domaine basique) (pour revue (Norton et al., 1998)). Ces protéines sont également capables de fixer le domaine de fixation à l'ADN de protéines ETS telles que ELK1 et SAP1/ELK 4 et de réprimer la formation d'un

complexe ternaire avec SRF (Stinson et al., 2003; Yates et al., 1999). De plus, Id1 interagit directement avec ETS2 et diminue son activité transcriptionnelle sur le promoteur de *p16INK4a* (Ohtani et al., 2001).



Figure 16 : Les protéines de la famille Id empêchent la fixation à l'ADN de PEA3 en se fixant sur leur domaine ETS.

En ce qui concerne les membres du groupe PEA3, la protéine Id2 interagit avec le domaine ETS de PEA3 lors d'expériences de GST pull-down. Cette interaction entraîne une diminution de la fixation à l'ADN observée par retard sur gel (Greenall et al., 2001). Ainsi, les protéines Id peuvent agir en *trans* pour empêcher la fixation à l'ADN des membres du groupe PEA3 (Figure 16).

Conclusions

Pour moduler l'expression de certains gènes, les membres du groupe PEA3 interagissent avec d'autres facteurs de transcription. Dans la majorité des cas décrits, ces interactions visent à augmenter l'expression de ces gènes cibles. Les mécanismes moléculaires mis en jeu sont peu connus. Ceux-ci peuvent passer par la stabilisation de l'interaction avec un coactivateur tel que p300 (Crawford et al., 2001; Matsui et al., 2006) ou encore par une augmentation de la capacité de fixation à l'ADN par levée de l'inhibition du domaine d'autoinhibition (Greenall et al., 2001). Il existe également des interactions protéiques qui diminuent la capacité transactivatrice des membres du groupe PEA3 (Schneikert et al., 1996) (Greenall et al., 2001). Enfin, l'interaction entre deux facteurs de transcription peut permettre également le recrutement de l'un d'eux sans qu'un site de fixation à l'ADN lui soit destiné : C'est le cas du recrutement de c-Jun par PEA3 sur le promoteur de *her2/neu* (Matsui et al., 2006) ou de PEA3 par USF-1 sur le promoteur *bax* (Firlej et al., 2005).

Ainsi, en fonction du type cellulaire et du tissu étudié, les membres du groupe PEA3 exprimeront des gènes cibles différents car ils interagiront avec différents facteurs de transcription. Ces derniers permettant, par leur présence dans certains tissus, la création d'une synergie fonctionnelle avec les membres du groupe PEA3.

3 Les corégulateurs

Outre la machinerie basale et des facteurs de transcription spécifiques, d'autres molécules jouent un rôle dans la régulation de l'activité des membres du groupe PEA3. Il s'agit des corégulateurs qui sont des protéines qui régulent négativement (corépresseur) ou positivement (coactivateur) l'activité transcriptionnelle sans se fixer à l'ADN.

a- Corépresseurs

Les membres du groupe PEA3 interagissent avec des corégulateurs tels que CHD3 ou ZNF237 qui diminuent leur pouvoir transactivateur et peuvent donc être considérés comme des co-répresseurs (Figure 17).

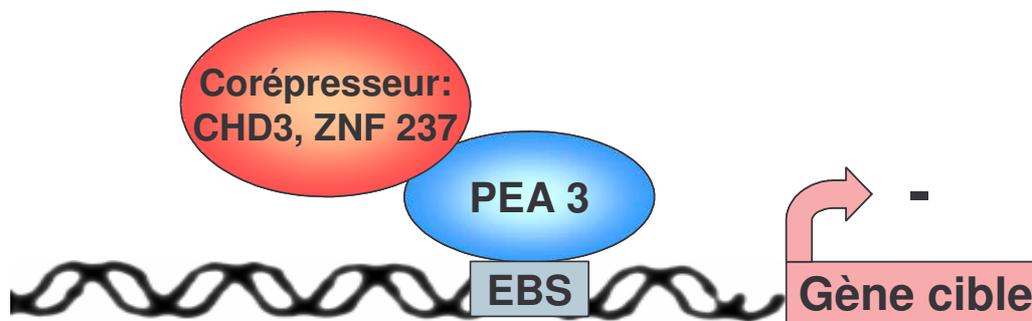


Figure 17 : Recrutement de corépresseurs par les membres du groupe PEA3

CHD3

La protéine chromodomain helicase DNA binding protein 3 (CHD3), aussi nommée Mi-2 α , possède des domaines chromo (chromatin organisation modifier) et des domaines hélicase/ATPase. Cette protéine est un remodeleur de la chromatine dépendante de l'ATP qui fait partie du complexe répresseur Mi-2/NuRD, complexe participant au remodelage de la chromatine en désacétylant les histones grâce à la présence d'HDAC (Histone Désacétylase) au sein du complexe (Bowen et al., 2004). La protéine CHD3 a été identifiée comme partenaire d'ERM lors d'un criblage en double hybride (Pastorcic and Das, 2007). Cette interaction nécessite la présence des résidus 1862 à 1877 situés dans la zone C-terminale de CHD3 et celle des résidus 279 à 343 d'ERM situés dans le domaine de régulation négatif (DRN). CHD3 est recruté sur le promoteur du gène *presenilin1* ce qui diminue l'activation induite par ERM sur ce promoteur. Les mécanismes mis en jeu dans cette répression ne sont pas connus puisqu'il n'a pas pu être mis en évidence d'interaction entre ERM et un composant d'HDAC qui peut être présent dans le complexe Mi-2/NuRD (Pastorcic and Das, 2007). Puisque CHD3 est capable d'interagir avec SUMO (Ivanov et al.,

2007; Minty et al., 2000) et interagit avec ERM dans la région comprenant les sites de sumoylation (voir paragraphe IIB4, page 72), il est possible que l'inhibition causée par CHD3 puisse être corrélée à la conjugaison de SUMO sur ERM.

ZNF237

La protéine ZNF237 est un membre de la famille MYM (myeloproliférative and mental retardation motif). Ce motif MYM est un domaine doigt de zinc putatif qui serait impliqué dans des interactions protéiques plutôt que dans la fixation à l'ADN. La fonction des protéines MYM n'est pas clairement définie. Néanmoins, une des protéines de la famille, ZNF198, est connue pour fixer et stabiliser un complexe répresseur de la transcription contenant LSD1, CoREST et HDAC1 (Gocke and Yu, 2008). ZNF237 a été identifiée comme partenaire d'ERM (AA 95-510, région contenant, entre autres, le DRN et le domaine ETS) lors d'un criblage double hybride (Pastorcic and Das, 2006). L'interaction nécessite les 120 premiers résidus de ZNF237 parmi lesquels les résidus 112 et 114 semblent jouer un rôle particulièrement important. L'interaction entre ZNF237, ERM et un fragment du promoteur du gène *presenilin1* est observée par retard sur gel. Cette interaction entraîne une diminution de l'activation induite par ERM sur ce promoteur. Les mécanismes mis en jeu dans cette répression ne sont pas connus (Pastorcic and Das, 2006). ZNF237 possède dans la zone d'interaction avec ERM deux SIM (SUMO-interacting motif) lui permettant de recruter SUMO (Hoeller et al., 2006) ce qui pourrait potentiellement lui permettre de participer à l'inhibition de l'activité d'ERM induite suite à cette modification post-traductionnelle.

b- Coactivateurs

Les membres du groupe PEA3 interagissent également avec des corégulateurs tels que LPP, CBP, ACTR ou P/CAF qui augmentent leur pouvoir transactivateur et peuvent donc être considérés comme des coactivateurs comme l'illustre la figure 18.

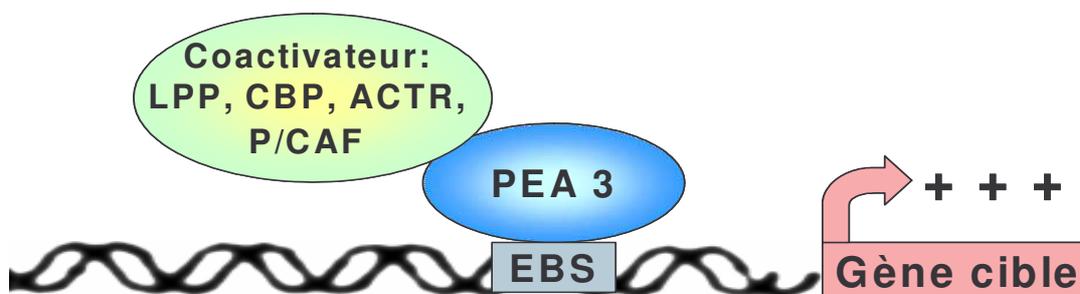


Figure 18 : Recrutement de coactivateurs par les membres du groupe PEA3

LPP

La protéine LPP (lipoma-preferred partner) fait partie de la sous-famille des protéines à domaines LIM (Lin-11 Isl-1 Mec-3 domain). Ces domaines, ainsi que la région proline-riche qui les précède, possèdent une capacité d'activation transcriptionnelle. Les protéines possédant ces domaines sont des adaptateurs permettant l'assemblage de complexes multiprotéiques. Elles sont majoritairement localisées au niveau des plaques d'adhésion focales, mais peuvent également être transférées dans le noyau où elles modulent la transcription en se fixant sur des facteurs de transcription (Knuesel et al., 2003). A partir d'une étude en simple hybride, il a été montré une interaction entre PEA3 et cette protéine (Guo et al., 2006). Elle interagit *in vivo* et *in vitro* avec PEA3 mais aussi avec ER81 grâce à sa région transactivatrice. L'interaction avec ERM *in vitro* est, quant à elle, extrêmement faible. Son recrutement *in vivo* sur les promoteurs des gènes *mmp1* et *cox2* potentialise la transactivation induite par PEA3, agissant comme un coactivateur du facteur PEA3. Toutefois, le rôle de LPP dans la régulation des gènes cibles du groupe PEA3 et les voies de signalisation impliquées dans ce recrutement restent à définir (Guo et al., 2006).

CBP/p300

CBP (CREB-binding Protein) et p300, deux protéines très proches, sont des coactivateurs transcriptionnels. Elles possèdent une fonction acétyl-transférase qui leur permet, entre autres, d'acétyler les histones, ce qui contribue à l'activation transcriptionnelle (fonction HAT : Histone Acétyl Transférase). Elles servent également d'adaptateurs permettant de relier les facteurs de transcription aux composants de la machinerie basale de transcription (Janknecht and Hunter, 1996).

CBP/p300 interagit avec le facteur PEA3 et permet une meilleure transactivation de ses gènes cibles comme *cox-2* (Liu et al., 2004). La protéine ER81 interagit également *in vivo* et *in vitro* avec CBP et p300 (Goel and Janknecht, 2003; Papoutsopoulou and Janknecht, 2000). Les régions impliquées dans l'interaction ont été définies entre les résidus 249 et 429 pour ER81. Cette région englobe le domaine ETS bien que celui-ci ne soit pas requis pour le synergisme fonctionnel (Papoutsopoulou and Janknecht, 2000). En ce qui concerne CBP, les résidus nécessaires à l'interaction (451 à 721) contiennent la région déjà décrite pour interagir avec d'autres facteurs de transcription tels que CREB, Jun ou Myb (Papoutsopoulou and Janknecht, 2000). La cotransfection d'ER81 et CBP entraîne une synergie entre ces deux facteurs pour l'activation de la transcription des gènes cibles comme le gène *mmp-1* ou un promoteur « TORU » (élément de réponse aux facteurs ETS) (Goel

Introduction

and Janknecht, 2003; Papoutsopoulou and Janknecht, 2000). Néanmoins, cette activation n'est pas due à une acétylation des histones. Elle est dépendante de l'acétylation d'ER81 sur les lysines 33 et 116 puisque la mutation de ces résidus en alanine annule l'effet de CBP (Goel and Janknecht, 2003). L'implication de CBP dans cette modification post-traductionnelle des membres du groupe PEA3 sera traitée dans la partie suivante (IIB2, page 72). En ce qui concerne ERM, ce facteur de transcription interagit également avec CBP/p300 et l'expression de ce coactivateur accroît son activité transcriptionnelle (Baert, données non publiées). Enfin, nous avons vu précédemment que le recrutement de CBP pouvait être stimulé par l'interaction entre les membres du groupe PEA3 et un facteur de transcription, permettant ainsi une synergie entre les deux facteurs (cas de Jun et de la β -caténine).

ACTR

ACTR (Activator of Thyroid and retinoid acid receptor) aussi appelé AIB1 (Amplified in Breast cancer 1) ou SRC-3 est un membre de la famille SRC (p160 steroid receptor coactivator) (Leo and Chen, 2000). ACTR est amplifié dans environ 60 % des cancers mammaires primaires (Anzick et al., 1997).

Cette protéine est un coactivateur des trois membres du groupe PEA3 puisqu'elle accroît leur activité transcriptionnelle sur le promoteur *mmp-1* placé en amont d'un gène rapporteur (Goel and Janknecht, 2004). De plus, PEA3 recrute ce coactivateur sur les promoteurs de *mmp-2* et *mmp-9* ce qui stimule son activité transcriptionnelle. En ce qui concerne les autres membres du groupe, ACTR promeut l'activité transcriptionnelle d'ERM et ER81 sur le promoteur de *mmp-9* mais pas sur celui de *mmp-2* (Qin et al., 2008). PEA3 participe également, conjointement avec le facteur de transcription Jun, au recrutement d'ACTR sur le promoteur de *mmp-13* (Yang et al., 2008). Récemment, il a été démontré que ACTR est aussi recruté par PEA3 (mais pas par ERM et ER81) sur le promoteur du gène *twist* qui code un facteur de transcription impliqué dans la métastase (Qin et al., 2009). L'interaction nécessite la région centrale d'ER81 (AA 249 à 383) et la partie N-terminale (AA 1-810) d'ACTR qui contient, entre autres, le domaine d'interaction avec les récepteurs aux hormones (Goel and Janknecht, 2004). ACTR contient également un domaine HAT qui est sûrement impliqué dans l'activation induite par ACTR (Goel and Janknecht, 2004). Néanmoins, dans le cas de l'activation du promoteur *mmp-1*, une forme d'ACTR dépourvue de ce domaine est toujours capable de stimuler l'activité de ER81 ce qui laisse suggérer que l'activation sur ce promoteur ne passe pas par la capacité d'ACTR à acétyler les histones. A l'inverse une forme d'ACTR dépourvue du domaine d'interaction avec CBP n'est plus

capable de stimuler l'activité d'ER81. Ainsi, dans le cas du promoteur *mmp-1*, l'activation induite par ACTR passe par le recrutement de CBP (Goel and Janknecht, 2004).

P/CAF

Le coactivateur P/CAF (p300/CBP-associated factor) doit son nom au fait qu'il ait été initialement découvert comme un interacteur de p300 et CBP. Il a ensuite été démontré qu'il possédait également une activité HAT intrinsèque (Yang et al., 1996). Cette protéine interagit *in vitro* et *in vivo* avec ER81. L'interaction nécessite la région centrale d'ER81 (AA 249 à 477) contenant une partie de son DRN et son domaine ETS. P/CAF augmente l'activité transcriptionnelle d'ER81 sur le promoteur *mmp-1* ou le promoteur « TORU ». Cette activation est dépendante de sa capacité à acétyler ER81 au niveau de la lysine 116 puisque la mutation de cette lysine abolit l'activation induite par P/CAF (Goel and Janknecht, 2003).

c- Conclusions

Ainsi, à l'instar d'autres facteurs de transcription dont ceux de la famille ETS (pour revue (Li et al., 2000)), les membres du groupe PEA3 interagissent avec divers corégulateurs qui peuvent agir comme des coactivateurs ou des co-répresseurs. Néanmoins les mécanismes moléculaires impliqués dans ces modulations de l'activité transcriptionnelle des membres du groupe PEA3 sont pour le moment inconnus. Ils passent probablement par le recrutement de complexes activateurs ou répresseurs. Certains coactivateurs peuvent également augmenter l'activité transcriptionnelle de ces facteurs en les acétylant de façon directe ou indirecte. D'autres modifications post-traductionnelles, telles que la sumoylation pourraient être également impliquées dans le recrutement de ces corégulateurs. En ce qui concerne les membres du groupe PEA3, il n'a jamais été rapporté de façon formelle qu'une modification post-traductionnelle pouvait affecter le recrutement de corégulateurs. Toutefois, ce type de phénomène a été observé pour d'autres membres de la famille ETS. Ainsi la phosphorylation de ETS-1 et ETS-2 par la voie MAPK induit un recrutement de CBP ce qui augmente leur pouvoir transactivateur (Foulds et al., 2004). De ce fait, cette situation est envisageable pour les membres du groupe PEA3. Très récemment il a en effet été suggéré que, suite à une activation par le PMA, la sumoylation de PEA3 est augmentée ce qui favoriserait une coopération avec CBP (Guo and Sharrocks, 2009) (voir partie sumoylation II B4, page 72)

Introduction

Catégorie	Protéine	Substrat			Effet	Références
		PEA3	ERM	ER81		
Phosphorylation	ERK	oui	oui	oui	A	(Bosc et al., 2001; O'Hagan et al., 1996) (Janknecht, 1996)
	p38			oui	A	(Bosc et al., 2001)
	JNK	oui		oui	A	(Bosc et al., 2001; O'Hagan et al., 1996)
	MSK1	oui	oui	oui	A	(Janknecht, 2003)
	RSK1			oui	A	(Wu and Janknecht, 2002)
	MK2			oui	R	(Janknecht, 2001)
	PKA	non	oui	oui	A	(Wu and Janknecht, 2002) (Baert et al., 2002) (Coutte et al., 1999)
	LKB1	oui			R	(Upadhyay et al., 2006)
Acétylation	CBP/p300	oui	oui	oui	A	(Goel and Janknecht, 2003; Goel and Janknecht, 2004) (Papoutsopoulou and Janknecht, 2000) Baert, données non publiées
	ACTR			oui (in vitro)	A	(Goel and Janknecht, 2004)
	P/CAF			oui	A	(Goel and Janknecht, 2003)
Ubiquitination	Cop1	oui	oui	oui	R	Baert, soumis
Sumoylation	Ubc9		oui		R	(Degerny et al., 2005)
	PIAS 1		oui		R	Degerny, thèse
	PIAS γ	oui			R	(Nishida et al., 2007)

Tableau 7 : Les interacteurs enzymatiques entraînant une modification post-traductionnelle des membres du groupe PEA3

Effet : Effet observé sur l'activité transcriptionnelle des membres du groupe PEA3 A=Activateur
R=Répresseur

B Modifications post-traductionnelles des membres du groupe PEA3

De nombreuses protéines permettent de modifier après leur traduction les membres du groupe PEA3. Ces protéines sont des kinases, des acétyl-transférases ou encore des enzymes impliquées dans les voies de sumoylation ou d'ubiquitination (tableau 7 et figure 21, page 74).

Pour modifier les membres du groupe PEA3, il est indispensable que ces enzymes interagissent avec ces facteurs même si cette interaction peut être extrêmement fugace. A l'inverse, une modification post-traductionnelle peut être un pré-requis à une interaction avec un partenaire. Enfin, des interconnexions peuvent exister entre ces différentes modifications post-traductionnelles, comme en témoigne le cas du suppresseur de tumeur p53 : Ainsi, en cas de dommages à l'ADN, la phosphorylation de résidus sérine permet de renforcer l'interaction de p53 avec l'acétyltransférase CBP/p300. Cette interaction favorise l'acétylation de la région C-terminale de p53, modification essentielle à son activation transcriptionnelle au niveau des gènes codant les protéines d'arrêt du cycle cellulaire. Enfin, si les dommages à l'ADN sont réparés, p53 est inactivée suite à sa désacétylation nécessaire à son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome (pour revue (Brooks and Gu, 2003)).

1 Phosphorylation

Les protéines du groupe PEA3 sont des points de convergence pour de multiples voies de signalisation mettant en œuvre différentes kinases (figure 19).

Ces facteurs de transcription sont la cible de la voie de signalisation activée, entre autres, par le récepteur HER2/Neu impliquant les MAPkinases (Mitogen-activated protein kinases) ERK (Extracellular signalregulated protein kinase) et p38 (pour revue (de Launoit et al., 2000)). Ainsi, l'activation de ce récepteur conduit à la phosphorylation d'ER81 et accroît son activité transcriptionnelle sur le promoteur des gènes *mmp-1* et *smad7*. Cette activation est dépendante des voies ERK et p38 puisque les inhibiteurs spécifiques de ces voies bloquent l'effet de HER2/Neu sur ER81 (Bosc et al., 2001; Dowdy et al., 2003). La mutation des sites de phosphorylation diminue de moitié l'activation d'ER81 médiée par HER2/Neu

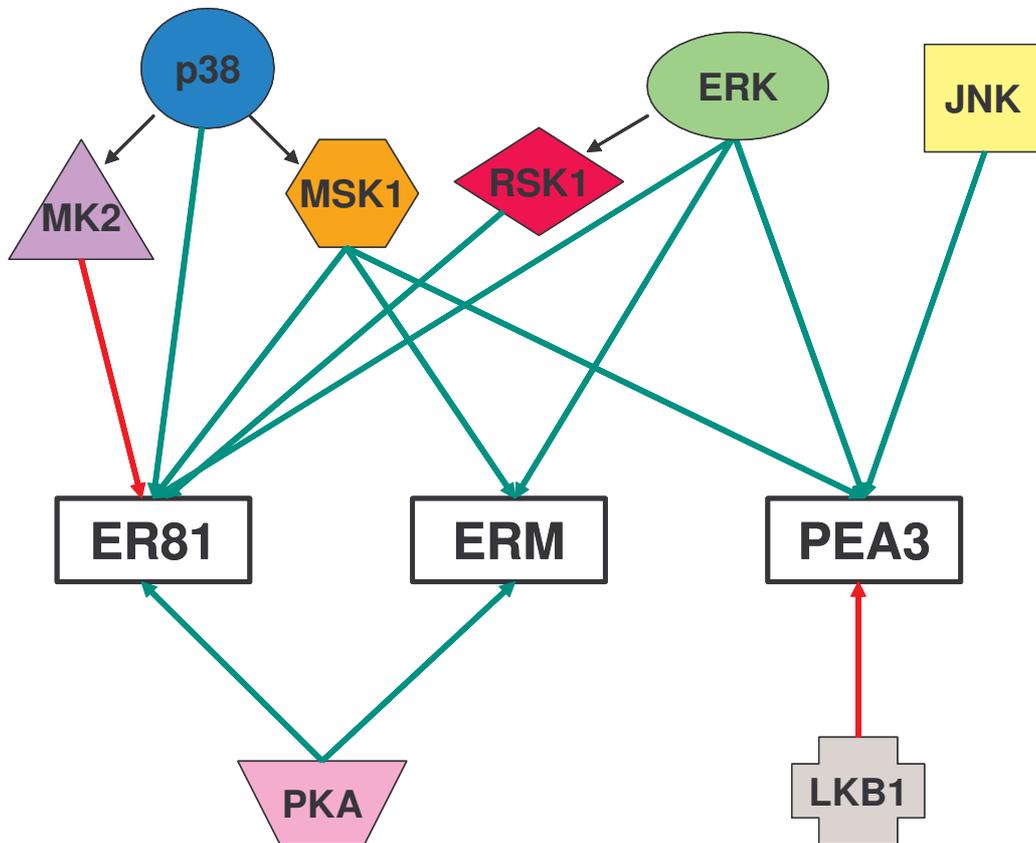


Figure 19 : Schéma des différentes voies de phosphorylation des membres du groupe PEA3.

Les flèches noires représentent une activation par une autre kinase ; les flèches vertes les phosphorylations activatrices des membres du groupe PEA3 et les flèches rouges les phosphorylations inhibitrices.

Introduction

suggérant qu'il existe probablement d'autres mécanismes d'activation d'ER81 par ce récepteur (Bosc et al., 2001). L'activité transactivatrice des deux autres protéines du groupe PEA3 est également augmentée par ERK (Janknecht, 1996) (Bosc et al., 2001) (O'Hagan and Hassell, 1998). En ce qui concerne PEA3, HER2/Neu active également la voie JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) qui conduit à une augmentation de son activité transcriptionnelle, tout au moins sur un promoteur synthétique (O'Hagan and Hassell, 1998). Cette même voie phosphoryle ER81, du moins *in vitro* (Bosc et al., 2001).

Des kinases activées par les MAPK jouent également un rôle dans la régulation de l'activité des protéines du groupe PEA3 et les travaux réalisés concernent principalement ER81 (figures 19 et 21, page 74). Ainsi, MSK1 (Mitogen- and stress-activated protein kinase 1), une kinase activée par p38, augmente l'activité transcriptionnelle des membres du groupe PEA3 (Janknecht, 2003). Cette activation passe par la phosphorylation de deux sérines. Néanmoins, la mutation de ces résidus n'abolit pas totalement l'activation induite par MSK1. En effet, MSK1 co-immunoprécipite avec les cofacteurs CBP/p300 et augmente leur potentiel transactivateur. Cette activation de CBP/p300 représente probablement un autre mécanisme par lequel MSK1 stimule indirectement l'activité transcriptionnelle d'ER81 (Janknecht, 2003). ER81 co-immunoprécipite avec la protéine kinase RSK1 (p90 ribosomal S6 kinase 1), une kinase activée par ERK. Cette interaction nécessite la région centrale d'ER81 comprenant le DRN et le domaine ETS (Wu and Janknecht, 2002). Une fois activée, cette kinase accroît l'activité du facteur de transcription sur le promoteur *mmp-1*. Comme pour MSK1, cette activation passe par la phosphorylation de deux sérines et par l'augmentation du pouvoir transactivateur de CBP/p300 (Wu and Janknecht, 2002). Ces mêmes résidus sérine peuvent également être la cible d'une autre kinase activée par p38, la MK2 (MAPkinase-activated protein kinase 2). A l'inverse des autres kinases précédemment citées, l'activité d'ER81 est inhibée de façon cellule spécifique par MK2 (Janknecht, 2001). Néanmoins, la mutation de ces sérines n'abolit pas totalement l'inhibition induite par MK2. Il existerait donc un mécanisme indépendant de la phosphorylation d'ER81 qui contribuerait également à inhiber son activité (Janknecht, 2001) .

La protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA) est à l'origine de la phosphorylation d'ERM et ER81 (Wu and Janknecht, 2002) (Baert et al., 2002) (Coutte et al., 1999) sur un résidu sérine situé au début du domaine ETS. Dans ce cas, la conséquence fonctionnelle de la phosphorylation d'ERM et ER81 par la PKA se traduit par une induction de leur pouvoir transactivateur ainsi que par une diminution de leur capacité à lier l'ADN (Wu and Janknecht, 2002) (Baert et al., 2002). Ceci pourrait permettre une régulation positive de certains promoteurs ayant une forte affinité pour ERM et ER81 tandis que ceux ayant une faible affinité pour ces facteurs ne seraient pas activés. Le site de phosphorylation conservé dans ERM et ER81 est absent de PEA3. Cette différence explique l'absence d'effet de la kinase

Introduction

PKA sur ce dernier. Cette observation montre que les membres du groupe PEA3 ne sont pas obligatoirement la cible des mêmes voies de signalisation intracellulaires (Baert et al., 2002).

Enfin, une étude a montré que PEA3 co-immunoprécipite avec une sérine/thréonine kinase nommée LKB1. Cette kinase est un suppresseur de tumeur qui est inactivé dans les cancers du poumon (Fan and Struhl, 2009). L'interaction s'établit entre le domaine ETS de PEA3 et le domaine kinase de LKB1. La phosphorylation du facteur PEA3 par cette kinase permet de promouvoir son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome avec pour conséquence de diminuer l'activité transcriptionnelle de ce facteur sur le gène cible *cox2* (Upadhyay et al., 2006) (Figure 19). Cet exemple illustre les interconnexions pouvant exister entre modifications post-traductionnelles et recrutement d'interacteurs : cette phosphorylation par LKB1 permet de moduler le recrutement de complexes enzymatiques impliqués dans la régulation de la stabilité de ces facteurs de transcription.

2 Acétylation

Nous avons vu ci-dessus que les trois membres du groupe PEA3 interagissent avec le coactivateur transcriptionnel CBP/p300 dont l'expression accroît leur activité transcriptionnelle (Goel and Janknecht, 2003; Goel and Janknecht, 2004) (Papoutsopoulou and Janknecht, 2000) (Baert, données non publiées). Cette activation transcriptionnelle peut nécessiter la capacité de CBP/p300 à acétyler les membres du groupe PEA3. En effet, CBP est capable d'acétyler *in vitro* et *in vivo* ER81 (Goel and Janknecht, 2003) ainsi que ERM tout au moins *in cellulo* (Baert données non publiées). Sur le promoteur du gène *mmp-1* ou le promoteur « TORU », l'activation induite par CBP est dépendante de l'acétylation d'ER81 sur les lysines 33 et 116 puisque la mutation de ces lysines en alanines annule la transactivation (Goel and Janknecht, 2003). L'acétylation augmente la capacité d'ER81 à fixer l'ADN. Comme l'acétylation n'a pas lieu dans le domaine de fixation, cette fixation accrue serait due à un changement de conformation permettant au domaine ETS de mieux fixer l'ADN. Néanmoins, la fixation plus affine d'ER81 acétylé sur l'ADN n'est peut-être pas le seul phénomène expliquant l'activation transcriptionnelle observée. En effet, l'acétylation et/ou l'interaction avec p300 augmente également la stabilité d'ER81 (Goel and Janknecht, 2003). Néanmoins, cette stabilisation n'est pas due à une compétition entre l'ubiquitination et l'acétylation au niveau de ces lysines cibles puisque la mutation des deux lysines ne modifie pas la demi-vie d'ER81 (Goel and Janknecht, 2003).

La surexpression de HER2/Neu semble favoriser l'acétylation de ER81 (Goel and Janknecht, 2003; Goel and Janknecht, 2004). HER2/Neu induit en effet la phosphorylation

Introduction

de p300 ce qui stimule son activité acétyl-transférase et donc augmente l'acétylation d'ER81 (Goel and Janknecht, 2003).

ACTR ainsi qu'un autre membre de la famille SRC, SRC-2 aussi nommé GRIP1 (glucocorticoid receptor interacting protein 1) sont capables d'acétyler *in vitro* ER81. Toutefois, leur efficacité d'acétylation *in vivo* sur ce substrat est très faible (Goel and Janknecht, 2004). Dans le cas du promoteur *mmp-1*, ACTR permet l'activation et l'acétylation d'ER81 de façon indirecte : ACTR stimule le recrutement de CBP grâce à son domaine CID (CBP Interacting Domain) et c'est CBP qui acétyle ER81 (Goel and Janknecht, 2004).

Enfin, P/CAF interagit également avec ER81 et est également capable de l'acétyler *in vitro* et *in vivo* au niveau de la lysine 116. Cette acétylation conduit à une augmentation de l'activité transcriptionnelle d'ER81 sur le promoteur *mmp-1* ou le promoteur « TORU » (Goel and Janknecht, 2003).

3 Ubiquitination

La polyubiquitination est un signal permettant aux protéines d'être dégradées par le protéasome (Muratani and Tansey, 2003). PEA3 et ERM sont modifiées par l'ubiquitine (Takahashi et al., 2005) (Baert et al., 2007) et l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique du protéasome conduit à la stabilisation des deux protéines. La stabilité de PEA3 et ERM est donc régulée par la conjugaison d'ubiquitine et la dégradation par le protéasome ce qui explique leur demi-vie courte (environ 1 heure) (Baert et al., 2007). L'ubiquitination d'ER81 n'a pas encore été établie mais comme sa demi-vie est proche de celle d'ERM (Baert, données non publiées), il est probable qu'elle soit aussi régulée par la conjugaison d'ubiquitine.

Récemment, la E3 ubiquitine ligase (enzyme permettant l'ubiquitination du substrat) COP1 a été identifiée comme interagissant avec les trois membres du groupe PEA3 (Baert et al., soumis). L'interaction nécessite deux motifs consensus de fixation de COP1 présents dans le domaine de transactivation N-terminal des membres du groupe PEA3. Cette protéine de la voie d'ubiquitination provoque, en présence de son partenaire DET1, l'ubiquitination et la dégradation par le protéasome d'ERM. En absence de DET1, COP1 diminue l'activité transcriptionnelle des membres du groupe PEA3 sans affecter leur stabilité ce qui laisserait sous-entendre que COP1 pourrait avoir un rôle dans la régulation de l'activité transcriptionnelle des membres du groupe PEA3 indépendamment de la dégradation. Une régulation du même type est observée sur c-Jun (Bianchi et al., 2003).

Introduction

De manière intéressante, l'inhibition du protéasome favorise l'activité transcriptionnelle des deux facteurs de transcription (Baert et al., 2007) (Takahashi et al., 2005). Cet effet activateur ne serait pas uniquement dû à une stabilisation de la protéine mais aussi à une augmentation du potentiel transactivateur par un mécanisme inconnu (Baert et al., 2007). En outre, cette inhibition du protéasome conduit à un renforcement de la mono-ubiquitination d'ERM suggérant un rôle de la conjugaison d'ubiquitine dans l'activation transcriptionnelle de la protéine (Baert et al., 2007).

En ce qui concerne PEA3, il a été démontré que lorsque cette protéine est poly-ubiquitinée, elle est relocalisée au niveau de corps nucléaires suggérant une localisation subcellulaire particulière des formes ubiquitinées de cette protéine. Néanmoins, le devenir et la fonction des ces protéines modifiées restent indéterminés (Takahashi et al., 2005).

4 Sumoylation

Des modifications par des molécules apparentées à l'ubiquitine telles qu'ISG15, Nedd8 et SUMO régulent également l'activité des facteurs de transcription (pour revue (Hay, 2005)). Parmi ces molécules, la plus étudiée est SUMO (*Small ubiquitin-related modifier*).

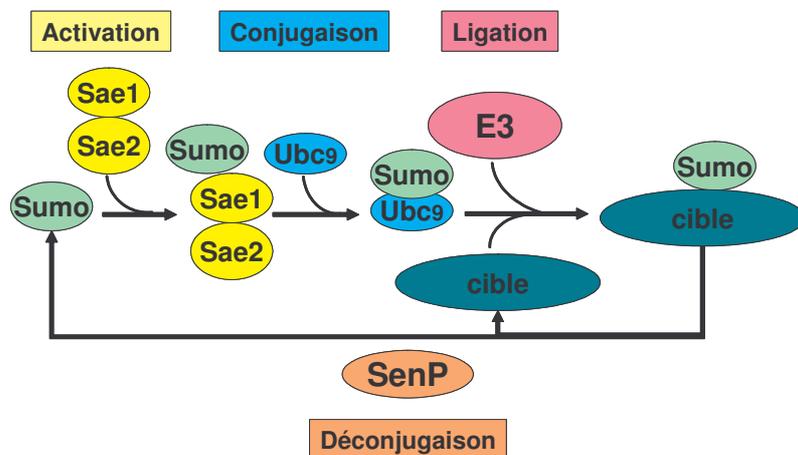


Figure 20 : Voie de conjugaison de SUMO et localisation subcellulaire de ses différents acteurs. Adapté de (Verger et al., 2003).

La voie de conjugaison de SUMO utilise la forme mature de SUMO (après le clivage par les SUMO-protéases) et nécessite, *in vivo*, 3 activités enzymatiques (Figure 20) : Tout d'abord, l'enzyme d'activation, E1 (formée de deux sous-unités Sae1 et Sae2) transfère le SUMO activé. Puis, l'enzyme E2 de conjugaison, Ubc9, interagit directement avec le substrat au niveau du site consensus de sumoylation et catalyse le transfert de SUMO sur la protéine

Introduction

cible (Hay, 2005). *In vitro*, cette interaction Ubc9/substrat semble suffisante pour placer la lysine cible face au site actif d'Ubc9 et assurer la liaison isopeptidique entre SUMO et le substrat (Bernier-Villamor et al., 2002).

Enfin, une E3 ligase (ou SUMO-ligase) permet d'accélérer le transfert de SUMO sur le substrat en augmentant la stabilité du complexe Ubc9-protéine cible et/ou en orientant le résidu lysine accepteur (Hay, 2005). Comme tous les substrats interagissent directement avec Ubc9, l'existence de différentes E3 ligases permet la spécificité de la réaction (Hay, 2005). Il existe également des enzymes de déconjugaison de SUMO, nommées SENP (Sentrin protease) qui font de la sumoylation un processus dynamique et réversible. La majorité des protéines de la voie de conjugaison de SUMO sont localisées dans le noyau ce qui permet d'associer la sumoylation à un processus essentiellement nucléaire (Karamouzis et al., 2007).

Un site consensus de sumoylation γ KxE/D a été défini : la lysine cible doit être précédée d'un acide aminé hydrophobe (γ) suivi de n'importe quel acide aminé (x) puis d'un résidu acide le plus souvent un acide glutamique. Ce site est directement reconnu par Ubc9 et la mutation du résidu acide en alanine provoque une perte de l'interaction entre Ubc9 et le substrat (Bernier-Villamor et al., 2002). La mutation de la lysine cible en arginine empêche quant à elle la sumoylation du site consensus. Les trois membres du groupe PEA3 partagent des sites consensus de sumoylation situés dans le domaine inhibiteur central DRN. Ces trois protéines ont en effet été décrites comme pouvant être conjuguées à SUMO (Degerny et al., 2005; Gocke et al., 2005; Nishida et al., 2007).

ER81 peut être conjuguée à SUMO1 sur plusieurs sites mais rien n'est connu sur l'effet de sa sumoylation car cette protéine a été identifiée dans une étude visant à définir de nouveaux substrats de SUMO chez les mammifères (Gocke et al., 2005). Concernant ERM, UBC9 a été initialement trouvé comme interacteur de cette protéine lors d'une recherche d'interacteurs par double hybride. Ce résultat a conduit à démontrer que la sumoylation d'ERM semble affecter négativement son pouvoir transactivateur sans toutefois influencer sa liaison à l'ADN, sa stabilité ou sa localisation subcellulaire (Degerny et al., 2005). Les mécanismes moléculaires responsables de cette répression ne sont pas connus pour le moment. Il a cependant été démontré l'inhibition exercée par le domaine DRN d'ERM est liée à la sumoylation de ce dernier au niveau des sites consensus, chaque site de sumoylation fonctionnant comme un motif inhibiteur (Degerny et al., 2008). Enfin, PEA3 est aussi conjuguée à SUMO ce qui réprime son activité transcriptionnelle (Bojovic and Hassell, 2008; Nishida et al., 2007). Cette conjugaison à SUMO est dépendante de l'E3 ligase PIAS γ (Nishida et al., 2007). Cependant PIAS γ réprime également l'activité transcriptionnelle d'une forme non sumoylable de PEA3, phénomène également observé pour ERM (Thèse de C Degerny). De plus, la surexpression de PIAS γ entraîne une relocalisation de PEA3 et de

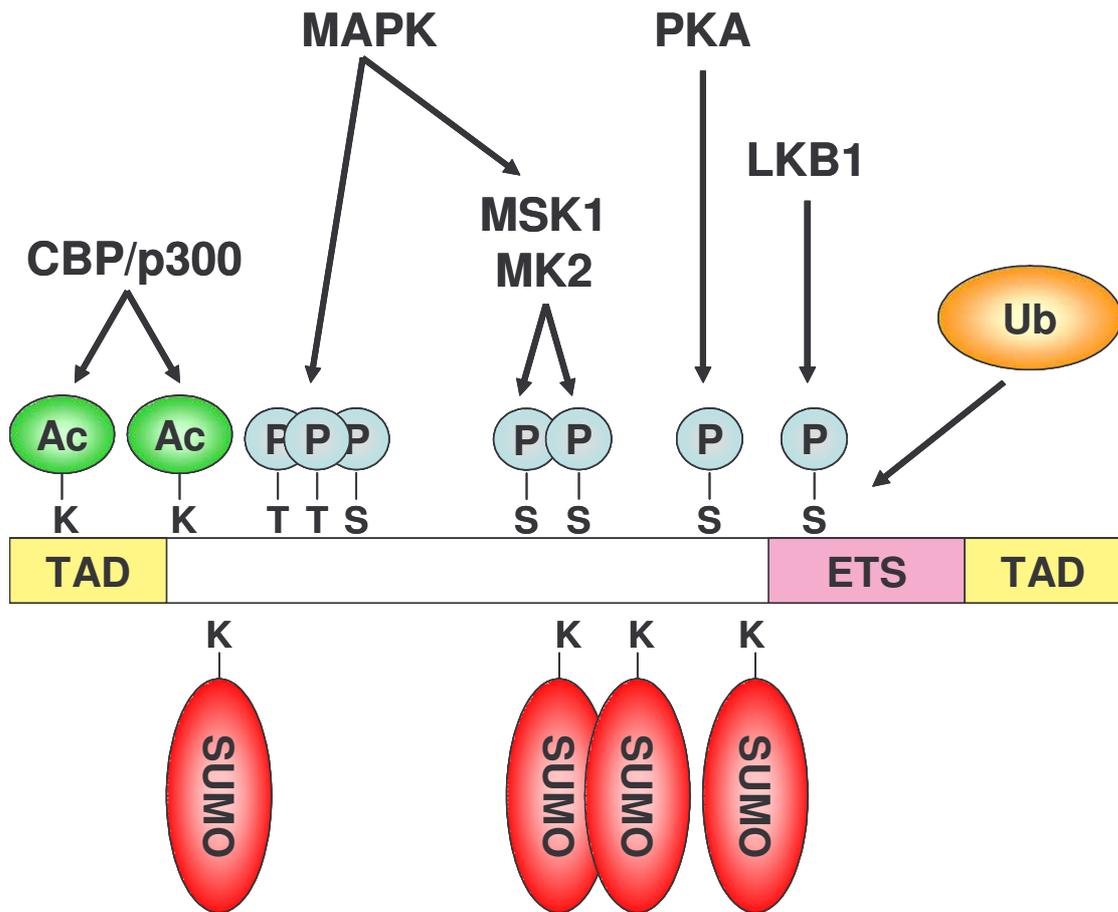


Figure 21 : Représentation d'un membre prototype du groupe PEA3 avec ses domaines fonctionnels et ses modifications post-traductionnelles.

Ac symbolise un groupement acétyl, P un groupement phosphate, Ub l'ubiquitine dont le(s) site(s) de conjugaison est (sont) inconnu(s). Adapté de de Launoit et al. 2006

Introduction

PEA3 KR suggérant que PIAS γ pourrait séquestrer PEA3 dans un complexe répresseur au sein d'un compartiment subnucléaire indépendamment de sa sumoylation (Nishida et al., 2007).

Sur un plan fonctionnel, il faut toutefois noter que si la sumoylation de PEA3 a initialement été impliquée dans l'inhibition de l'activité de ce facteur de transcription, un travail récent a montré que cette sumoylation pouvait avoir un rôle activateur dans des conditions particulières. Ainsi, suite à une activation par le PMA, la sumoylation de PEA3 est augmentée et semble essentielle à l'activation transcriptionnelle sur les promoteurs *mmp-1* et *cox2* (Guo and Sharrocks, 2009). Les mécanismes précis ne sont pas connus ; mais il semble que la sumoylation de PEA3 favoriserait une coopération avec CBP pour augmenter la transcription de ces gènes cibles, sûrement en recrutant son activité HAT, comme le laisse supposer l'augmentation de l'acétylation des histones de ces promoteurs (Guo and Sharrocks, 2009). Cet exemple illustre le fait que selon le promoteur et le modèle biologique étudiés, une modification post-traductionnelle peut avoir des effets opposés.

5 Conclusions

De multiples modifications post-traductionnelles peuvent affecter les membres du groupe PEA3 et moduler leur activité transcriptionnelle de façon positive ou négative (Figure 21). Ces modifications sont assurées par de nombreuses enzymes et partenaires protéiques qui peuvent avoir des rôles similaires, complémentaires ou opposés. Il est également intéressant de constater que ces modifications doivent être interconnectées. En effet, la phosphorylation de PEA3 par LKB1 induit son ubiquitination et la sumoylation de PEA3 modifierait le recrutement de CBP (Guo and Sharrocks, 2009). Cet exemple démontre qu'une modification post-traductionnelle peut permettre de moduler le recrutement de partenaires protéiques.

Introduction

Conclusions et objectif de la thèse

Les facteurs de transcription du groupe PEA3 sont des activateurs transcriptionnels exprimés dans de nombreux tissus et régulant des gènes impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires. Leur activité doit être finement régulée soit par contrôle de leur niveau d'expression soit directement au niveau de leur activation transcriptionnelle. Nous avons vu que la régulation de leur activité est principalement liée à leur capacité d'interaction avec des partenaires protéiques et des partenaires enzymatiques permettant de les modifier après leur traduction. Cette régulation intervient à plusieurs niveaux. Ainsi, l'interaction des membres du groupe PEA3 avec un partenaire peut permettre leur relocalisation, la modulation de leur stabilité ou de leur fixation à l'ADN. Cette modulation de la fixation à l'ADN va contribuer à la sélection de leurs gènes cibles. Ce choix est également modulé par certains partenaires capables de les recruter sur un promoteur où ils ne peuvent se fixer directement. La sélectivité des gènes cibles dans certains types cellulaires peut également dépendre de la présence d'un partenaire ; ce dernier permettant la création d'une synergie fonctionnelle avec les membres du groupe PEA3. Le mécanisme moléculaire de cette synergie reste souvent inconnu néanmoins il a été montré qu'il peut passer par la stabilisation de l'interaction avec un coactivateur tel que CBP/p300. Il ne faut pas oublier non plus qu'il existe également des interactions protéiques qui diminuent la capacité transactivatrice des membres du groupe PEA3. Ainsi la modulation de l'activité transcriptionnelle des membres du groupe PEA3 passe par une grande diversité de mécanismes médiés par des interacteurs variés (Figure 22).

De plus, des interconnexions peuvent exister entre ces différents interacteurs et modifications post-traductionnelles. Ainsi, l'interaction avec certains facteurs de transcription va entraîner le recrutement du CBP. Ce coactivateur va alors permettre un meilleur recrutement de la machinerie de la transcription mais aussi l'acétylation des histones et celle des membres du groupe PEA3. Cette acétylation se traduit par une augmentation de l'activité transcriptionnelle en augmentant la fixation à l'ADN et la stabilité de ces facteurs.

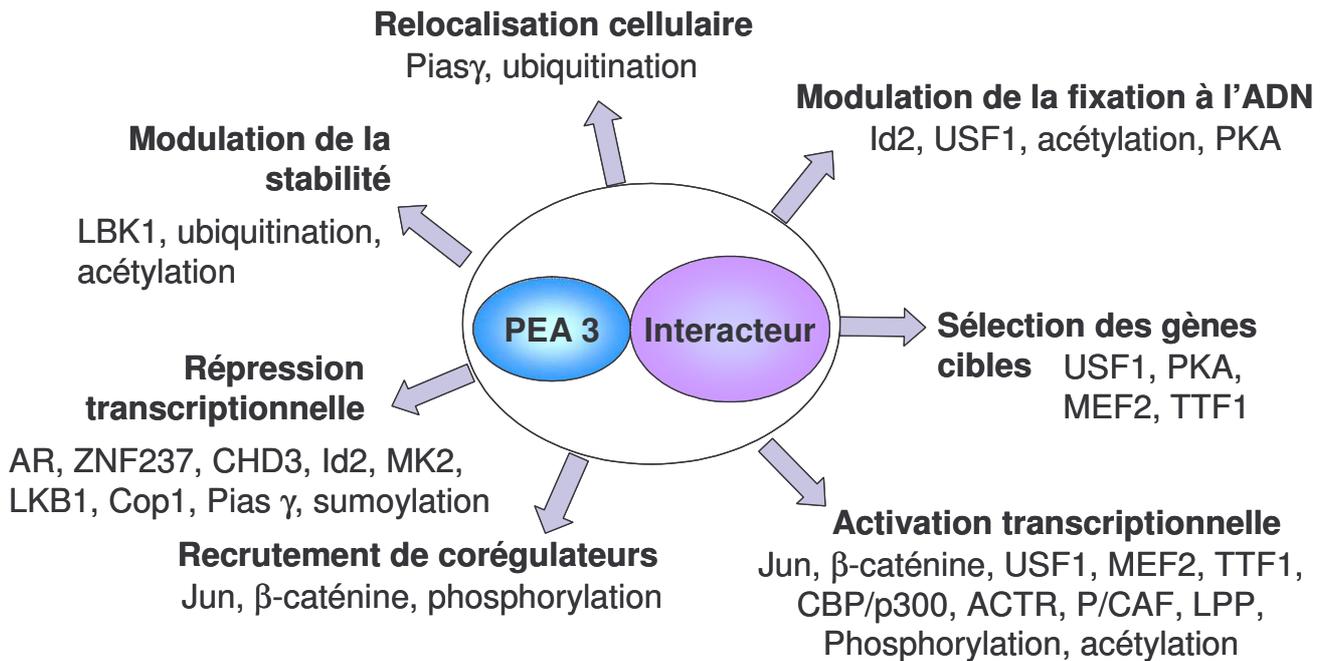


Figure 22 : La régulation de l'activité transcriptionnelle des membres du groupe PEA3 par leurs interacteurs.

L'identification de partenaires protéiques des membres du groupe PEA3 a permis de mieux appréhender des processus régulant leur activité transcriptionnelle ce qui montre donc l'intérêt de rechercher de nouveaux partenaires de ces facteurs de transcription. Avant mon arrivée au laboratoire, une recherche de partenaires pour le facteur de transcription ERM a été menée par l'utilisation du système double hybride chez la levure. Le domaine d'ERM utilisé pour l'expérience était la région couvrant les résidus 73 à 370. Cette région ne contient ni les domaines transactivateurs (TAD) de la protéine ni le domaine ETS, choix lié à la nécessité d'utiliser une protéine appât transcriptionnellement inactive et à la volonté d'obtenir des partenaires spécifiques d'ERM par l'élimination des régions les plus conservées dans les protéines de la famille ETS. Une banque d'ADNc humains issus de la rétrotranscription des ARN messagers isolés de la glande mammaire a été criblée en utilisant ce domaine. Le fragment résultant n'a hélas permis l'identification que de quelques protéines. Parmi celles-ci, se trouvait Ubc9, l'enzyme E2 de conjugaison de SUMO (Degerny et al., 2005). La découverte de cet interacteur a toutefois permis d'ouvrir la voie de la sumoylation et de la mise en évidence de l'inhibition de l'activité transcriptionnelle d'ERM par cette modification post-traductionnelle (Degerny et al., 2005). Mon travail de thèse a donc consisté à rechercher de nouveaux partenaires d'ERM qui modulent son activité transcriptionnelle. Pour cela, j'ai utilisé des techniques différentes : basées sur des aspects plus biochimiques et permettant de travailler avec différents domaines de la protéine quelle que soit leur fonctionnalité.

RESULTATS

Résultats

I Recherche de partenaires protéiques d'ERM

Afin d'isoler les partenaires du facteur de transcription ERM, nous avons utilisé différentes techniques de purification par chromatographie d'affinité : des purifications d'affinité en tandem (TAP pour Tandem Affinity Purification) ainsi que des méthodes dérivées du GST pull-down utilisant la protéine ERM fusionnée soit à la Glutathione S-Transférase (GST) soit à un peptide biotinylable.

A Purifications d'affinité en tandem

1 Présentation

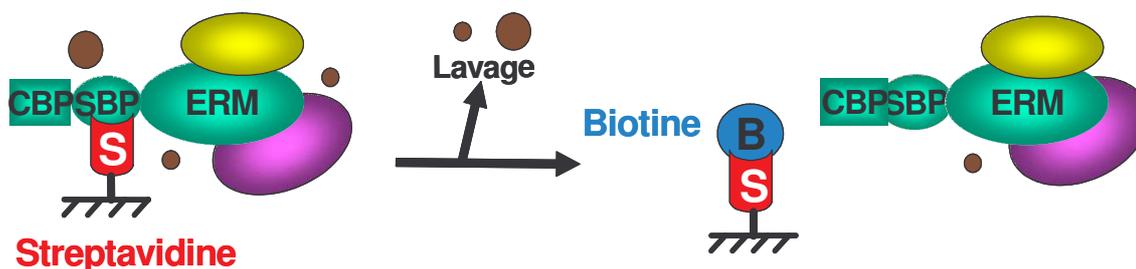
Notre but était de purifier les complexes protéiques associés à ERM dans la cellule afin de mieux appréhender les mécanismes moléculaires qui contrôlent l'activité et le devenir de ce facteur de transcription. La purification des complexes multiprotéiques associés à ERM dans le contexte cellulaire requiert certaines conditions. Le système de purification doit posséder une forte affinité et une forte spécificité vis-à-vis d'ERM. De plus, pour conserver l'intégrité de ces complexes, il est primordial de travailler dans des conditions chimiques « douces » permettant de maintenir les interactions protéiques. Enfin, l'élution des complexes doit être performante et non dénaturante afin de les obtenir facilement et intègres. La technique de purification par chromatographie d'affinité en tandem (Puig et al., 2001) (Dziembowski and Seraphin, 2004) répond bien à ces trois critères. Cette méthode a déjà permis la purification de complexes transitoires (Puig et al., 2001) et l'identification de nombreuses protéines associées directement ou indirectement aux protéines « appâts » (20 à 100 protéines selon les études (Bouwmeester et al., 2004; Dziembowski and Seraphin, 2004; Gavin et al., 2002)). Elle nécessite l'utilisation d'une protéine cible (ERM dans le cas présent) doublement étiquetée, ce qui permet deux étapes successives de purification limitant ainsi l'entraînement de faux positifs.

Dans un premier temps, nous avons utilisé le système de purification TAP classique mis au point par l'équipe de Séraphin (Puig et al., 2001) utilisant comme étiquette, la protéine A séparée du CBP (*Calmodulin Binding Peptide*) par un site de clivage par la protéase TEV (Tobacco Etch Virus). La première étape de purification est réalisée grâce à la protéine A qui peut être purifiée par les Immunoglobulines G et dont l'élution nécessite la présence du site de clivage de la protéase TEV. La deuxième étape de purification utilise le CBP qui interagit, en présence de calcium, avec la calmoduline fixée sur une résine et qui peut être élué par un chélateur du calcium tel que l'EGTA (Acide glycoléthylènediamine tétraacétique).

	CBP	SBP
Taille	26 AA	38 AA
Résine d'affinité	Calmoduline	Streptavidine
Condition d'éluion	EGTA	Biotine

Figure 23 : Caractéristiques du couple d'étiquettes SBP-CBP

• 1ère purification : Streptavidin Binding Peptide



• 2ème purification : Calmodulin Binding Peptide

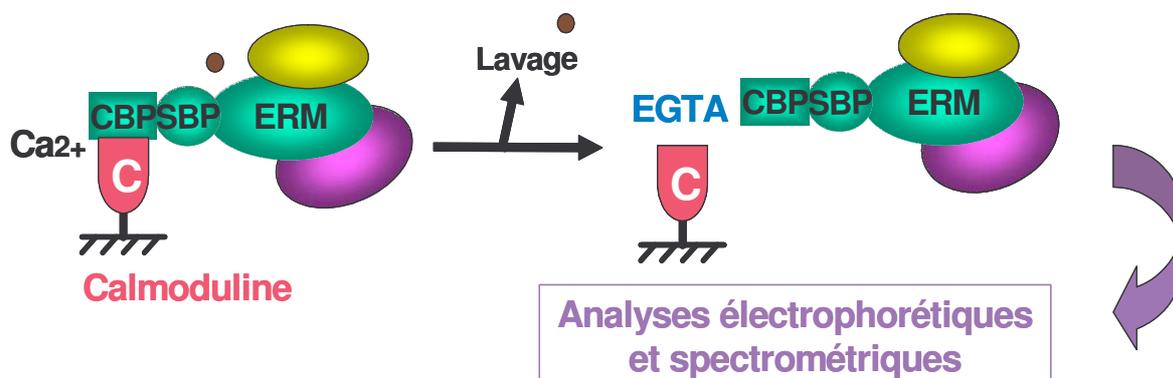


Figure 24 : Représentation schématique des étapes de la Purification d’Affinité en Tandem utilisant les étiquettes CBP-SBP

Les ovales jaune et rose représentent des complexes associés à ERM. Les ronds marron représentent les contaminants.

Résultats

Des expériences préliminaires, effectuées dans plusieurs lignées cellulaires, ont clairement démontré que, contrairement à la construction étiquetée à l'extrémité C-terminale, celle étiquetée à l'extrémité N-terminale était produite dans les cellules (résultats non illustrés). Nous avons donc utilisé des extraits cellulaires totaux obtenus par la lyse des cellules exprimant cette construction afin de tester la capacité des différents supports à piéger cette protéine de fusion. Après clivage par la TEV, nous avons malheureusement observé qu'une quantité importante de la protéine clivée restait associée aux billes. Ne sachant pas résoudre de façon optimale le clivage de la protéine de fusion par la TEV, nous avons eu recours à une étiquette autre que la protéine A. Nous avons choisi le SBP (*Streptavidin Binding Peptide*) (Keefe et al., 2001), qui peut être purifié par de la streptavidine fixée sur une résine et élué par l'addition de biotine. Cette étiquette a été sélectionnée en raison de sa petite taille (38 AA), de sa forte affinité pour son ligand (de l'ordre du nM) et de son élution performante et rapide par la biotine (Figure 23).

Ce couple d'étiquettes permet de réaliser une purification en tandem dont les étapes sont schématisées dans la figure 24. L'étiquetage pouvant se réaliser à chacune des extrémités de la protéine, deux types de constructions ont été sélectionnés en juxtaposant les deux étiquettes en position soit N-terminale (CBP-SBP-ERM) soit C-terminale (ERM-SBP-CBP) de façon à conserver l'intégrité de l'une ou l'autre des extrémités d'ERM, chacune pouvant être impliquée dans des interactions protéiques. Ces constructions réalisées dans le cadre de mon Master Recherche ont été exprimées constitutivement dans des lignées cellulaires (MDA-MB-231, U2OS, HeLa) suite à une infection rétrovirale. Nous avons vérifié que les étiquettes étaient sans incidence sur des propriétés connues d'ERM telles que la demi-vie, la localisation nucléaire, l'activité transcriptionnelle et la capacité à être sumoylée et donc *a priori* sans incidence sur sa capacité à interagir avec les complexes protéiques le régulant.

Afin de vérifier que la méthode d'extraction conservait les interactions protéine-protéine et donc les complexes contenant ERM, des chromatographies d'exclusion (ou gel filtration) ont été réalisées à partir d'extraits nucléaires de MDA-MB-231 (exprimant naturellement ERM et ER81) afin d'identifier les fractions contenant ERM et donc d'appréhender la taille des complexes auxquels ERM est associée lors de l'extraction nucléaire. Comme on peut le voir sur la figure 25, ERM, ER81 et CBP-SBP-ERM sont retrouvées dans les mêmes fractions, celles-ci variant de 100 kDa à au moins 1300 kDa. Il faut noter que le profil d'élution d'ERM et ER81 en absence de CBP-SBP-ERM est identique à celui observé dans le cas présent (donnée non montrée). La méthode d'extraction nucléaire que nous avons utilisée permet donc de conserver CBP-SBP-ERM associé à des complexes situés dans la même gamme de masse moléculaire que ceux formés par les

Résultats

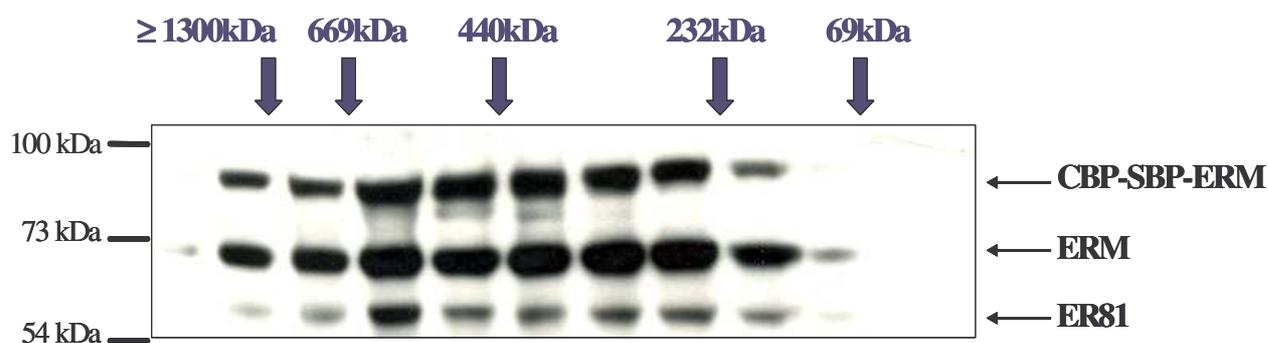


Figure 25: Séparation par chromatographie d'exclusion d'extraits nucléaires de cellules MDA-MB-231 exprimant constitutivement CBP-SBP-ERM

Les cellules MDA-MB-231 exprimant constitutivement CBP-SBP-ERM ont été mises en contact avec un tampon hypotonique (10mM Tris HCl pH 7.4, 25mM NaCl, 2mM MgOAc) contenant 0.05% de NP40. Après 5 minutes d'incubation, les cellules lysées ont été centrifugées 10 minutes à 1000g et le culot a été repris avec un tampon hypertonique (50mM Hepes pH 7.9, 250mM NaCl, 1mM EGTA, 1mM DTT) contenant 0.1% de NP40. Après 2 heures d'incubation, le lysat est centrifugé 1 heure et demie à 100000g, le surnageant contenant les protéines nucléaires. Ces dernières ont été séparées par chromatographie d'exclusion sur une colonne Superdex 200 à l'aide du système AKTA d'Apbiotech. Les protéines des différentes fractions ont ensuite été séparées par électrophorèse puis révélées avec l'anticorps anti-ERM de souris. La présence d'ER81 révélée par l'anticorps anti-ERM a été confirmée par réhybridation avec un anticorps anti-ER81.

Résultats

membres du groupe PEA3 endogènes présents dans les extraits. Nous constatons également que ces trois protéines sont quasiment absentes des fractions dans lesquelles on devrait les retrouver de par leur masse moléculaire propre (60-90 kDa). Nous pouvons donc supposer que, comme cela a été décrit pour d'autres facteurs de transcription (Korenjak et al., 2004), les membres du groupe PEA3 sont majoritairement associés à d'autres molécules dans un contexte cellulaire normal. Nous avons également réalisé des expériences de chromatographie d'exclusion à partir de cellules HeLa exprimant de manière constitutive la construction CBP-SBP-ERM. Le profil d'élution de cette protéine de fusion dans les cellules HeLa est similaire à celui observé précédemment dans les cellules MDA-MB-231 (donnée non montrée). Ces données semblent donc exclure une modification importante de la répartition des complexes en fonction du type cellulaire étudié pour une construction donnée.

Nous avons aussi établi le profil de séparation d'ERM-SBP-CBP dans les cellules HeLa et constaté qu'il n'est pas superposable à celui obtenu pour CBP-SBP-ERM. On observe en effet une diminution des complexes de haute masse moléculaire et une augmentation des complexes dans les fractions inférieures à 232 kDa (donnée non montrée). La position de l'étiquette à l'extrémité C-terminale semble donc perturber une partie des interactions d'ERM bien que les propriétés d'ERM testées (demi-vie, localisation nucléaire, activité transcriptionnelle et la sumoylation) ne soient pas altérées. Néanmoins, il est possible que les complexes en cause interviennent dans des processus que nous n'avons pas évalués tels que l'acétylation ou la phosphorylation qui peuvent réguler la formation de certains complexes (Li et al., 2000) ou encore d'autres processus pour le moment inconnus. Il est également possible que ces complexes existent dans la cellule avec une interaction plus faible en raison du positionnement des étiquettes ce qui entraîne leur dissociation au cours de la préparation des extraits.

Nous avons décidé de nous concentrer sur la construction CBP-SBP-ERM qui présente un profil de séparation similaire à celui obtenu pour la protéine endogène afin d'optimiser les étapes de purification.

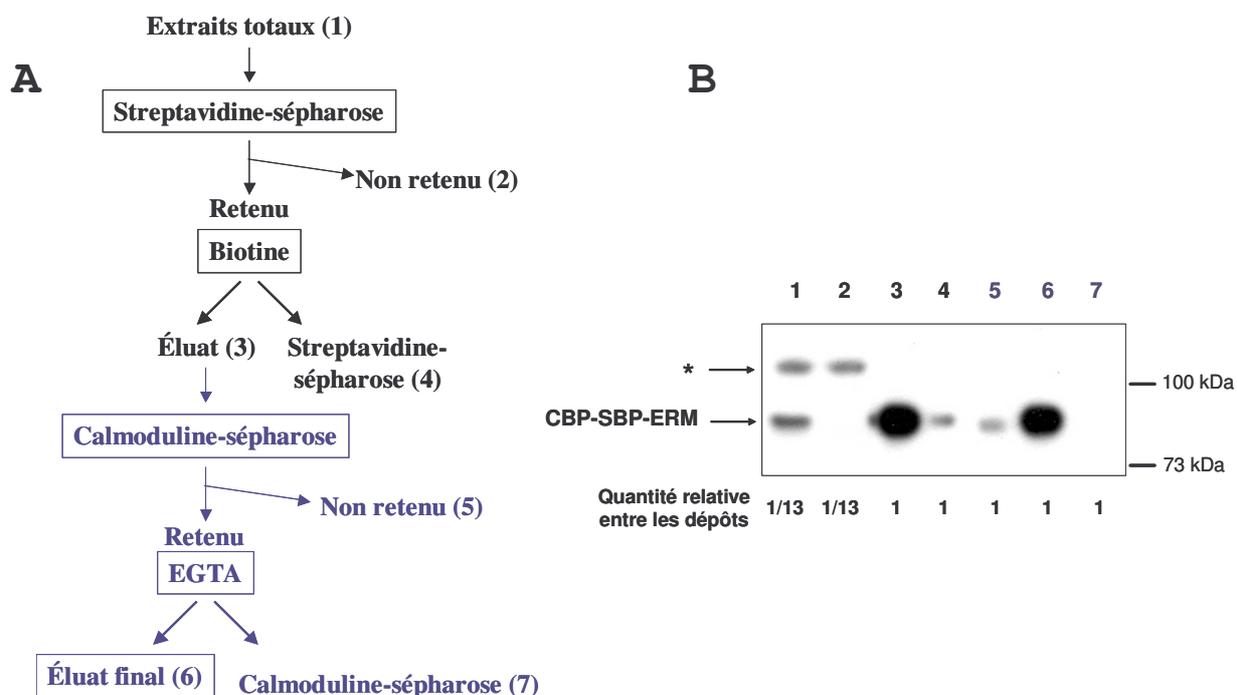


Figure 26 : Les différentes étapes de la purification de CBP-SBP-ERM à partir d'extraits nucléaires de cellules HeLa

A Représentation schématique des étapes de la purification de CBP-SBP-ERM et des différentes fractions testées. Le chiffre entre parenthèses correspond aux fractions testées en B.

B Des extraits nucléaires de cellules HeLa exprimant CBP-SBP-ERM ont été soumis à la purification TAP puis analysés par Western blot et révélés par le sérum polyclonal de souris anti-ERM. Les fractions sont indiquées en haut du gel, la quantité relative des dépôts en bas. * = protéines inconnues reconnues par le sérum

1 Extrait de départ (1/2000) ; 2 post streptavidine (1/2000) ; 3 élution après biotine (1/150) ; 4 billes streptavidine après biotine (1/150) ; 5 post calmoduline (1/150) ; 6 élution calmoduline (1/150) ; 7 billes calmoduline après EGTA (1/150) (Proportion du total déposée)

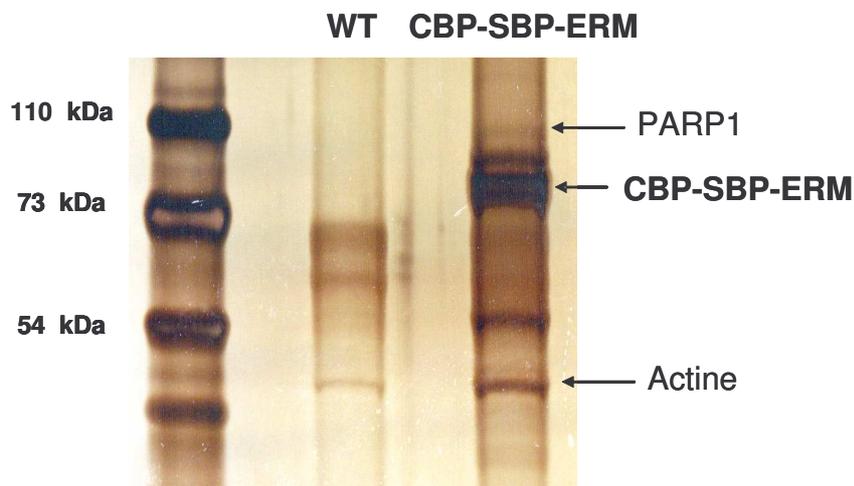


Figure 27 : Séparation par SDS-PAGE et coloration au nitrate d'argent des protéines issues de la purification en tandem d'extraits de cellules HeLa sauvages (WT) ou exprimant CBP-SBP-ERM.

La purification a été réalisée à partir d'environ 500 mg d'extraits nucléaires (900 millions de cellules HeLa) de cellules exprimant la protéine de fusion (CBP-SBP-ERM) ou non (WT). Les produits de purification ont été précipités par du TCA et séparés sur un gel en gradient 8-15% d'acrylamide. Le gel a été coloré par une coloration argentique compatible avec l'identification des protéines par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

2 Résultats obtenus

Un exemple de purification optimisée est présenté dans la figure 26. Lorsque des extraits nucléaires de cellules HeLa exprimant CBP-SBP-ERM (Piste 1, Figure 26) sont mis en contact avec le support streptavidine, la protéine de fusion se fixe quasi-totalement sur les billes (Piste 1 versus 2). Après lavages, l'ajout de biotine sur les billes de streptavidine permet son élution (Piste 3) et seule une très faible quantité de la protéine CBP-SBP-ERM reste associée aux billes (Piste 4). Cet éluat est ensuite mis en contact avec les billes de calmoduline en présence de calcium. Bien que nous ayons testé différents temps d'incubation et différents tampons, une faible quantité de la protéine CBP-SBP-ERM ne se fixe pas sur les billes de calmoduline (Piste 5). Après lavages, l'ajout d'EGTA permet de récupérer la quasi-totalité de la protéine CBP-SBP-ERM (Piste 6), celle-ci n'étant plus détectable sur les billes après élution (Piste 7). Nous avons estimé obtenir un rendement de l'ordre de 90% pour la première étape de purification et de l'ordre de 60% pour la purification par le CBP. Les rendements obtenus étaient donc suffisants pour envisager la purification des partenaires protéiques d'ERM. Ainsi les protéines co-purifiées avec ERM ont été séparées par la technique du gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) et leur identification a été faite par spectrométrie de masse MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Time of Flight*).

Malheureusement, très peu d'interacteurs ont été retrouvés associés à ERM lors de l'élution finale. Dans cette élution (Figure 27), nous observons une « sur-représentation » d'ERM sur les gels analysés au MALDI-TOF et seuls PARP1 (PolyADP-Ribose Polymerase I) et la β -actine ont été identifiés (Figure 30).

Afin d'éliminer cette forte représentation d'ERM dans les éluats, nous avons utilisé d'autres étiquettes permettant d'exclure la protéine ERM de l'éluat final après rupture des interactions protéiques par un détergent doux tel que le sarcosyl. Malgré l'utilisation de différents couples d'étiquettes (SBP-6xHis, CBP-Peptide de biotinylation), nous n'avons pu purifier que des quantités trop faibles de protéines associées à ERM. Dans ces conditions, nous avons eu recours à des stratégies alternatives afin de pallier ces problèmes.

Résultats

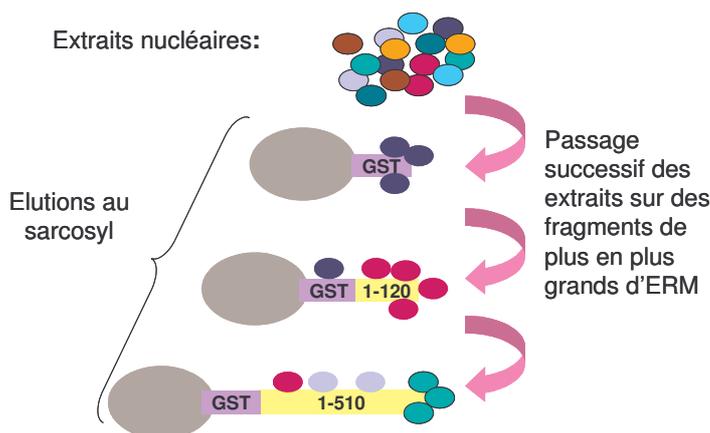


Figure 28 : Purifications successives sur des supports de GST-ERM

Des extraits nucléaires de cellules HeLa ou MDA-MB-231 ont été mis en contact avec les billes chargées en ERM plus ou moins délétée. Après lavages, les protéines qui se sont fixées à ERM sont éluées par une solution tamponnée contenant une faible dose de sarcosyl.

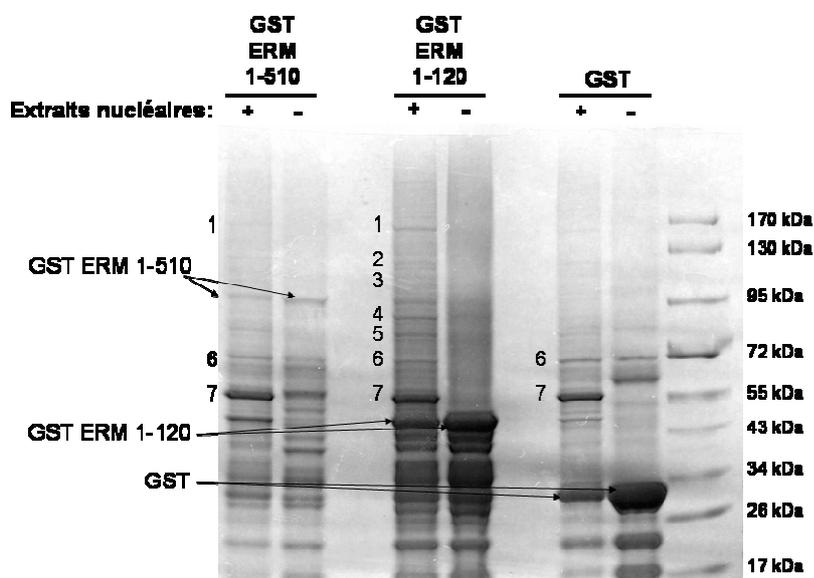


Figure 29 : Exemple de coloration au coomassie des protéines issues de la purification sur des supports de GST ERM séparées par SDS-PAGE.

La purification a été réalisée à partir d'environ 100 mg d'extraits nucléaires (200 millions de cellules HeLa). Les cellules ont été mises en contact avec un tampon hypotonique (10 mM HEPES KOH à pH 7.9, 10 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.1% NP40) pendant 5 minutes. Après centrifugation, le culot a été repris dans le tampon benzonase (20 mM Hepes à pH 8, 150 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.1% NP40) et digéré par la benzonase à 16°C. Après 2 heures d'incubation, le lysat est centrifugé 1 heure à 100000g, le surnageant contenant les protéines nucléaires est alors mis en contact pendant deux heures avec les protéines GST. Les protéines fixées à la GST (GST), à la construction GST-ERM 1-120 contenant les 120 premiers acides aminés d'ERM (1-120) ou à la construction GST-ERM de pleine longueur (1-510) ont été éluées par une solution tamponnée contenant une faible dose de sarcosyl, séparées par SDS-PAGE puis analysées par spectrométrie de masse MALDI-TOF et identifiées par comparaison avec les banques de données.

- 1: MED23
- 2: Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 1
- 3: MED15
- 4: HSD17B4
- 5: HSP70
- 6: HSP 60
- 7: Eukaryotic Translation elongation factor 1 γ

B Purifications sur des supports de GST-ERM

1 Présentation

Nous avons utilisé une méthode dérivée du GST pull-down ou co-rétention protéique (Suzuki et al., 2003). Pour ce faire, nous avons produit dans un système bactérien la protéine ERM, entière ou délétée, fusionnée à la GST. Cette protéine de fusion est ensuite fixée à des résines de Glutathion. Des extraits nucléaires de différents types cellulaires sont alors mis en contact avec les supports chargés en GST-ERM. L'extraction nucléaire est réalisée en présence de benzonase, une enzyme qui digère l'ADN et l'ARN afin de ne pas être contaminé par des protéines entraînées par les acides nucléiques. Au préalable, nous épuisons les extraits nucléaires sur des résines de glutathion puis des supports de glutathion chargés en GST afin d'éliminer les protéines « parasites » se fixant sur la GST ou sur le support et qui n'interagissent donc pas avec ERM. Les extraits sont ensuite passés successivement sur des protéines de fusion GST contenant des fragments d'ERM de taille croissante afin d'épuiser progressivement les extraits (figure 28). Après lavages, les protéines fixées sont éluées par une faible dose de sarcosyl puis sont séparées par SDS-PAGE, analysées par spectrométrie de masse MALDI-TOF et identifiées par comparaison avec les banques de données.

2 Résultats obtenus

Le résultat d'une expérience représentative est présenté dans la figure 29. Dans ce cas précis, sept protéines ont été identifiées dont deux interagissant avec le support GST. Globalement onze candidats interacteurs d'ERM ont été identifiés au moins deux fois par l'utilisation de cette technique (voir tableau 8 page 92). Toutefois, même en appauvrissant les extraits avec la GST-ERM 1-120, nous retrouvons une partie de ces mêmes protéines fixées sur la GST-ERM 1-510. De plus, cette technique n'a pas permis de mettre en évidence de façon reproductible des partenaires se fixant sur la GST ERM 1-510 sans se fixer sur la GST ERM 1-120. De plus, comme le montre la figure 29, l'élué par une faible dose de sarcosyl entraîne la perte d'une faible quantité de protéine GST ce qui explique la présence de nombreux contaminants pouvant masquer les partenaires potentiels. La spectrométrie de masse MALDI TOF ne détectant alors pratiquement que la présence d'ERM, dont les peptides étaient bien plus abondants que les peptides des interacteurs recherchés. Nous nous sommes donc orientés vers une technique de purification alternative.

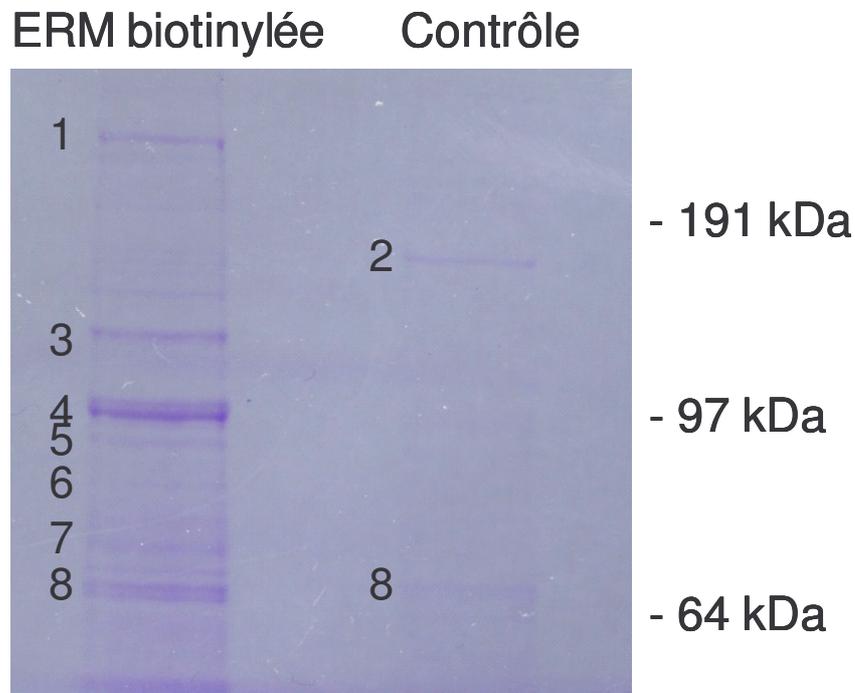


Figure 30 : Exemple de coloration au coomassie des protéines issues de la purification sur des supports d'ERM 1-370 biotinylée séparées par SDS-PAGE.

La purification a été réalisée à partir d'environ 100 mg d'extraits nucléaires (200 millions de cellules HeLa). Les protéines fixées au support contrôle (contrôle) ou au support ERM biotinylée ont été éluées par une solution tamponnée contenant une faible dose de sarcosyl, séparées par SDS-PAGE puis analysées par spectrométrie de masse MALDI-TOF et identifiées par comparaison avec les banques de données.

- 1: CBP
- 2: Pyruvate carboxylase
- 3: Zinc finger RNA binding protein putative
- 4: hnRNP U
- 5: SFPQ
- 6: MED25
- 7: CoAA
- 8: Methylcrotonyl coenzyme A carboxylase 2

C Purifications sur des supports de ERM biotinylé

1 Présentation

Afin de remédier à la perte de l'appât lors de l'élution, nous avons remplacé la GST par un peptide contenant un site biotinylable nommé BAP. Ce site est reconnu et biotinylé par l'enzyme d'origine bactérienne BirA. La protéine BAP-ERM 1-370 est produite en bactérie (*E. Coli*) conjointement à la protéine BirA : Le site BAP permet la biotinylation par cette enzyme de la protéine chimérique dans la bactérie. La protéine ERM biotinylée est ensuite purifiée sur des supports de streptavidine (Laitem et al., 2008). L'affinité d'une protéine biotinylée pour de la streptavidine est de l'ordre de 10^{-13} M, cette liaison est donc quasiment irréversible. Ceci permet à la protéine biotinylée de rester stablement fixée sur le support de streptavidine lors de l'élution des partenaires potentiels par une faible dose d'un détergent comme le sarcosyl. Les purifications ont été menées comme précédemment : des extraits nucléaires de différents types cellulaires sont épuisés sur des résines de streptavidine qui ont été chargées en extraits bactériens exprimant BirA (support contrôle). Ces extraits sont ensuite mis en contact avec les supports chargés en ERM biotinylée. Après lavages, les partenaires protéiques sont élués par une solution tamponnée contenant une faible dose de sarcosyl, séparés par SDS-PAGE puis analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF et identifiés par comparaison avec les banques de données.

2 Résultats obtenus

Le résultat d'une expérience représentative est présenté figure 30. Dans ce cas précis, huit protéines ont été identifiées dont deux sur le support contrôle. Ces deux protéines sont des protéines cellulaires connues pour fixer la biotine (St Maurice et al., 2007) (Baldet et al., 1992)(Figure 30, numéros 2 et 8). Globalement neuf candidats interacteurs d'ERM ont été identifiés au moins deux fois par l'utilisation de cette technique. Parmi ceux-ci cinq avaient déjà été identifiés précédemment. L'ensemble de ces interacteurs est présenté dans le tableau 8.

Résultats

Nom	Nombre d'identifications par			Nom complet et fonction
	TAP	GST	Biot	
β-Actine	2			Protéine du cytosquelette Rôle dans la transcription
CBP			2	CREB-binding Protein Co-activateur possédant une activité Histone Acétyl-Tranférase
CoAA		1	4	CoActivator Activator Coactivateur transcriptionnel de TRBP et SYT et rôle dans l'épissage alternatif Surexprimé dans certains cancers
eEF-1γ		2		Eukaryotic Translation elongation factor 1 γ
hnRNP U			3	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U impliquée dans l'organisation de la chromatine et dans la régulation transcriptionnelle
HSD17B4		2		17 beta Hydroxysteroid dehydrogenase 4 oxydo-réductase impliquée dans la stéroïdogénèse, cytoplasmique
Hsp 70		5		Heat shock protein 70kda Protéine chaperonne qui promeut la survie cellulaire en inhibant l'apoptose
Kap1			2	KRAB-associated protein 1 ou TIF-1β corépresseur nucléaire
Matrin3		2		Protéine de la matrice nucléaire contenant un domaine de fixation Ca ²⁺ /calmodulin
MED15		2		Ou Gal11 ou ARC 105 Protéine du complexe Médiateur (complexe multiprotéique modulant l'activité de la polymérase II)
MED23		3		Ou DRIP 130 ou TRAP 150 Protéine du complexe Médiateur Délétée dans certains cancers
MED25		3	1	Ou ARC 92 Protéine du complexe Médiateur
MybBP1a			3	MYB binding protein 1a Interagit avec différents facteurs de transcription Myb, c-Jun, PGC-1α et NFKB
PARP1	1		3	PolyADP-Ribose Polymerase I Impliquée dans la réparation de l'ADN Rôle dans la transcription
RNA helicase II/Gu protein		1	2	Ou DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 21 Rôle potentiel dans la synthèse des ARNr, dans le transport des ARN et peut être dans la transcription
SFPQ		1	2	Splicing factor praline/gluyamine rich ou polypyrimidine tract binding protein associated (PSF) Rôle dans l'épissage et dans la transcription
Sp100		2		Staphylococcal nuclease domain-containing protein 100 ou EBNA-2 co-activator p100 Coactivateur transcriptionnel d'EBNA2, de STAT5 et STAT 6

Tableau 8 : Récapitulatif des partenaires protéiques potentiels d'ERM identifiés par les différentes techniques de purification.

Le nombre indiqué représente le nombre de purifications indépendantes dans lesquelles la protéine a été identifiée avec une probabilité supérieure à 95%.

D Tableau récapitulatif des partenaires potentiels d'ERM trouvés lors des purifications

Le Tableau 8 présente l'ensemble des protéines identifiées de façon formelle (probabilité > 95%) dans au moins deux purifications indépendantes et étant absentes de la purification contrôle. De façon intéressante, ces purifications n'ont permis d'identifier qu'un seul partenaire déjà connu d'ERM : le coactivateur CBP (Baert, données non publiées).

L'utilisation des différentes techniques de purification a permis d'identifier 17 candidats pouvant représenter des interacteurs d'ERM. Certaines de ces protéines telles que CoAA ou PARP1 ont été retrouvées dans plusieurs techniques de purifications, c'est un élément qui laisse penser que ces interactions sont probablement spécifiques. Au sein de cette liste, nous avons sélectionné ceux qui semblaient les plus pertinents à étudier. Ce choix s'est fait grâce à la bibliographie disponible au moment de leur identification et sur base de critères tels que leur localisation cellulaire. En effet, ERM étant localisée dans le noyau, nous n'avons pas retenu les protéines non-nucléaires telles que HSD17B qui est localisée dans les peroxysomes (Markus et al., 1995). Nous avons également privilégié les protéines qui étaient déjà décrites comme ayant une implication ou une expression altérée dans les cancers et/ou connues pour être impliquées dans la régulation de l'activité de facteurs de transcription.

E Validation des interactions

Pour confirmer une interaction directe entre ERM et les protéines candidates, nous avons réalisé des expériences de GST pull-down. Pour cela, nous avons traduit les partenaires potentiels en lysats de réticulocytes de lapin. Les lysats de réticulocytes sont ensuite mis en contact avec les protéines GST-ERM ou GST seule fixées sur un support de glutathion-sépharose afin d'observer si la fixation est spécifiquement due à ERM.

Les protéines CoAA, Sp100, MybBP, PARP1 ainsi que les protéines du Médiateur MED15, MED23 et MED25 ont été testées par cette technique. Comme l'illustre la figure 31, CoAA, PARP1, MED23 et MED25 interagissent spécifiquement avec la fusion ERM et non avec la protéine GST seule.

Le résultat observé pour PARP1 traduit une interaction directe mais faible avec ERM. Nous avons donc décidé de nous focaliser sur les interacteurs possédant une affinité forte à savoir CoAA et les protéines appartenant au complexe Médiateur MED23 et MED25.

Résultats

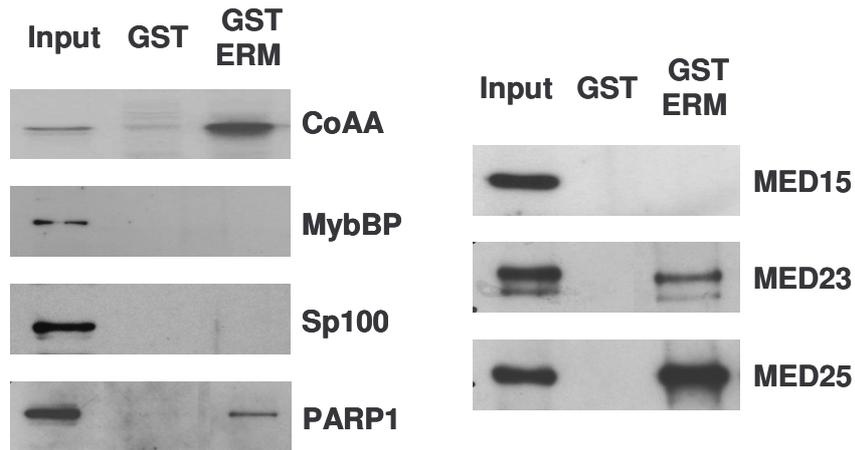


Figure 31 : ERM interagit *in vitro* avec CoAA, PARP1, MED23 et MED25

Les partenaires potentiels sont produits *in vitro* en lysats de réticulocytes. Le lysat exprimant ces protéines est mis en contact avec les protéines GST et GST-ERM immobilisées sur des billes de glutathion-sépharose. L'input correspond à 10% du lysat mis en contact avec les billes. La présence des partenaires est détectée par western blot grâce à la présence d'une étiquette Flag ou HA.

II ERM et le complexe médiateur

A Présentation du médiateur

Initialement, le complexe médiateur (MED) a été purifié en levure par l'équipe de Kornberg grâce à son activité requise pour le fonctionnement des activateurs dans des systèmes de transcription *in vitro* (Kim et al., 1994). La même équipe ainsi que d'autres ont également montré que ce complexe fixait non seulement les domaines de transactivation des facteurs de transcription (Hengartner et al., 1995) mais aussi l'ARN polymérase II pour former l'« holoenzyme » (Kim et al., 1994; Koleske and Young, 1994). Ainsi, MED est un très gros complexe multi-protéique qui sert d'interface dynamique entre les facteurs de transcription spécifiques et l'ARN polymérase II (Pol II) (Conaway et al., 2005). Il régule la transcription en intégrant les signaux entre les facteurs activateurs fixés sur les enhancers ainsi que sur les éléments en amont du promoteur et la machinerie transcriptionnelle basale (Pol II + Facteurs de transcription généraux) située au niveau du promoteur proximal ((Blazek et al., 2005), figure 32).

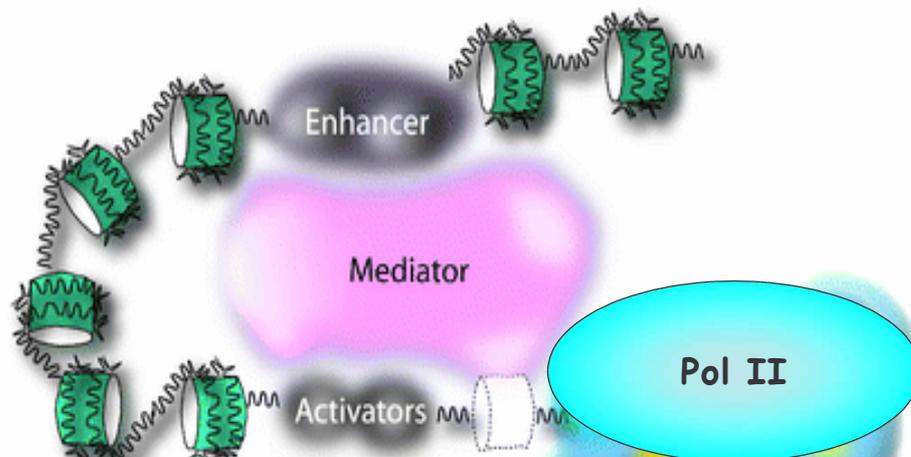


Figure 32 : Le rôle du médiateur

Le médiateur permet de relier les facteurs de transcription fixés sur les enhancers et les éléments en amont du promoteur avec la machinerie transcriptionnelle basale située au niveau du promoteur proximal. La machinerie transcriptionnelle est composée de l'ARN polymérase II (Pol II) et des facteurs de transcription généraux. Par souci de simplicité seule le Pol II a été représentée sur le schéma. Adapté de (Blazek et al., 2005)

Ce complexe a également une capacité intrinsèque (sans besoin d'activateur) de stimuler la transcription basale (Blazek et al., 2005). Le complexe médiateur est donc nécessaire à la régulation de la transcription comme le laisse penser une diminution de l'expression de 93% des gènes de la levure lors de l'inactivation de l'une de ses sous-unités importantes (Holstege et al., 1998). Néanmoins, une récente étude d'immunoprécipitation de

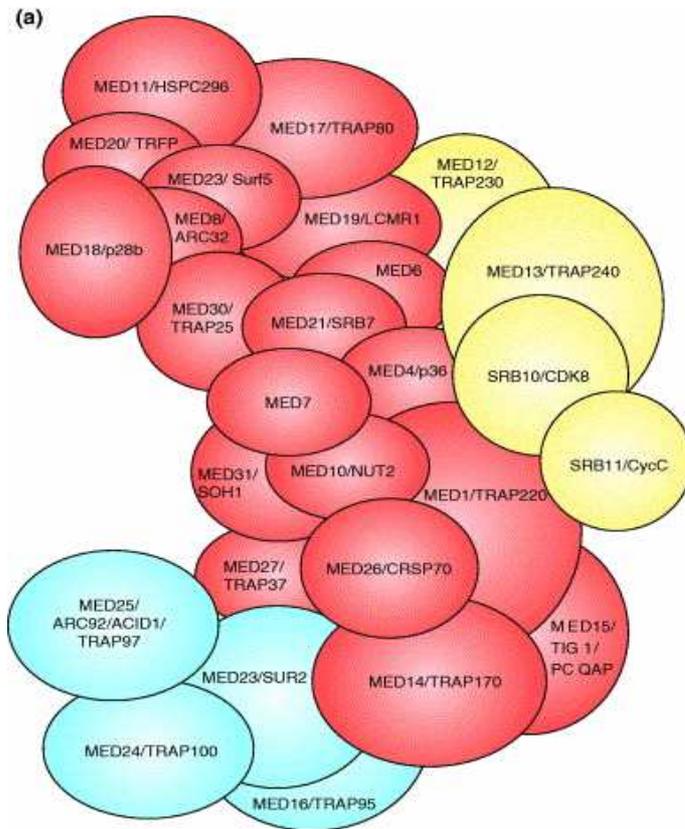


Figure 33 : La structure du médiateur.

Les sous-unités représentées en rouge constituent le « core » du médiateur. Les sous-unités bleues correspondent au module MED16/MED23/MED24/ MED25, celles représentées en jaune font partie du module kinase, d'après (Malik and Roeder, 2005).

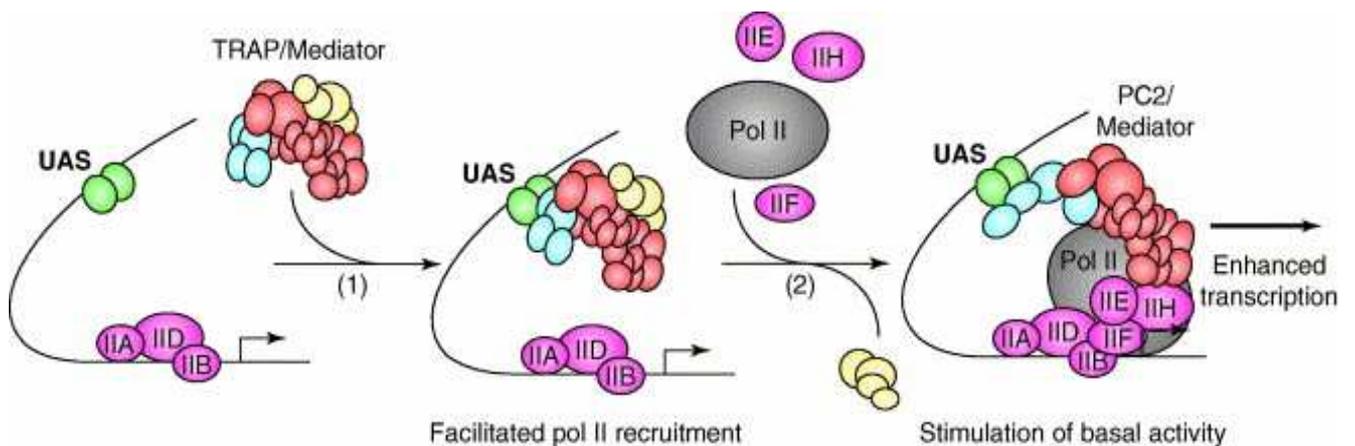


Figure 34 : Modèle d'activation de la transcription par le médiateur, d'après (Malik and Roeder, 2005)

UAS : séquence d'activation située en aval

TFIIA, FIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF et TFIIH : facteurs généraux de la transcription

Les sous-unités du médiateur sont représentées selon le code couleur de la figure 33.

Résultats

la chromatine chez la levure tend à montrer que ce complexe ne se fixerait que sur un nombre limité de promoteurs et de façon spécifique suite à un stress ou pour un activateur donné (Fan and Struhl, 2009).

Suite à son identification chez la levure, des complexes du même type ont été identifiés dans des cellules de différents organismes eucaryotes par des approches variées. Chez les Mammifères, nous pouvons ainsi citer les complexes TRAP/SMCC (thyroid hormone receptor-associated proteins/SRB-Med containing cofactor) (Gu et al., 1999) (Fondell et al., 1999) (Ito et al., 1999) (Malik et al., 2000), ARC-L (activator-recruited factor-large) (Naar et al., 1999) (Taatjes et al., 2002), DRIP (vitamin D receptor-interacting proteins) (Rachez et al., 1999), PC2 (positive cofactor 2) (Malik et al., 2000) ou encore CRSP (cofactor required for Sp1 activation) (Ryu et al., 1999; Taatjes et al., 2002). Ces complexes présentent des sous-unités communes mais également des sous-unités plus ou moins spécifiques de certains complexes. Ces différences peuvent refléter la présence de complexes existant sous différentes formes ou être dues à des méthodes de purifications plus ou moins drastiques. Néanmoins, ces purifications ont permis de révéler que le médiateur est exprimé de façon ubiquiste et que sa structure et sa fonction sont conservées de la Levure à l'Homme.

Le complexe médiateur de mammifère comporte 25 à 30 sous-unités (Figure 33). Ces sous-unités peuvent posséder plusieurs noms selon les complexes dans lesquels elles ont été identifiées. Bourbon a proposé une nomenclature attribuant un nom unique à chaque sous-unité. Cette appellation, qui sera utilisée dans ce manuscrit consiste en un préfixe « MED » et un numéro de 1 à 31. Au sein du médiateur, les différentes sous-unités sont réparties en différents sous-ensembles : le « core », qui est retrouvé dans toutes les purifications (sous-unités rouges, Figure 33), s'associe avec différents groupes de sous-unités constituant divers modules : le module kinase CDK8/Cycline C/MED12/MED13 » ayant un rôle répresseur (sous-unités jaunes) et le module MED16/MED23/MED24/MED25 » (sous unités bleues) permettant l'interaction avec le facteur de transcription situé sur l'enhancer (Malik and Roeder, 2005). Des études structurales ont permis de démontrer que les sous-unités du « core » peuvent être divisées en sous-modules désignés sous les termes de tête, milieu et queue : les composants de la tête permettent l'interaction avec la Pol II, ceux de la queue forment une plateforme pour les interactions avec les régulateurs spécifiques de certains gènes et ceux du milieu sont impliqués dans le transfert des signaux de régulation positive ou négative (Casamassimi and Napoli, 2007).

Des expériences cinétiques d'immunoprécipitation de la chromatine (Sharma and Fondell, 2002) ont permis de déterminer le processus permettant le recrutement du médiateur sur un promoteur et son rôle dans l'activation transcriptionnelle (Figure 34)

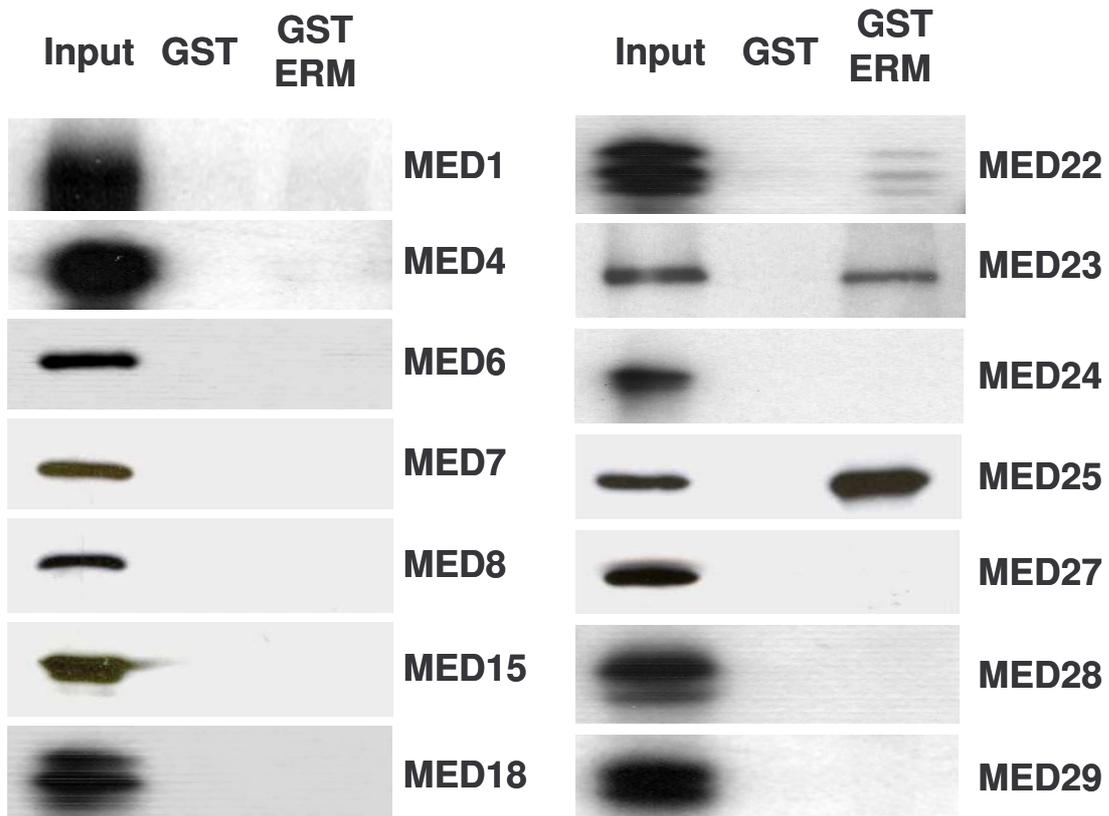


Figure 35 : ERM interagit *in vitro* avec MED23 et MED25

Les sous-unités sont produites *in vitro* en lysats de réticulocytes et marquées par l'incorporation de méthionine ³⁵S. Le pull down est réalisé comme précédemment (Figure 29). L'input correspond à 5% du lysat mis en contact avec les billes. La présence de la protéine est détectée par autoradiographie.

(pour revue (Malik and Roeder, 2005)) : Après son recrutement par le(s) facteur(s) de transcription situé(s) au niveau des enhancers, le médiateur (complexe large ou TRAP) permet de favoriser l'assemblage du complexe de pré-initiation (CPI). Une fois fixé au CPI, le médiateur subit une modification structurale (libération du module CDK8, ajout de la sous-unité MED26, complexe nommé PC2) qui permet le recrutement de l'ARN polymérase II. En effet, seule une forme dépourvue du module CDK8 interagit avec le domaine C-terminal de la grande sous-unité de la pol II (Naar et al., 2002). En plus de stimuler le recrutement du CPI et de la pol II, ce complexe permet également la formation d'une plateforme stable (en présence d'un activateur) qui va permettre de répéter l'initiation et donc d'augmenter le nombre de transcrits par minute (Wang et al., 2005).

Selon le régulateur transcriptionnel impliqué, l'interaction s'effectue avec des protéines différentes du médiateur. La fixation d'activateurs sur des sous-unités variées (et même sur la même sous-unité) cause des modifications de la structure du médiateur ce qui lui confère des activités variées en réponse et en intensité : le médiateur joue donc le rôle d'« intégrateur » des signaux de régulation convergeant sur un promoteur (Chadick and Asturias, 2005).

B Quelles sous-unités du médiateur interagissent avec ERM ?

Nous avons identifié par purifications trois sous-unités du médiateur : MED15, MED23 et MED25 dont deux se sont révélées des interacteurs directs d'ERM (voir figure 31, page 94). Afin de déterminer si d'autres sous-unités du complexe médiateur contactent directement ERM, nous avons utilisé la technique de GST pull-down précédemment décrite en présence de différentes sous-unités du médiateur traduites en lysats de réticulocytes. Parmi les 14 sous-unités testées, nous avons ainsi montré que seules MED23 et MED25 se fixent directement sur ERM tout en ne se fixant pas sur la GST seule (Figure 35). De plus, nous avons démontré que cette interaction directe est spécifique car MED23 et MED25 ne se fixent pas sur la fusion de la GST avec le domaine de transactivation de p73 (donnée non montrée). Nous avons alors décidé de concentrer notre étude sur ces deux protéines.

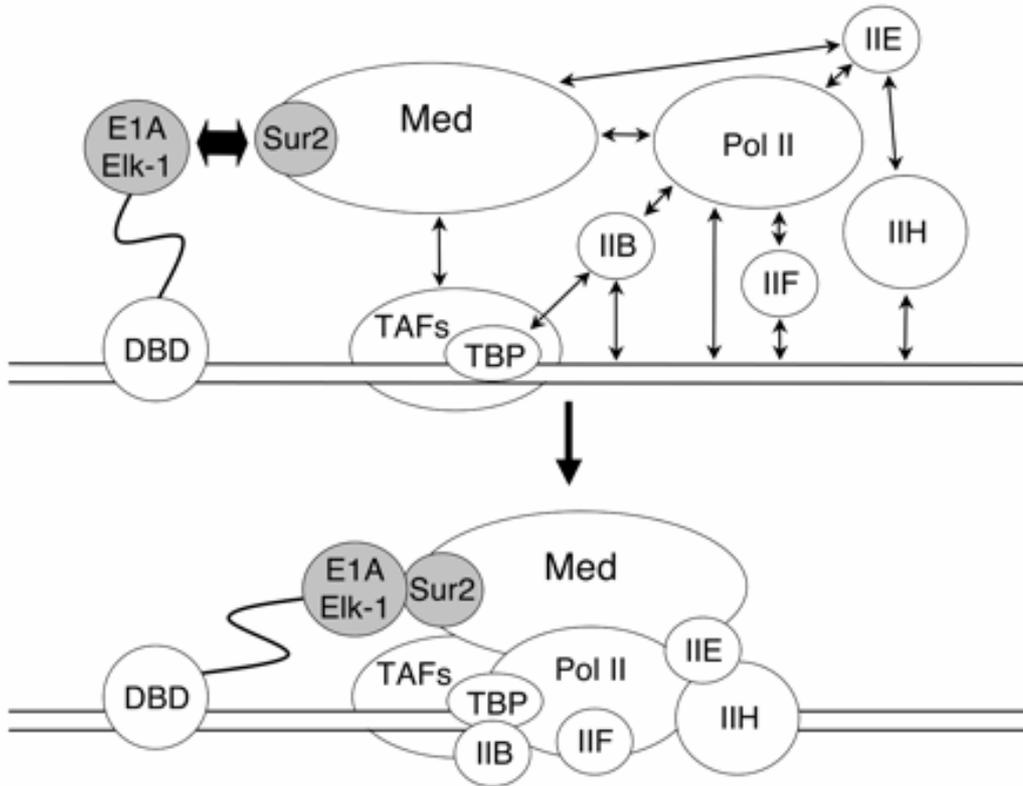


Figure 36 : Le recrutement du médiateur nécessite l'interaction entre le domaine CR3 de E1A (ou de Elk1 phosphorylé) et MED23.

L'interaction d'E1A ou ELK1 avec MED23 (Sur2) permet le recrutement du médiateur et l'assemblage du complexe de pré-initiation constitués des facteurs de transcription généraux et de la polymérase II. d'après (Cantin et al., 2003)

C MED23

1 Présentation

MED23 a été découverte chez *C.Elegans* sous le nom de « Sur2 » pour « suppressor of ras » grâce à un criblage génétique des suppresseurs du phénotype provoqué par une forme constitutivement active de Ras. Sur2 a été définie comme une protéine qui intervient de façon tardive dans la voie récepteur tyrosine kinase-Ras-Raf-MAPK et qui est nécessaire à plusieurs processus de développement dont le développement de cellules vulvaires (Singh and Han, 1995). Ceci est sûrement lié à sa capacité à activer LIN-1, un facteur de transcription orthologue de Elk1 dont l'implication dans ces processus est connue (Singh and Han, 1995).

L'orthologue humain de Sur2 (hSur2) a ensuite été identifié dans diverses purifications du médiateur : Cette protéine a ainsi été nommée par différents termes selon les purifications où elle a été trouvée : ARC/DRIP 130 (Naar et al., 1999) (Rachez et al., 1999; Taatjes et al., 2002), TRAP 150 β (Fondell et al., 1999) (Malik et al., 2000) ou encore CRSP130 (Ryu et al., 1999; Taatjes et al., 2002). Cette protéine est désignée sous le nom de MED23 dans la nomenclature établie en 2004 par Bourbon (Bourbon et al., 2004).

La recombinaison homologue de *med23* entraîne une létalité embryonnaire après 10.5 jours de gestation. Néanmoins les cellules souches embryonnaires sont viables (Stevens et al., 2002). Ce gène est délété dans des mélanomes humains où il a été identifié comme un suppresseur de métastase. Sa délétion entraîne en effet une perte de l'expression du gène suppresseur de métastase *kiss1* (Goldberg et al., 2003) (Mitchell et al., 2006), gène régulé par Sp1 dont MED23 est un cofacteur (Mitchell et al., 2006). Dans ce cas, il y a sûrement le recrutement du médiateur puisque MED23 fait partie du complexe médiateur CRSP (cofactor required for Sp1 activation) (Ryu et al., 1999; Taatjes et al., 2002).

Cette sous-unité, qui est absente chez la levure, présente une association plus faible avec le complexe médiateur que les sous-unités du « core ». Elle forme un module avec Med 24 et MED16 (et MED25 lorsque celle-ci est présente). Des expériences de recombinaison homologue montre que l'absence de MED23 ou de MED24 a tendance à déstabiliser l'interaction de ce module avec le complexe médiateur (Ito et al., 2002) (Stevens et al., 2002).

MED23 interagit avec des coactivateurs tels que TRBP (Thyroid hormone receptor-binding protein) (Ko et al., 2000) ou le coactivateur de la Drosophile DIF (Differentiation Inducing Factor) (Kim et al., 2004). MED23 interagit également avec le facteur de

Résultats

transcription HSF (Heat-shock factor) (Kim et al., 2004). Pour DIF et HSF, l'interaction nécessite leurs domaines d'activation et les acides aminés 358 à 625 de MED23 (Kim et al., 2004). Elle interagit aussi avec le domaine de transactivation CR3 de E1A (Boyer et al., 1999) et est impliquée dans l'activation de la transcription par cette protéine (Stevens et al., 2002). Il a été démontré en effet que le domaine CR3 stimule l'assemblage du complexe de pré-initiation (CPI) par l'interaction avec le médiateur via MED23 (Cantin et al., 2003) (figure 36).

Il a aussi été démontré que MED23 interagit avec des membres de la famille ETS. MED23 s'associe en effet à ESX. Cette interaction est impliquée dans l'activation de l'oncogène *Her2/Neu* par ESX et nécessite le domaine de transactivation de ESX. Plus particulièrement, la région 352-625 de MED23 interagit avec la face hydrophobe d'une hélice α de ESX (Asada et al., 2002). La détermination de ce domaine d'interaction restreint (8 acides aminés) a permis la synthèse d'une molécule inhibant l'interaction entre ESX et MED23 qui permet de réduire la transcription de *Her2/Neu* (Shimogawa et al., 2004). Cette sous-unité du médiateur permet également la fixation *in vitro* du médiateur sur ELK1 (Figure 36). Cette fixation est dépendante de la phosphorylation de ce facteur par une MAP kinase (phosphorylation régulant son domaine de transactivation) (Stevens et al., 2002). Dans les cellules MED23 *-/-*, l'activité transcriptionnelle de ELK1 (activée par les MAPK) est fortement inhibée (Stevens et al., 2002). En particulier, il a été montré dans ces cellules que l'activation du gène *Egr1* par ELK1 phosphorylée est réduite (Wang et al., 2005). Ceci est dû à une absence du recrutement du médiateur sur ce promoteur ce qui se traduit par une diminution de l'assemblage du CPI mais aussi en une diminution du nombre d'initiations par le CPI : la pol II reste associée au CPI au lieu de se libérer pour permettre le début de la transcription (Wang et al., 2005). Très récemment, il a également été constaté que l'absence de MED23 dans le CPI du promoteur *Egr2* diminuait la transcription de ce gène ce qui a pour conséquence d'inhiber l'adipogenèse (Wang et al., 2005).

Néanmoins, MED23 peut aussi être associé à une répression de l'activité transcriptionnelle. Ainsi, Mo *et al.* ont montré que MED23 pouvait s'associer à C/EBP β , qu'il soit sous la forme activatrice ou répressive. Lorsque C/EBP β est sous forme répressive, MED23 permet le recrutement sur les promoteurs répondant à C/EBP β d'un complexe médiateur enrichi en CDK8 et dépourvu de MED26. Suite à l'activation de la voie Ras, C/EBP β est converti en activateur et est associé à un complexe médiateur contenant Med 26 et dépourvu du module kinase CDK8 (Mo et al., 2004). Cet exemple illustre l'importance de la dynamique dont le complexe médiateur est capable : il peut permettre une répression ou une activation en fonction des sous-unités présentes.

2 Interaction entre MED23 et ERM in vivo

Nous avons montré l'existence d'une interaction entre ERM et MED23 *in vitro* (figure 31, page 94). Nous avons donc cherché à établir l'existence de cette interaction *in vivo*. Dans les cellules U2OS exprimant ERM et MED23, nous n'avons pas détecté la présence de complexes entre ces deux protéines par des expériences de co-immunoprécipitation avec des anticorps anti-ERM. Le taux très faible d'ERM dans ces cellules rendant cette approche délicate, nous avons exprimé de manière constitutive Flag-ERM dans des cellules HeLa et immunoprécipité ERM avec un anticorps dirigé contre cette étiquette.

Comme l'illustre la figure 37, suite à l'immunoprécipitation d'ERM, MED23 est spécifiquement retrouvée dans l'immun précipité des cellules exprimant Flag-ERM et non dans celui des cellules ne l'exprimant pas. Ainsi MED23 et ERM sont présents au sein des mêmes complexes *in vivo*.

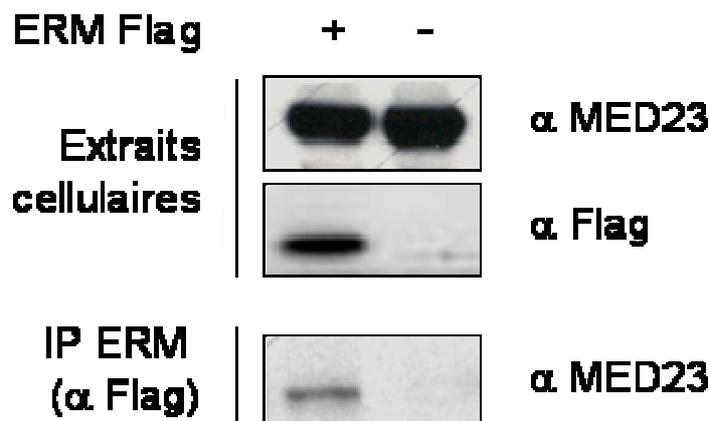


Figure 37 : MED23 interagit *in vivo* avec ERM

Les extraits cellulaires issus de HeLa exprimant ou non stablement Flag ERM sont incubés avec l'anticorps d'immunoprécipitation flag (IP ERM). Les immuns précipités ainsi que 5% de l'extrait cellulaire sont analysés par Western-blot à l'aide des anticorps anti-Flag ou anti-MED23.

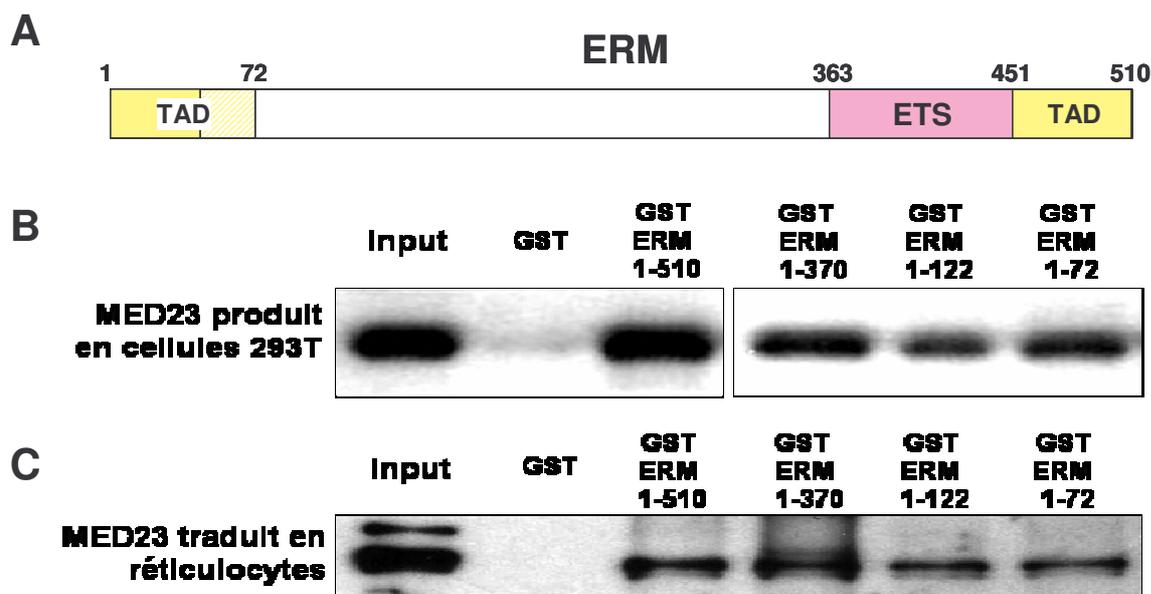


Figure 38 : La région 1-72 d'ERM est suffisante pour l'interaction avec MED23.

A Schéma des domaines fonctionnels de la protéine ERM. TAD Domaine de transactivation

B Des extraits cellulaires de cellules 293T surexprimant Flag-MED23 sont mis en contact avec la GST ou la protéine de fusion GST-ERM entière ou délétée. L'input correspond à l'analyse directe de 10% de l'extrait cellulaire mis en contact avec les billes. La présence de MED23 est détectée par Western-blot à l'aide d'anticorps anti-Flag.

C Expérience similaire à B avec Flag-MED23 produite *in vitro* en lysat de réticulocytes.

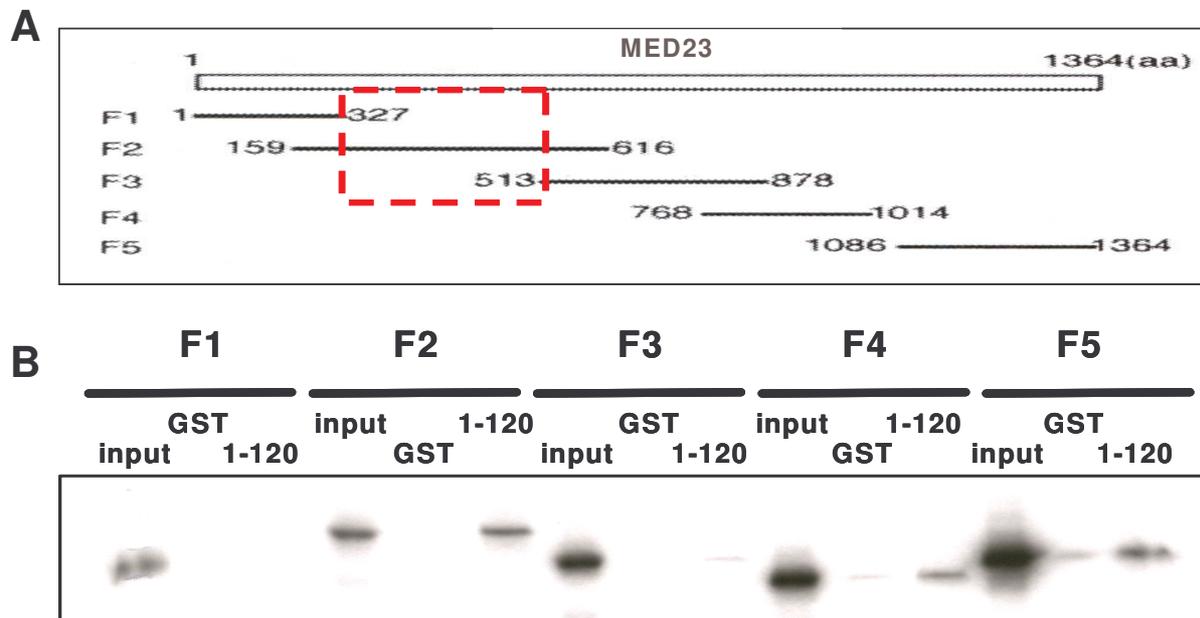


Figure 39 : Recherche de la zone d'interaction sur MED23

A Schéma représentant les différents fragments (F1 à F5) utilisés dans les expériences de pull down, d'après (Argasinska et al., 2004). Le rectangle rouge indique la région préférentielle d'interaction avec ERM.

B Les fragments de MED23 (F1 à F5) sont produits *in vitro* en lysat de réticulocytes et marqués par l'incorporation de méthionine 35S. Le pull down est réalisé tel que décrit précédemment (figure 34). L'input correspond à 10% du lysat mis en contact avec les billes.

3 Cartographie des domaines d'interaction

Afin de rechercher la zone d'ERM impliquée dans l'interaction avec MED23, nous avons réalisé des expériences de GST-pull down en utilisant la protéine Flag-MED23 soit exprimée dans des cellules 293T soit traduite *in vitro* en lysat de réticulocytes. Les extraits cellulaires ou le lysat de réticulocytes (input) ont été mis en présence de protéines de fusion GST-ERM délétées de façon progressive (1-370, 1-122 et 1-72) afin de délimiter la zone minimale d'interaction nécessaire à la fixation de MED23. Après lavages et élution, la protéine a été analysée par Western-blot à l'aide d'anticorps anti-Flag (figure 38). Dans les deux cas, MED23 apparaît retenue par toutes les fusions GST-ERM et non par la GST seule. Néanmoins, il semble que l'affinité de MED23 pour ERM apparaît plus importante lorsque la protéine est produite en cellule plutôt que traduite *in vitro* en lysat de réticulocytes (comparer B et C, figure 38). Les résultats obtenus montrent que les 72 premiers acides aminés d'ERM, qui contiennent le domaine de transactivation principal, sont suffisants pour permettre l'interaction avec MED23.

En ce qui concerne la protéine MED23, aucun domaine fonctionnel n'a encore été décrit sur cette protéine. Afin de rechercher la zone d'interaction avec ERM, nous avons réalisé des expériences de GST pull-down en utilisant une protéine GST-ERM 1-120 immobilisée sur des billes de glutathion-sépharose et des fragments de la protéine produits *in vitro* en lysat de réticulocytes présentés dans la figure 39 A. Comme l'illustre la figure 39 B, le fragment F2 (AA 159-616) est le principal fragment interagissant avec ERM. Comme les fragments F1 (AA 1-327) et F3 (AA 513-878) n'interagissent pas de manière significative avec ERM, on peut penser que cette interaction nécessite principalement la région située entre les acides aminés 327 et 513 de MED23. Néanmoins, les fragments F4 (AA 768-1086) et F5 (AA 1014-1364) interagissent également faiblement avec ERM. Une région de la partie C-terminale de MED23 pourrait donc participer à l'interaction avec ERM.

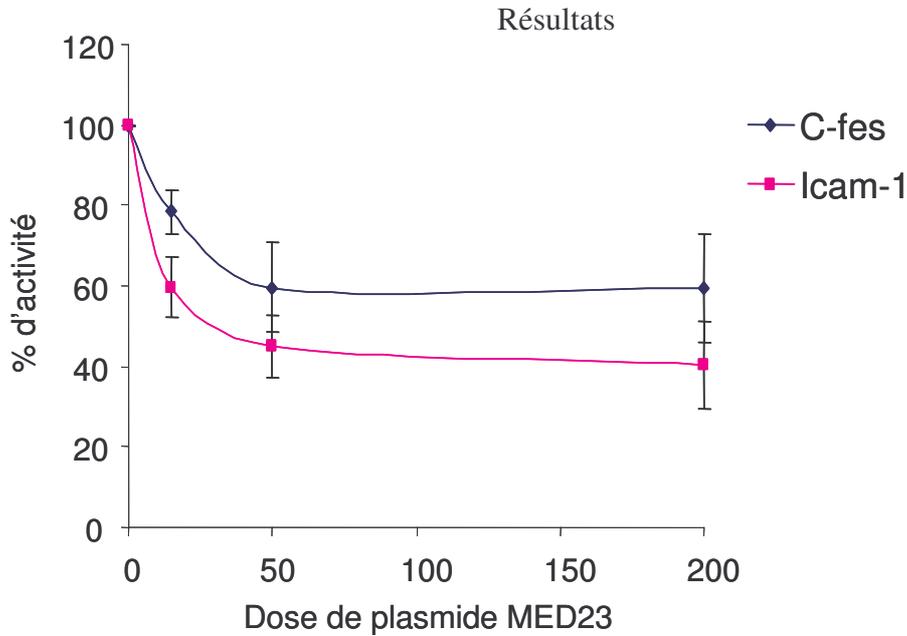


Figure 40 : Impact de l'expression de MED23 sur l'activité transcriptionnelle d'ERM.

Les cellules 293T sont transfectées transitoirement pendant 24h avec une quantité croissante de plasmide d'expression de MED23, 25ng d'effecteur codant ERM et 100ng de vecteur rapporteur C-fes-luc (bleu) ou Icam1-luc (rose). Les résultats sont la moyenne (+/- SEM) de 4 expériences indépendantes réalisées en triplicata. Les résultats sont présentés en % d'activité d'ERM. 100% correspondant à l'activité d'ERM en l'absence du plasmide MED23.

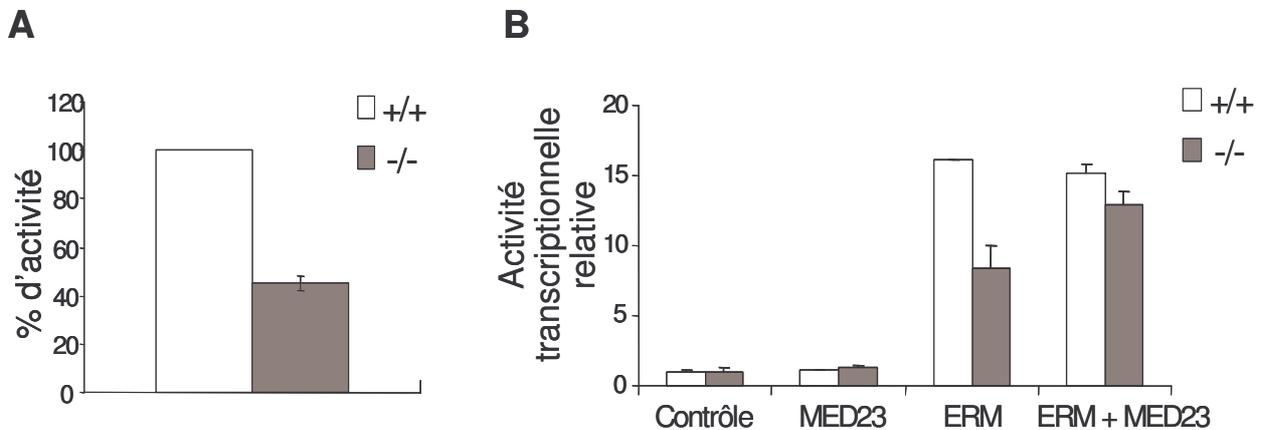


Figure 41 : Impact de MED23 sur l'activité transcriptionnelle d'ERM

Les cellules MEF sauvages (+/+) ou dépourvues de MED23 (-/-) sont transfectées transitoirement pendant 24h comme décrit précédemment (figure 40).

A Activité transcriptionnelle d'ERM sur le promoteur Icam1 dans les cellules +/+ et -/-. Les résultats sont présentés en % d'activité d'ERM. 100% correspondant à l'activité d'ERM dans les cellules +/+.

B Activité d'ERM sur le promoteur Icam1 dans les cellules +/+ et -/- avec ou sans présence de 25ng de MED23. L'activité des cellules transfectées par le vecteur rapporteur et le plasmide contrôle en absence de MED23 et d'ERM est fixée à 1.

4 Modulation de l'activité transcriptionnelle d'ERM

a- Surexpression

Nous avons évalué l'impact de l'expression de MED23 sur l'activité transcriptionnelle d'ERM en utilisant les vecteurs rapporteur *Icam1* et *C-fes*, qui ont tous les deux été montré comme répondant à ERM (de Launoit et al., 1998). Nous avons constaté que la surexpression de MED23 réprime l'activité du facteur de transcription de façon dose dépendante (Figure 40) bien qu'elle n'ait pas d'effet sur l'expression d'ERM (donnée non montrée). Ainsi, comme l'illustre la figure 40, la co-expression de MED23 réduit d'environ 40% l'activité d'ERM sur le promoteur *C-fes* et de plus de 60% sur le promoteur *Icam1* dans les cellules 293T. Cette inhibition est également observée dans d'autres lignées cellulaires telles que les RK13 ou les HeLa. Ce résultat est également observé pour les autres membres du groupe PEA3 : PEA3 et ER81 (donnée non montrée).

b- Sous-expression

Afin de déterminer l'importance fonctionnelle de cette répression, nous avons évalué l'activité transcriptionnelle d'ERM sur le promoteur *Icam1* dans des cellules MEF sauvages (+/+) ou dépourvues de MED23 (-/-) (Stevens et al., 2002). En l'absence de MED23, l'activité du facteur de transcription ERM diminue de plus de 50% par rapport aux cellules sauvages (figure 41 A). Néanmoins, ERM active toujours de manière significative ce promoteur ce qui laisse penser que MED23 n'est pas la seule protéine participant à l'activation transcriptionnelle d'ERM. De plus, des données préliminaires indiquent que cette diminution de l'activité transcriptionnelle d'ERM est bien due à une absence de MED23 puisque l'expression de MED23 exogène abolit cette répression (Figure 41 B, comparer cellules -/- : ERM et ERM+MED23).

Ainsi, il semble que MED23 participe à l'activation transcriptionnelle induite par ERM. Sa surexpression provoque sûrement un phénomène de « rétention protéique » ou « squelching ». En effet, la surexpression de MED23 peut entraîner sa sur-représentation dans la cellule ce qui aboutira à sa fixation sur ERM sous forme monomérique et non plus sous forme associée à certains complexes médiateurs. De manière similaire, nos premières données indiquent que le fragment F2 de MED23, qui interagit avec ERM, jouerait également le rôle de dominant négatif sur l'activité transcriptionnelle d'ERM.

Nous sommes actuellement en train de développer des approches utilisant des siRNA dirigés contre MED23 et les premiers résultats semblent en accord avec ceux obtenus dans les cellules MEF-/-.



Figure 42 : Domaines fonctionnels de MED25.

VWA (Von Willebrand factor type A), point d'entrée de MED25 dans le complexe médiateur

ACID domaine d'interaction avec l'activateur.

NR box : motif d'interaction avec les récepteurs nucléaires (LRSLL)

Adapté de (Lee et al., 2007)

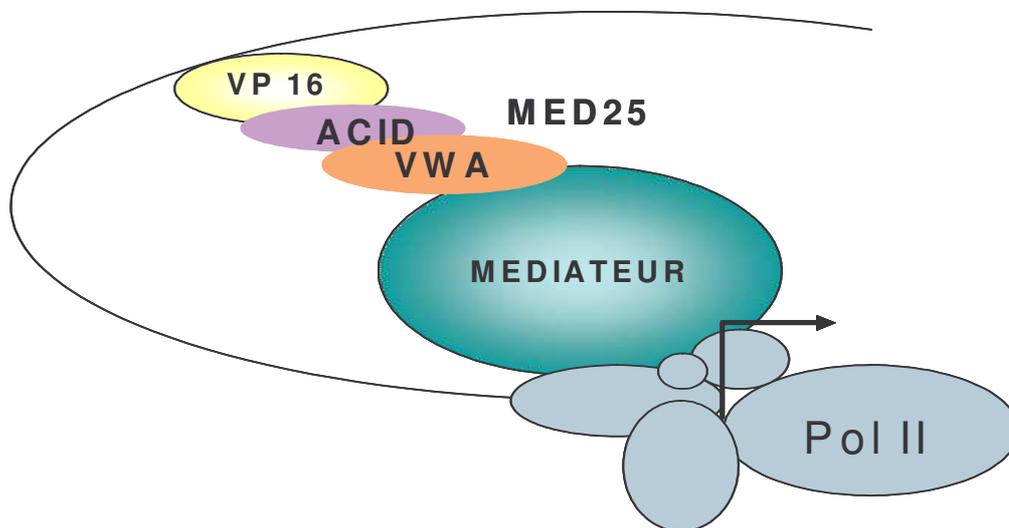


Figure 43 : Modèle de recrutement du médiateur sur VP16 via MED25

MED25, qui interagit avec VP16 par son domaine ACID, permet le recrutement d'un complexe médiateur dépourvu de la sous-unité CDK8 par son domaine VWA, adapté de (Mittler et al., 2003).

D MED25

1 Présentation

med25 est exclusivement présent chez les Eucaryotes supérieurs (Blazek et al., 2005; Bourbon, 2008). Cette protéine a été découverte en tant que ARC92 dans le complexe médiateur ARC (Activator-recruited cofactor) (Naar et al., 1999). Néanmoins, cette sous-unité n'est pas présente dans le médiateur nécessaire pour la transcription *in vitro* activée par Sp1 (Mittler et al., 2003). Cette protéine est en fait retrouvée dans peu de purifications du médiateur. Ceci laisse supposer que son interaction avec ce complexe est relativement faible et elle pourrait ainsi être perdue lors des étapes de purifications du médiateur qui sont très drastiques. Une autre hypothèse est qu'elle ne serait présente que dans certains complexes particuliers (Malik and Roeder, 2005). Sa localisation au sein du médiateur n'est pas clairement définie, mais MED25 ferait partie du module « MED16, MED23 et MED24 » (Malik and Roeder, 2005).

Au sein de MED25, deux domaines ont été définis (Figure 42) : le premier domaine, responsable de l'interaction avec l'activateur, est nommé ACID (Activator Interaction Domain, acides aminés 389-543) (Mittler et al., 2003). Ce domaine est également retrouvé en deux exemplaires dans la protéine PTOV1 (Prostate Tumor Overexpressed) (Benedict et al., 2001) qui est situé à côté de MED25 sur le chromosome 19 (Yang et al., 2004).

Le deuxième domaine conservé au sein de MED25 est un domaine de type VWA (Von Willebrand factor type A) qui lui permet d'interagir avec le médiateur (Mittler et al., 2003). La région A du facteur de Von Willebrand est connue pour établir des contacts avec le collagène. Ce même type de domaine est également retrouvé dans certaines intégrines où il permet l'interaction avec le ligand (Mittler et al., 2003).

MED25 interagit *in vitro* et *in vivo* avec le domaine de transactivation du transactivateur majeur de l'herpes virus simplex, VP16 (Mittler et al., 2003; Yang et al., 2004). Cette interaction nécessite le domaine H1 de VP16 et le domaine ACID de MED25. Cette interaction est nécessaire à l'activation transcriptionnelle médiée par VP16 aussi bien dans un système *in vitro* qu'en cellules (Mittler et al., 2003). Les domaines ACID comme VWA, lorsqu'ils sont exprimés de façon isolée, ont un effet dominant négatif sur l'activation de VP16 (Mittler et al., 2003). MED25 permet de recruter un complexe médiateur dépourvu de la sous-unité CDK8 sur un promoteur où est fixé VP16 (Uhlmann et al., 2007) (Figure 43).

MED25 interagit également avec une autre protéine virale, le transactivateur majeur du virus Varicella-Zoster (VZV) nommé IE62 (Intermediate Early phase 62kDa) (Yang et al.,

Résultats

2008) (Yamamoto et al., 2009). Le domaine ACID de MED25 interagit avec le domaine transactivateur N-terminal d'IE62 et les résidus 484 à 488 du domaine ACID semblent importants pour cette l'interaction (Yamamoto et al., 2009). MED25 est nécessaire à l'activation transcriptionnelle induite par IE62 (Yang et al., 2008). IE62 permet le recrutement du médiateur sur les promoteurs qu'il régule (Yang et al., 2008) même s'il n'a pas été établi de façon formelle que ce recrutement est dépendant de MED25 (Yang et al., 2008). Néanmoins, par mutagenèse dirigée, il a été montré que les acides aminés 28 et 50 d'IE62 étaient particulièrement importants pour permettre l'interaction avec MED25 : leur mutation entraîne une perte de l'activité de IE62 et du recrutement du médiateur ce qui laisse supposer que MED25 serait bien responsable de ce recrutement (Yamamoto et al., 2009).

Enfin, MED25 possède un motif LxxLL (LRSLL, résidus 646-650 = NR Box, figure 42) lui permettant d'interagir de manière ligand-dépendante avec les récepteurs nucléaires tels que RAR α (retinoid acid receptor), RXR (retinoid X receptor), TR (thyroid hormone receptor), ER (estrogen receptor) et GR (glucocorticoid receptor). En effet, *in vivo*, MED25 est nécessaire à l'activation de la transcription par RAR ou RXR (Lee et al., 2007). Cette activation nécessite l'interaction du domaine ACID de MED25 avec CBP. La présence de MED25 est également requise pour permettre le recrutement du médiateur *in vivo*, bien que le rôle de ce dernier dans l'activation induite par RAR/RXR ne soit pas encore clairement défini (Lee et al., 2007).

2 Interaction entre MED25 et ERM *in vivo*

Nous avons montré précédemment l'existence d'une interaction entre ERM et MED25 *in vitro* (voir figure 31, page 95) et nous avons donc cherché à établir l'existence de cette interaction *in vivo*. Ne disposant pas d'un anticorps permettant d'immunoprécipiter MED25, nous avons co-exprimé ERM et Flag-MED25 dans les cellules RK13 et immunoprécipité MED25 avec un anticorps dirigé contre cette étiquette. Suite à l'immunoprécipitation de MED25, ERM est spécifiquement retrouvée dans l'immun précipité des cellules exprimant Flag-MED25 et non dans celui des cellules ne l'exprimant pas (Figure 44). Ainsi MED25 est donc capable de former un complexe détectable avec ERM *in vivo*.

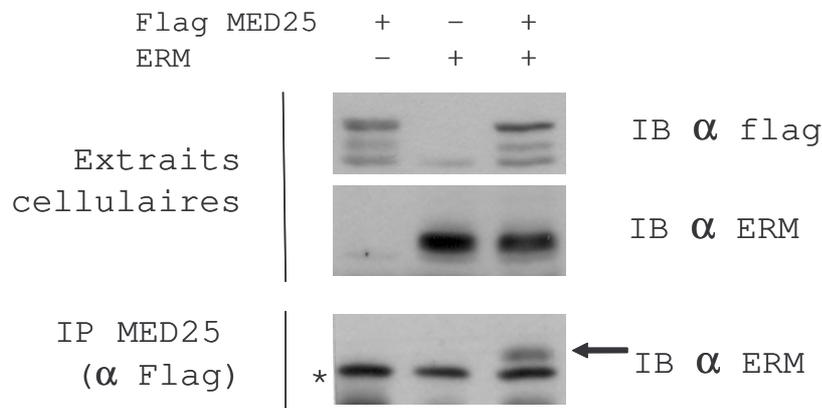


Figure 44 : MED25 interagit *in vivo* avec ERM

Des cellules RK13 sont transfectées ou non avec les plasmides d'expression Flag MED25 et ERM. Les lysats cellulaires sont incubés avec l'anticorps d'immunoprécipitation flag (IP flag) et les immuns précipités ainsi que 5% de l'extrait cellulaire sont analysés par Western-blot à l'aide des anticorps flag ou ERM. L'étoile signale une protéine aspécifique reconnue par l'anticorps anti-ERM.

Résultats

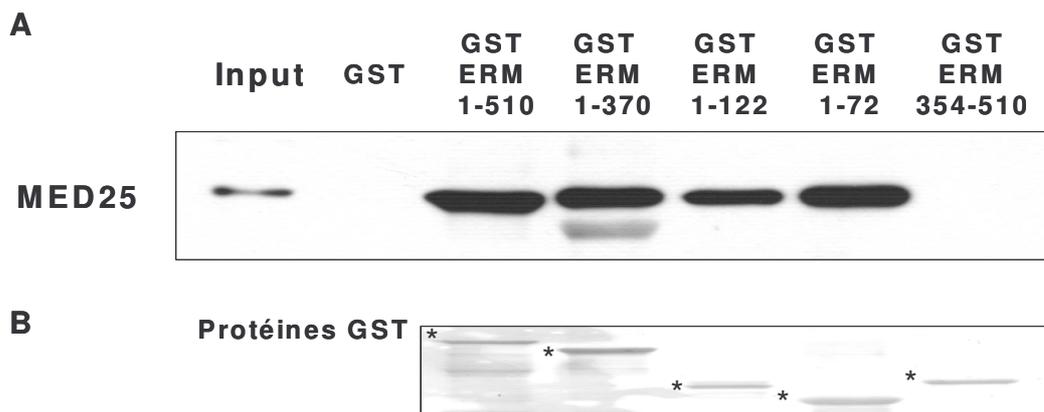


Figure 45: La région 1-72 d'ERM est suffisante pour interagir avec MED25.

A La protéine Flag-MED25 est produite *in vitro* en lysat de réticulocytes. Le pull down est réalisé tel que décrit précédemment (figure 38). L'input correspond à 5% du lysat mis en contact avec les billes.

B Expression des protéines GST utilisées dans l'expérience présentée ci-dessus. Les protéines marquées d'une étoile correspondent aux protéines GST indiquées en A.

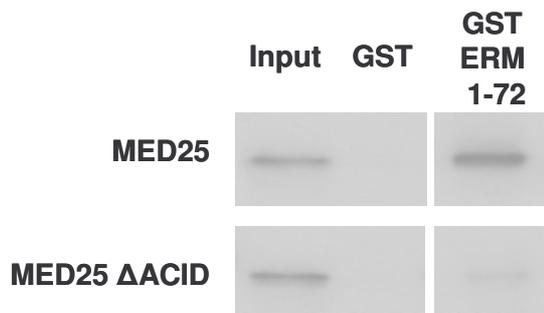


Figure 46: Le domaine ACID de MED25 est nécessaire pour interagir avec ERM.

Les protéines MED25 sauvage et dépourvue du domaine ACID (MED25 ΔACID) sont produites *in vitro* en lysat de réticulocytes et marquées par l'incorporation de méthionine 35S. Le pull down est réalisé comme précédemment (figure 39). L'input correspond à 10% du lysat mis en contact avec les billes.

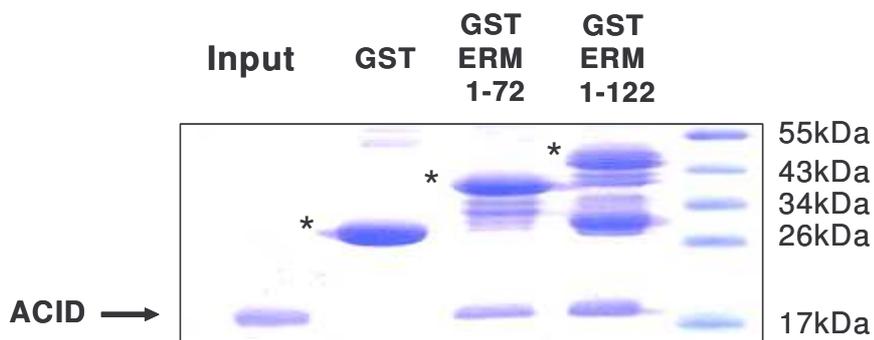


Figure 47: Le domaine ACID de MED25 est suffisant pour interagir avec ERM.

Le domaine ACID de MED25 a été produit en bactérie et purifié puis mis en contact avec les protéines GST, GST-ERM 1-72 et GST-ERM 1-122 immobilisées sur des billes de glutathion-séparation. L'input correspond à 25% du lysat mis en contact avec les billes. La présence des protéines est observée par coloration au bleu de Coomassie. Les protéines marquées d'une étoile correspondent aux protéines de fusion GST indiquées.

3 Cartographie des domaines d'interaction

Afin de rechercher la zone d'ERM impliquée dans l'interaction avec MED25, nous avons produit Flag-MED25 *in vitro* en lysat de réticulocytes et réalisé des expériences de pull-down avec les protéines de fusion GST-ERM délétées de façon progressive précédemment décrites (1-370, 1-122 et 1-72). Après lavages et élution, la protéine a été analysée par Western-blot à l'aide d'anticorps anti-Flag (figure 45). MED25 apparaît retenue par toutes les fusions GST-ERM délétées à partir de l'extrémité C-terminale et non par la GST seule. Ainsi, les 72 premiers acides aminés d'ERM, qui contiennent le domaine de transactivation principal, sont suffisants pour permettre l'interaction avec MED25. Ce résultat est confirmé par l'absence d'interaction avec la partie C-terminale d'ERM (GST-ERM 354-510).

Au niveau de MED25, le domaine ACID est connu pour interagir avec les domaines transactivateurs des protéines virales VP16 et IE62 (Mittler et al., 2003; Yamamoto et al., 2009). Afin de vérifier le rôle possible de ce domaine dans l'interaction avec ERM, une construction dépourvue de ce domaine (MED25 Δ ACID) a été produite et incubée en présence de GST ou de la protéine de fusion GST-ERM 1-72 fixée sur un support de glutathion-sépharose. Comme l'illustre la figure 46, cette protéine, contrairement à MED25 sauvage, n'interagit quasiment plus avec ERM. Le domaine ACID de MED25 est donc nécessaire pour interagir avec ERM.

Afin de vérifier que ce domaine était suffisant pour l'interaction avec ERM, nous avons mis en contact le domaine ACID purifié en bactérie avec la protéine GST, GST-ERM 1-72 ou GST-ERM 1-122 fixées sur un support de glutathion-sépharose. Comme l'illustre la figure 47, le domaine ACID est spécifiquement retenu sur les GST-ERM 1-72 et GST-ERM 1-122 mais pas sur la GST.

Ainsi le domaine ACID de MED25 est nécessaire et suffisant pour interagir avec ERM.

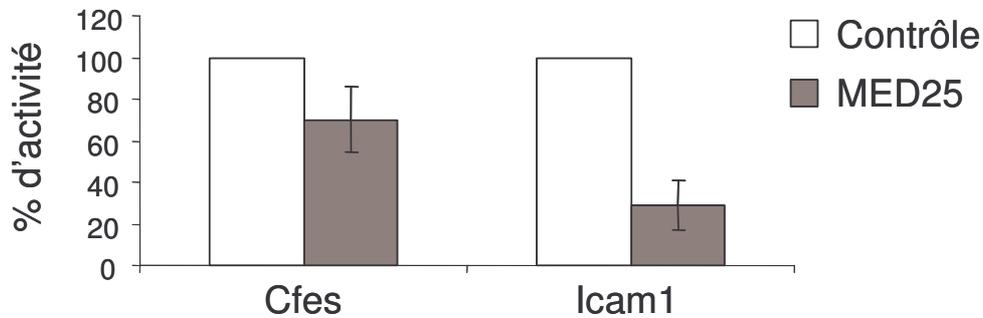


Figure 48 : Impact de la surexpression de MED25 sur l'activité transcriptionnelle d'ERM.

Les cellules 293T sont transfectées comme précédemment (figure 41) avec 200ng de plasmide d'expression de MED25. Les résultats sont présentés en % d'activité d'ERM. 100% correspondant à l'activité d'ERM en l'absence du plasmide MED25.

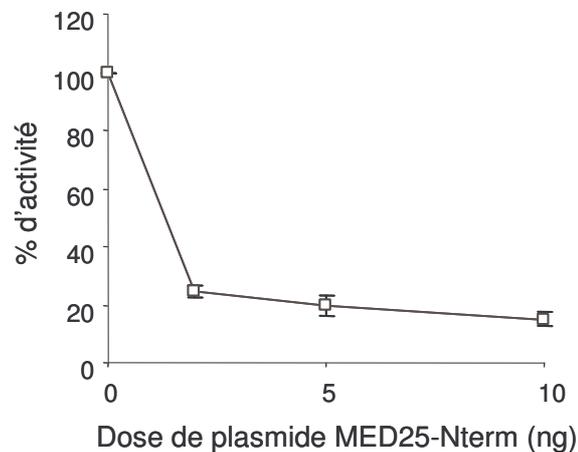


Figure 49: Impact de la surexpression de MED25-Nterm sur l'activité transcriptionnelle d'ERM

Les cellules RK13 sont transfectées transitoirement pendant 24h avec une quantité croissante de plasmide d'expression de MED25-Nterm, 10ng de plasmide pCDNA3 vide ou effecteur codant ERM et 100ng de vecteur rapporteur Icam1-luc. Les résultats sont présentés en % d'activité d'ERM. 100% correspondant à l'activité d'ERM en l'absence du plasmide MED25-Nterm.

4 Modulation de l'activité transcriptionnelle d'ERM

a- Surexpression de MED25 pleine longueur

Afin d'étudier le rôle de MED25, nous avons évalué l'impact de l'expression de cette protéine du médiateur sur l'activité transcriptionnelle d'ERM en utilisant les mêmes vecteurs rapporteurs que précédemment (Icam-1 et C-fes). A l'instar de MED23, MED25 réprime l'activité d'ERM. Ainsi, dans les conditions optimales, la co-expression de MED25 réduit d'environ 30% l'activité d'ERM sur le promoteur C-fes et de plus de 70% sur le promoteur Icam1 dans les cellules 293T (Figure 48). Cette diminution d'activité d'ERM n'est pas due à une diminution du taux d'ERM produit en présence de MED25. Elle est également observée dans d'autres lignées cellulaires telles que les RK13 ou les HeLa (données non montrées). De manière similaire, la surexpression de MED25 induit également une répression de l'activité transcriptionnelle des deux autres membres du groupe PEA3 : PEA3 et ER81 (donnée non montrée).

b- Surexpression de MED25-Nterm

Afin de déterminer si la surexpression de MED25 entraîne une réelle répression ou provoque un effet dominant négatif, nous avons évalué l'impact de la construction MED25-Nterm (AA 1-290), connue pour jouer le rôle d'un dominant négatif de MED25 (Mittler et al., 2003), sur l'activité transcriptionnelle d'ERM sur le promoteur Icam1. Cette construction peut interagir avec les complexes médiateurs via son domaine VWA mais n'est plus capable d'interagir avec ERM faute de domaine ACID. Comme l'illustre la figure 49, la surexpression de MED25-Nterm diminue de façon drastique et de manière dose-dépendante l'activité transcriptionnelle d'ERM. Ces données indiquent que le domaine VWA de MED25 semble jouer un rôle dans l'activation induite par ERM en recrutant des éléments nécessaires à son activation.

MED25 semble donc nécessaire à l'activation transcriptionnelle d'ERM, la surexpression de cette sous-unité provoquant sûrement un effet dominant négatif. Afin de confirmer ce fait, nous évaluons actuellement l'impact de la sous-expression de MED25 à l'aide de siRNA sur l'activité d'ERM. Nos premières données indiquent que la sous-expression de MED25 causerait une diminution significative de l'activation induite par ERM.

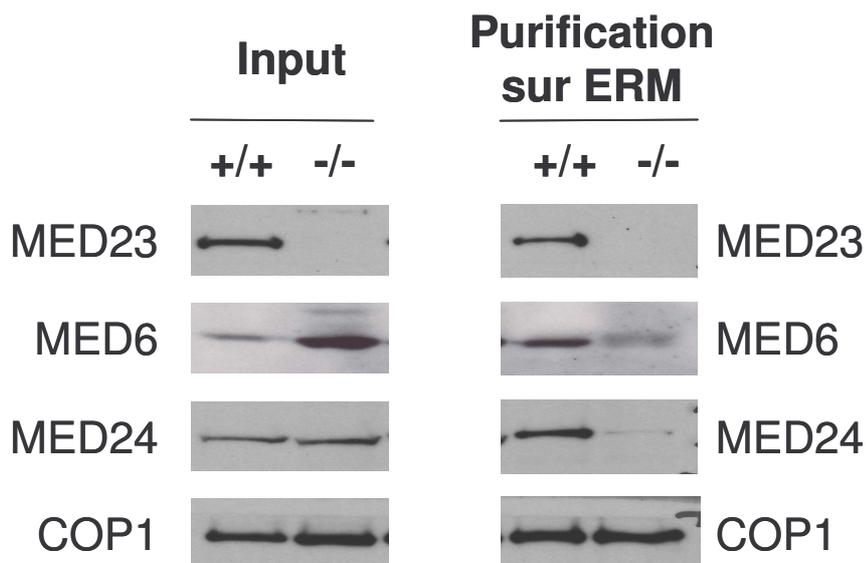


Figure 50 : Implication de MED23 dans le recrutement *in vitro* du médiateur sur ERM dans les cellules MEF.

Des extraits nucléaires de cellules MEF sauvages (-/-) ou dépourvues de MED23 (-/-) sont mis en contact avec des billes de streptavidine couplées à de l'ERM biotinylée (ERM). Après lavages, les billes sont éluées par du SDS et les protéines retenues sur les billes sont identifiées par western blot à l'aide des anticorps précisés.

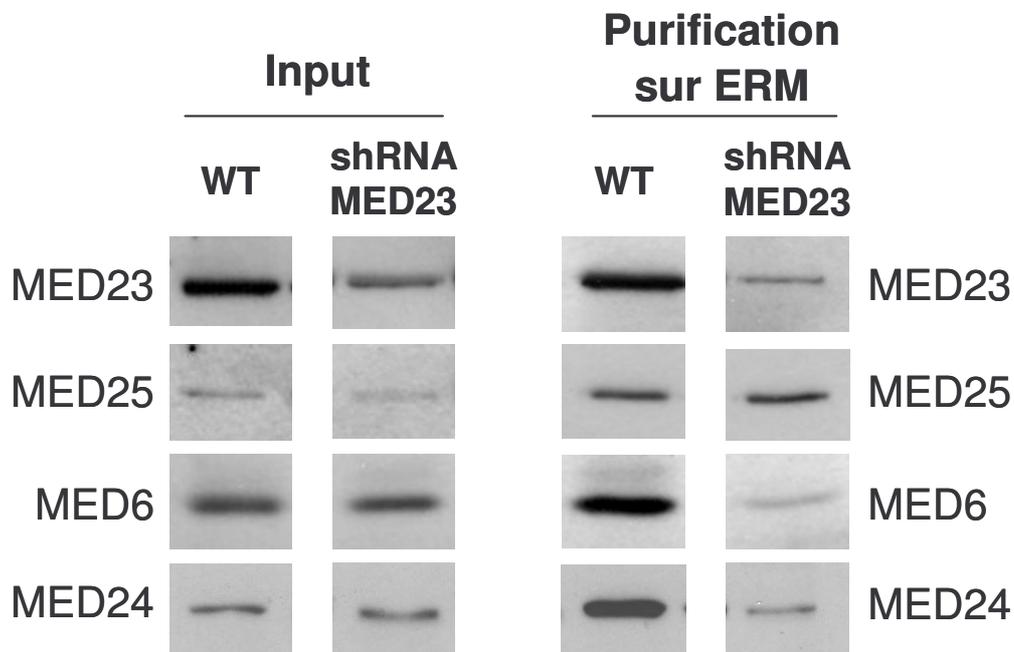


Figure 51 : Implication de MED23 dans le recrutement *in vitro* du médiateur sur ERM dans les cellules HeLa.

Des extraits nucléaires (Input) de cellules HeLa sauvages (WT) ou exprimant de façon stable un shRNA dirigé contre MED23 (shRNA MED23) sont mis en contact avec des billes de streptavidine couplées à de l'ERM biotinylée (Purification sur ERM) comme précédemment décrit (Figure 50)

E Implication de MED23 et MED25 dans le recrutement de complexes médiateurs in vitro par ERM

1 MED23

Afin de déterminer si MED23 est capable de recruter des complexes médiateurs au niveau d'ERM, nous avons utilisé une technique consistant à mettre en contact une résine de streptavidine couplée à la protéine ERM biotinylée (précédemment décrite, voir figure 27, page 88) avec des extraits nucléaires de cellules MEF sauvages (+/+) ou dépourvues de MED23 (-/-) (Stevens et al., 2002). Après lavages et élution au SDS, la présence des protéines fixées sur le support (Purification sur ERM, Figure 50) est détectée par l'utilisation d'anticorps appropriés.

Comme attendu, MED23 est retenue sur ERM dans les cellules +/+ (Figure 50, piste +/+, purification sur ERM). En plus de cette protéine, nous avons également détecté la présence de MED6 et de MED24. Ces protéines n'interagissent pas directement avec ERM (voir figure 35, page 101) et appartiennent pour MED24 au module contenant MED23 et pour MED6 au « core » du médiateur (Figure 33, page 99). La présence de cette dernière sous-unité du médiateur sur le support d'ERM biotinylée suggère que des complexes médiateurs entiers se fixent à ERM.

Par contre lorsque la purification sur ERM est effectuée avec des extraits de cellules -/-, nous observons une baisse drastique du recrutement de MED24 et de MED6 par ERM en absence de MED23 (piste ERM -/-). Cette forte diminution suggère que MED23 est nécessaire pour recruter, tout au moins *in vitro*, une part importante des complexes médiateurs contenant les sous-unités MED6 et MED24. Afin de vérifier que cette forte diminution n'est pas due à une perte de la capacité d'ERM à fixer des partenaires dans les cellules -/-, nous avons utilisé comme contrôle positif la protéine COP1. Cet interacteur d'ERM est impliqué dans l'ubiquitination et n'a pas de lien connu avec le complexe médiateur. En présence ou en absence de MED23, nous observons que la protéine COP1 est toujours recrutée par ERM (comparer pistes ERM +/+ et -/-). Enfin, il faut noter que l'on observe une fixation résiduelle des sous-unités MED6 et MED24 -/- dans les cellules ce qui laisse penser que certains complexes médiateurs ne nécessitent pas la présence de MED23 pour se fixer à ERM *in vitro*. Cette fixation résiduelle n'est probablement pas aspécifique puisque p53, qui n'est pas connue pour interagir avec ERM n'est pas retrouvée dans les mêmes conditions (donnée non montrée). Le même type d'expérience a été réalisé en utilisant des cellules HeLa dans lesquelles nous avons sous-exprimé MED23 par l'utilisation de shRNA dirigés contre cette protéine.

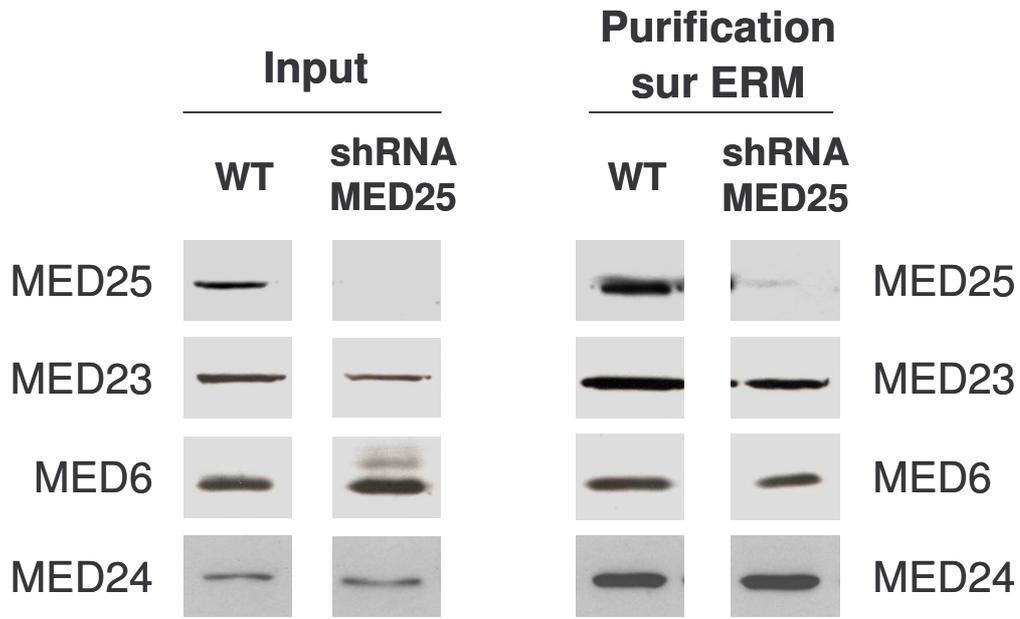


Figure 52 : Implication de MED25 dans le recrutement *in vitro* du médiateur sur ERM.

Des extraits nucléaires (Input) de cellules HeLa sauvages (WT) ou exprimant de façon stable un shRNA dirigé contre MED25 (shRNA MED25) sont mis en contact avec des billes de streptavidine couplées à de l'ERM biotinylée (Purification sur ERM) comme précédemment décrit (Figure 50).

Résultats

Comme l'illustre la figure 51, nous avons également observé dans ces expériences que la diminution de l'expression de MED23 était associée à une diminution du recrutement sur ERM de cette sous-unité mais aussi des sous-unités MED24 et MED6. En revanche, le recrutement de la sous-unité MED25 qui interagit directement avec ERM n'est pas affecté (comparer purification sur ERM dans cellules WT et shRNA MED23).

2 MED25

Comme pour MED23, nous avons voulu déterminer si MED25 était également nécessaire au recrutement de certains complexes médiateurs sur ERM *in vitro*. Nous avons donc réalisé les mêmes purifications que précédemment en utilisant des extraits nucléaires de cellules HeLa sauvages (WT) exprimant de façon stable un shRNA dirigé contre MED25 (shRNA MED25) (Figure 52). Comme pour le shRNA dirigé contre MED23, une diminution de l'expression de MED25 provoque une nette diminution de son recrutement sur ERM (comparer pistes ERM +/+ et -/-). En revanche, ceci n'entraîne qu'une très faible diminution du recrutement des sous-unités MED23 et MED6 et donc *a priori* des complexes médiateurs contenant ces sous-unités. Ainsi MED25 n'influence que faiblement le recrutement *in vitro* des complexes médiateurs sur ERM ou tout au moins des complexes médiateurs contenant la sous-unité MED6 et MED24 (Figure 52).

F Conclusions

Les sous-unités MED23 et MED25 du médiateur interagissent avec ERM et participent à son activation transcriptionnelle. N'ayant toutefois pas pu tester l'interaction d'ERM avec toutes les sous-unités du médiateur, nous ne pouvons pas écarter le fait que d'autres sous-unités interagissent et régulent également l'activité d'ERM. Il reste à déterminer si MED23 et MED25 sont bien recrutées par ERM sur les promoteurs de ses gènes cibles. De plus, il sera important de définir si cette activation transcriptionnelle est due au recrutement du complexe médiateur. Ces sous-unités semblent en effet avoir des capacités différentes concernant le recrutement *in vitro* de complexes médiateurs sur ERM et pourraient donc avoir des mécanismes d'action différents. Néanmoins, les expériences réalisées consistant en un recrutement *in vitro*, des expériences de CHIP permettront de déterminer si MED25 et MED23 sont capables, dans un contexte cellulaire, de recruter les complexes médiateurs sur les promoteurs des gènes cibles d'ERM. Ces expériences permettront également d'éclaircir un rôle potentiel de MED25 indépendant du recrutement du médiateur par cette sous-unité.

III CoAA et ERM

A Présentation

La protéine CoAA (Coactivator Activator) doit son nom au fait qu'elle ait été découverte comme un Activateur du Coactivateur transcriptionnel TRBP (Thyroid hormone receptor-binding protein) (Iwasaki et al., 2001). L'interaction avec ce coactivateur se fait par une zone riche en répétitions XYXXQ (où X= G, A, S ou P) nommée « domaine YQ ». La mutation des tyrosines en alanines dans cette séquence répétée (mutant nommé AxxQ) abolit l'interaction avec TRBP et provoque une perte de l'activation transcriptionnelle (Iwasaki et al., 2001). Ce motif répété possède une capacité transactivatrice dans le système hétérologue Gal4. Il présente une forte homologie avec la séquence répétée (S/G-Y-G-Q-Q-Q/S), également connue pour activer la transcription et retrouvée dans les ribonucléoprotéines EWS (Ewing's sarcoma), TLS/FUS (translocation/fusion in liposarcoma) et SYT (synovial sarcoma translocation protein) (Sui et al., 2007) (Perani et al., 2005).

CoAA appartient à la famille des ribonucléoprotéines car elle possède deux motifs de reconnaissance des ARN (RRM pour RNA Recognition Motifs) situés en position N-terminale (Figure 53). Par ces motifs, CoAA participe à la régulation des décisions d'épissage alternatif (Auboeuf et al., 2005; Auboeuf et al., 2004a; Auboeuf et al., 2004b).

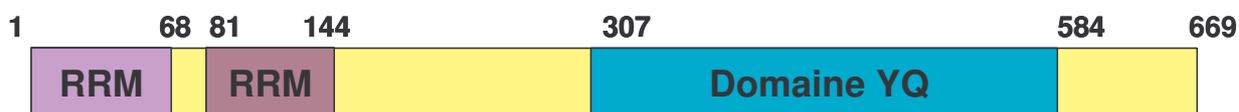


Figure 53 : Domaines fonctionnels de la protéine CoAA

RRM : Rna Recognition Motif : Domaine de reconnaissance des ARN
 Domaine YQ : Domaine riche en répétitions XYXXQ

CoAA interagit également avec le coactivateur CBP (Iwasaki et al., 2001), le domaine extracellulaire du récepteur de l'hormone de croissance (GH-binding protein, GHBP) (Conway-Campbell et al., 2008) et le proto-oncogène SYT (Iwasaki et al., 2005; Perani et al., 2005). Ce dernier est un coactivateur de récepteur nucléaire associé au complexe SWI/SNF « remodeleur » de la chromatine et est impliqué dans les translocations chromosomiques à l'origine des sarcomes synoviaux (Kato et al., 2002). L'interaction de CoAA avec les coactivateurs SYT et GHBP permet d'augmenter de façon synergique leur pouvoir transactivateur. Enfin, CoAA interagit avec RUNX2 (runt-related transcription factor 2), un facteur de transcription contrôlant l'expression de gènes impliqués dans de nombreux processus tels que la différenciation ou le fonctionnement des ostéoblastes ou des cellules

hématopoïétiques (Li et al., 2009). Dans ce cas précis, CoAA interagit avec le domaine de fixation à l'ADN de type Runt de ce facteur ce qui aboutit à une diminution de sa fixation à l'ADN. Ce facteur pouvant agir en tant qu'activateur ou répresseur selon les promoteurs, l'interaction avec CoAA permet d'augmenter ou diminuer l'expression de ses gènes-cibles tels que *axin2* ou *osteocalcin* (Li et al., 2009). A l'exception de CBP et GHBP pour lesquels le domaine d'interaction n'a pas été recherché, tous les interacteurs découverts interagissent avec le domaine YQ de CoAA (Iwasaki et al., 2001) (Perani et al., 2005) (Iwasaki et al., 2005) (Li et al., 2009).

CoAA est largement exprimée dans les tissus embryonnaires et peut subir des épissages alternatifs (Brooks et al., 2009; Iwasaki et al., 2001; Yang et al., 2007). Par exemple, des épissages alternatifs peuvent conduire à l'expression d'un variant de CoAA nommé CoAM (Coactivator Modulator) qui est dépourvu de domaine YQ. Une balance entre les isoformes CoAA et CoAM a clairement été impliquée dans la régulation du développement embryonnaire précoce (Yang et al., 2007). *Coaa* peut également être impliqué dans des épissages intergéniques faisant intervenir le gène *rbm4* situé en aval de *coaa*. La balance entre ces épissages est, elle aussi, impliquée dans la régulation de la différenciation au cours de l'embryogenèse (Brooks et al., 2009). Ainsi, l'expression de CoAA et de ses variants est finement régulée au cours de l'embryogenèse.

La protéine CoAA est surexprimée dans de nombreux cancers primaires. De plus, il a été démontré que l'ARNm de CoAA présente également une forte expression dans des cancers variés (Sui et al., 2007).

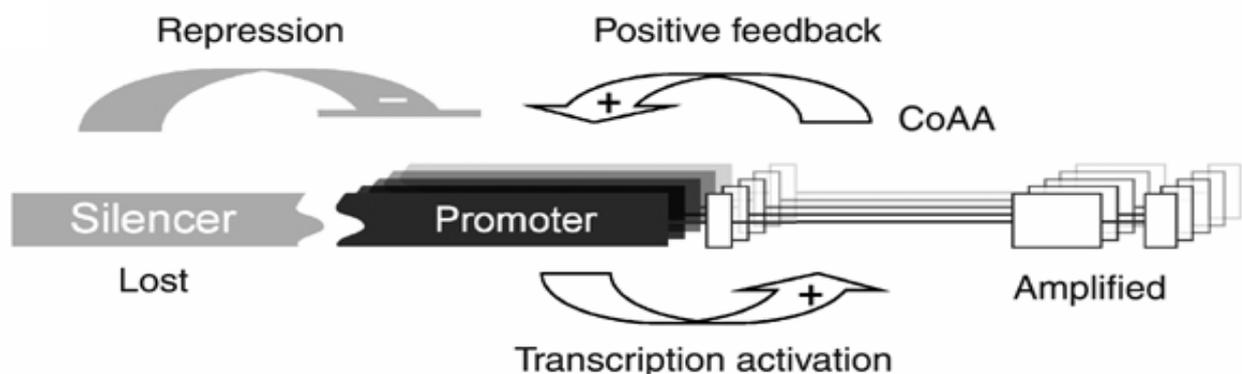


Figure 54: Modèle de l'activation de CoAA dans les cancers.

Le gène *coaa* est activé par son promoteur basal (en noir) et inhibé par une séquence « silencer » en aval (en gris). La surexpression de CoAA, produite par une amplification des gènes, stimule son propre promoteur via une boucle de régulation positive. La perte de la séquence « silencer » conduit à une surexpression de CoAA cyclique. D'après (Sui et al., 2007).

Résultats

La surexpression de CoAA dans ces cancers est due à trois facteurs : (i) une amplification du gène, (ii) une perte des séquences « silencer » présentes en amont du promoteur, et (iii) une boucle de régulation positive car CoAA active la transcription de son propre gène (Sui et al., 2007) (Figure 54). Il a également été montré que la surexpression de CoAA provoque l'apparition d'un phénotype transformé des NIH 3T3 dans des tests en soft agar. Ce phénotype est dû au domaine YQ de CoAA car celui-ci présente les mêmes capacités transformantes que la fusion EWS-FLI1 quand il est fusionné à FLI1 (Sui et al., 2007). A l'opposé, des siRNA dirigés contre CoAA provoquent une diminution dose-dépendante de la prolifération des cellules de la lignée cancéreuse pulmonaire H69 (Sui et al., 2007).

Paradoxalement, la sous-expression de CoAA est observée dans certains cancers tels que les carcinomes rénaux. Dans ce modèle cellulaire, CoAA agirait comme un suppresseur de tumeur en réprimant l'expression du proto-oncogène c-Myc par le recrutement de HDAC3 (Kang et al., 2008).

B CoAA et ERM : interaction et fonctionnalité

Nous avons identifié parmi les interacteurs potentiels d'ERM le coactivateur CoAA qui s'est révélé être un interacteur direct d'ERM (voir figure 31, page 94). Cette observation nous a amené à déterminer si ERM et CoAA étaient présentes au sein de mêmes complexes dans un contexte cellulaire et à rechercher les zones impliquées dans cette interaction. Enfin, nous avons évalué l'impact de ce partenaire sur l'activité transcriptionnelle d'ERM. Les résultats de cette étude ont été soumis à *Biochemical Journal*.

La première étape de ce travail a consisté à confirmer par GST-pull down l'interaction directe entre ERM et CoAA (article, figure 1A) et à étendre cette approche à PEA3 et ER81, les deux autres membres du groupe PEA3, qui interagissent également avec CoAA comme l'illustre la figure 1 C de l'article. Nous avons aussi démontré qu'ERM et CoAA sont présentes au sein des mêmes complexes *in vivo* par des expériences de co-immunoprécipitation (article, figure 1B).

Nous avons ensuite recherché les régions d'ERM et de CoAA nécessaires à leur interaction en réalisant des expériences de GST pull-down avec des constructions délétées ou mutantes. Comme l'illustre la figure 2A de l'article, ERM interagit avec la construction CoAAC qui contient le domaine YQ mais est dépourvue des RRM. *A contrario*, ERM n'interagit ni avec le variant naturel CoAM qui ne contient que les deux domaines RRM ni avec le mutant AxxQ dans lequel les tyrosines du domaine YQ ont été mutées en alanines. Ces résultats indiquent que la fixation d'ERM est dépendante du domaine YQ de CoAA.

En ce qui concerne ERM, nos résultats indiquent clairement que le domaine ETS et la partie C-terminale d'ERM ne sont pas impliquées dans l'interaction avec CoAA (article, figure 2B). Des délétions plus importantes de la partie C-terminale d'ERM entraînent une diminution de la fixation de CoAA (article, figure 2B). Des résultats similaires sont obtenus lors de délétions progressives de la partie N-terminale (article, figure 2 C). L'ensemble de ces résultats suggère que la région située entre les acides aminés 1 et 370 d'ERM est nécessaire pour permettre une interaction optimale avec CoAA.

Nous avons ensuite analysé l'impact de ce partenaire sur l'activité transcriptionnelle d'ERM dans les cellules RK13. Comme l'illustre la figure 3A de l'article, des doses croissantes de plasmide CoAA ont peu d'effet sur l'activité basale du promoteur EndoA. En revanche, lorsqu'ERM est co-exprimée, CoAA augmente de façon dose dépendante l'activation transcriptionnelle induite par ce facteur. Cet effet n'est pas dû à une variation du

Résultats

taux d'ERM puisque la quantité d'ERM n'est pas significativement modifiée en présence de CoAA (article, figure 3A, panel de droite). Le mutant AxxQ, qui n'interagit pas avec ERM, ne stimule pas l'activité d'ERM ce qui signifie qu'une interaction directe entre les deux partenaires est nécessaire. De même, sur le promoteur *Icam-1*, CoAA, mais non AxxQ, augmente l'activation transcriptionnelle d'ERM (article, figure 3B). Enfin, CoAA stimule également l'activité transcriptionnelle des deux autres membres du groupe PEA3, ce qui suggère que cette protéine régule leur activité par un mécanisme similaire (article, figure 3C).

Comme les RRM de CoAA ne sont pas nécessaires à l'interaction avec ERM, nous avons voulu déterminer s'ils étaient également non requis pour l'activation d'ERM. En fait, la construction CoAAC dépourvue de ces domaines n'est pas capable d'augmenter l'activité transcriptionnelle d'ERM (article, figure 4A) bien qu'elle interagisse toujours avec cette dernière (article, figure 4B). Ceci suggère que les RRM sont nécessaires pour permettre l'activation transcriptionnelle induite par CoAA. Afin de déterminer si les RRM de CoAA sont spécifiquement requis ou s'ils peuvent être remplacés par ceux d'une autre ribonucléoprotéine ayant la même architecture que CoAA telle que hnRNP A1, nous avons étudié l'effet de leur substitution sur l'activation d'ERM. Bien que la protéine chimérique contenant les RRM de hnRNP A1 interagisse toujours avec ERM (article, figure 4A), elle n'est pas capable de stimuler l'activité transcriptionnelle de ce facteur (article, figure 4B). Des résultats similaires ont été obtenus avec les RRM de la protéine p54nrb (donnée non montrée). Ceci démontre que les RRM de CoAA sont spécifiquement requis pour permettre l'activation d'ERM.

Ainsi deux domaines différents de CoAA sont nécessaires à la fixation et à l'activation d'ERM. Nous avons démontré que les constructions CoAAC et CoAM (contenant l'un ou l'autre des domaines requis) diminuaient l'activité d'ERM, agissant probablement comme des dominants négatifs de CoAA (article, figure 5 A et B) en interférant respectivement dans l'interaction avec ERM et dans le probable recrutement de facteurs cellulaires nécessaires à l'activation d'ERM.

Enfin, le rôle de CoAA endogène a été évalué par l'utilisation de siRNA. La sous-expression de CoAA (article, figure 6A) diminue de moitié l'activation induite par ERM du gène cible *Icam-1* (article, figure 6B), ce qui suggère que la protéine CoAA endogène est bien impliquée dans la régulation de l'activité transcriptionnelle d'ERM sur ce promoteur.

The Coactivator Activator CoAA regulates the transcriptional activity of ERM, a PEA3 group member

**Kathye VERREMAN, Jean-Luc BAERT, Alexis VERGER, Hervé DROBECQ,
Elisabeth FERREIRA, Yvan de LAUNOIT and Didier MONTE***

UMR 8161, Institut de Biologie de Lille, CNRS / Université de Lille Nord de France, Institut Pasteur de Lille, IFR 142, BP 447, 1 rue Calmette, 59021 Lille Cedex, France.

* To whom all correspondence should be addressed: Didier MONTE

Phone: +33 320 87 11 27 - Fax: +33 320 87 11 11

E-mail: didier.monte@ibl.fr

Short (page heading) title : CoAA regulates ERM transcriptional activity

Keywords : ETS transcription factor, PEA3 group, CoAA, ERM, transcriptional regulation, RRM

Abbreviations footnote :

CBP, CREB binding protein ; CMV, Cytomegalovirus ; CoAA, Coactivator activator ; CoAM, Coactivator Modulator ; DBD, DNA Binding Domain; E2F, E2 factor ; ER81, Ets related 81; ERM, ETS Related Molecule; ETS, E-Twenty Six; EWS, Ewing's sarcoma protein ; GAPDH, Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase ; GHBP, Growth Hormone-binding protein ; GST, glutathione S-transferase ; HeLa, Human cervical cancer cells; HEK-293 cell, human embryonic kidney 293 cell ; hnRNP, heterogenous nuclear ribonucleoprotein ; ICAM-1, Intracellular adhesion molecule 1 ; MMTV, mouse mammary tumor virus ; NIH-3T3, Mouse embryonic fibroblast cell line ; NP40, Nonidet P40 ; p54nrb,

nuclear RNA-binding protein, 54 kDa ; PEA3, Polyomavirus enhancer activator 3 ; RK13, Rabbit kidney cells ; RNP, Ribonucleoprotein Domain ; RRM, RNA recognition motifs ; RT-PCR, Reverse Transcription PCR ; SEM, standard error of the mean ; siRNA, small interfering RNA ; SWI/SNF, SWItch/Sucrose NonFermentable ; SYT, synovial sarcoma translocation protein ; TAD, Transactivation Domain ; TLS/FUS ; Translocation/fusion in Liposarcoma ; TK, Thymidine kinase ; TRBP, Thyroid-hormone receptor binding protein ; U2OS, human osteosarcoma cells ; USF1, Upstream Stimulatory Factor 1.

SYNOPSIS

The PEA3 group (ERM, ER81 and PEA3) members of the ETS transcription factor family are involved in migration and dissemination processes during organogenesis and cancer development. To regulate their target genes, they interact with different partners. Here we show that the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP)-like protein CoAA (CoActivator Activator) interacts *in vitro* and *in vivo* with ERM. Moreover, ERM transcriptional activity is enhanced by CoAA overexpression and is decreased upon CoAA knock-down. Furthermore, we demonstrate that CoAA YQ domain, which contains tyrosine/glutamine-rich hexapeptide repeats, directly interacts with the N-terminal part of ERM whereas the two N-terminal RNA recognition motifs (RRM) of CoAA are required to enhance ERM transcriptional activity. ERM is the first transcription factor that interacts with CoAA and whose activity is directly modulated by CoAA. CoAA also binds and activates ER81 and PEA3, the two other members of the PEA3 group. Since CoAA is widely expressed in embryonic tissues and overexpressed in many cancers, CoAA might be an important regulator of PEA3 group member activity during embryogenesis and metastasis.

INTRODUCTION

The ETS transcription factors share a DNA-binding domain (ETS domain) of about 85 residues that binds the consensus DNA core sequence 5'GGAA/T 3' (for review [1]). Variations observed in this domain allowed ETS transcription factors to be dispatched in different groups [1]. ERM, ER81 and PEA3 belong to the PEA3 group. These transcription factors are often overexpressed in cancers with a disseminating phenotype and experimental modulation of their expression influences the invasive process, suggesting a key role of these factors in metastasis (for review [2, 3]). Moreover, PEA3 and ERM have been described as poor prognostic factors in ovarian and breast tumors respectively [4, 5]. PEA3 group members are prone to post-translational regulation such as phosphorylation, acetylation, ubiquitinylation or sumoylation [6-13]. These post-translational modifications modulate their transcriptional activity. Moreover, PEA3 group members' transcriptional activity is regulated by interaction with protein partners such as Jun, USF-1 or CBP/p300 [12, 14, 15].

Coactivator Activator (CoAA/RBM14) was originally reported as an activator of the coactivator TRBP (Thyroid-hormone receptor binding protein) [16]. CoAA was also isolated as a partner of the proto-oncogene synovial sarcoma translocation protein (SYT), a Nuclear Receptor Coactivator known to bind the SWI/SNF chromatin-remodeling complex [17, 18]. CoAA is a hnRNP-like protein containing two N-terminal RNA Recognition Motifs (RRM), which allow it to act as a regulator of mRNA splicing [19-21]. The central YQ Domain of CoAA that is required for the interaction with TRBP and SYT, possesses 27 tyrosine/glutamine-rich hexapeptide repeats and exhibits transcriptional activity [16, 17]. Such a domain is also present in the oncoproteins EWS (Ewings sarcoma), TLS/FUS (Translocation/fusion in Liposarcoma) and SYT [17, 22]. CoAA is widely expressed in embryonic tissues and its expression is prone to alternative splicing [23, 24]. For example,

splicing events can switch CoAA expression to the expression of its spliced variant CoAM (Coactivator Modulator). Balance between CoAA and CoAM isoforms has been clearly implicated in early embryonic development regulation [23, 24]. CoAA is also overexpressed in a variety of cancers and its overexpression in NIH-3T3 cells increases cell proliferation and promotes colony formation in soft agar assays [22]. Paradoxically, underexpression of CoAA transcripts is observed in certain cancers such as renal carcinoma. In this cellular model, it has been recently demonstrated that CoAA could act as a tumor suppressor by repressing the expression of the proto-oncogene c-Myc [25].

In this work, we have developed an experimental approach using biotinylated ERM as a bait to fish and identify new potential ERM partners from nuclear extracts by mass spectrometry. This approach allows us to identify CoAA as a new ERM binding protein. We show that endogenous ERM and CoAA interact in a cellular context and that CoAA modulates ERM transcriptional activity by interacting with ERM via its YQ Domain. Interestingly, our results also indicate that the CoAA RRM domains are required to enhance ERM activity. Similar effects are also observed for the two other PEA3 group members, PEA3 and ER81. Finally, we found that CoAA knockdown decreases the ERM-induced activation of ICAM-1. CoAA could be an important regulator of the PEA3 group member activities particularly in cancer cells and during embryonic development.

EXPERIMENTAL

Plasmid constructs

The pSG5 expression vectors encoding full-length ERM, ER81 and PEA3 have been described elsewhere [11, 13, 26, 27]. The flag-tagged ERM vector (pSV flag-ERM) is described in [10]. The glutathione *S*-transferase (GST) fusion protein expression vectors have been described previously [28, 29]. The vectors expressing flag-tagged-CoAA, flag-tagged-

CoAM and flag-tagged-AxxQ were kindly provided by Dr L. Ko (Medical College of Georgia, Institute of Molecular Medicine and Genetics, Augusta, USA) [16, 22]. The vectors expressing myc-tagged-CoAA, myc-tagged-CoAAC, myc-tagged-A1NCoAAC and myc-tagged-hnRNPA1 were a gift from Dr D. Auboeuf (INSERM U685, Institut Universitaire d'Hematologie, Hopital Saint-Louis, Paris, France) [19]. The pDelta-EndoA-luc was a generous gift from Dr Iniguez-Lluhi (University of Michigan Medical School, West Medical Center Dr Ann Arbor, USA) [30]. The CMV β -galactosidase vector used to normalize transfection was previously described [13].

Isolation of CoAA

After washing in PBS, HeLa cells were lysed in Hypotonic-buffer (10 mM Hepes KOH pH 7.9, 10 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.1% NP40, 1X complete protease inhibitor) for 5 min on ice. After centrifugation, cytoplasmic supernatant was removed and the remaining nuclear pellet was resuspended in benzonase buffer (20 mM Hepes pH 8, 150 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.1% NP40, 1X complete protease inhibitor (Roche)), and thereafter a benzonase digestion was performed for 2 hours at 16°C. After centrifugation at 100,000 X g for 1 hour at 4°C, the supernatant was incubated for 2 hours at 4°C with biotinylated ERM 1-370 purified on streptavidin coupled beads, produced in *Escherichia coli* (detailed procedure is available upon request). The beads were then washed five times with benzonase buffer containing 250 mM NaCl and 2 times with benzonase buffer. The fished proteins were then eluted in Laemmli buffer, separated by SDS-PAGE, stained with Coomassie brilliant blue R-250, excised from the gel and identified by mass spectrometry as previously described [31].

In Vitro Protein–Protein Interaction

[³⁵S]methionine-labeled proteins were produced by using TNT T7 Quick Coupled Transcription-translation system (Promega). The GST fusion protein or GST alone bound to glutathione beads were incubated with the *in vitro* translated proteins in binding buffer containing 20 mM Tris HCl (pH 7.4) 150 mM NaCl, 0.1% Triton, 40 µg/ml BSA, and 1 mM DTT for 2 h at room temperature. After extensive washing with the same buffer, the bound proteins were analyzed by SDS-PAGE and revealed by autoradiography.

Cell culture and transfections

Rabbit kidney RK13 cells, human U2OS osteosarcoma cells, Human cervical cancer HeLa cells and Human Embryonic Kidney HEK 293T cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (Gibco BRL) and grown at 37°C in a water-saturated 5% CO₂ atmosphere. Transient transfections were performed using the PEI Exgen 500 procedure (Euromedex, France). Luciferase activity was determined 24 h after transfection and normalized with respect to the β-galactosidase activity (as an internal control of transfection efficiency) as previously described [10]. The data presented are means ± SEM of at least three independent experiments. SiRNA SMRT pool (Dharmacon) was used to knockdown CoAA in the cells. SiRNA were transfected with Interferin (Polyplus-transfection) according to manufacturer's protocol.

Immunoprecipitation and Western blot analyses

U2OS cells were lysed in co-immunoprecipitation buffer (50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 125 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, 1 mM DTT and 0.5% Triton X100) with 1X complete

protease inhibitor and the cellular extract was centrifuged at 100,000 X g for 30 min at 4°C. The supernatant was then immunoprecipitated overnight with anti-ERM antibody (anti-ERM₃₅₅₋₅₁₀) [13, 26, 27, 32] or pre-immune serum followed by incubation with protein A-Sepharose beads for an additional 1 h at 4°C. After washing with lysis buffer, the immunopurified proteins were eluted with Laemmli sample buffer. Immunopurified proteins and total cellular extracts were analyzed by SDS-PAGE and then electrophoretically transferred to nitrocellulose membranes. Immunoblot analyses were performed with rabbit anti-ERM antibody (anti-ERM₁₂₋₂₂₆ which cross-reacts with the two other PEA3 group members [28]), anti-CoAA (Bethyl), anti-flag (Sigma) or anti-Actin antibody (sc1616, Santa Cruz Biotechnology), followed by treatment with horseradish-peroxidase-conjugated secondary antibody or horseradish peroxidase conjugated anti-rabbit Immunoglobulin G TrueBlot (eBioscience). Immune complexes were visualized by enhanced chemiluminescence according to manufacturer's instructions (Santa Cruz Biotechnology). Prestained broad-range molecular weight markers (New England BioLabs) were used as standards in each SDS-PAGE gel.

RT-PCR (Reverse Transcription-PCR)

RNA was isolated from control or CoAA-downregulated HeLa cells transfected with 200ng of pSG5 ERM using TRI Reagent (Molecular Research Center, Inc) as described by the manufacturer and cDNAs were synthesized using High Archive cDNA kit (Applied Biosystems). Quantitative PCR was performed using the brilliant SYBRgreen qPCR master mix (Stratagene) on a MX3005P instrument as described by the provider with the following specific primers: *gapdh* (sense 5'-AAGGTGGTGAAGCAGGCGT-3' and antisense 5'-AGGTCCACCACCCTGTTGC-3') and *ICAM1* (sense 5'-GCCAGGAGACACTGCAGACA-3' and antisense 5'-TGGCTTCGTCAGAATCACGTT-3').

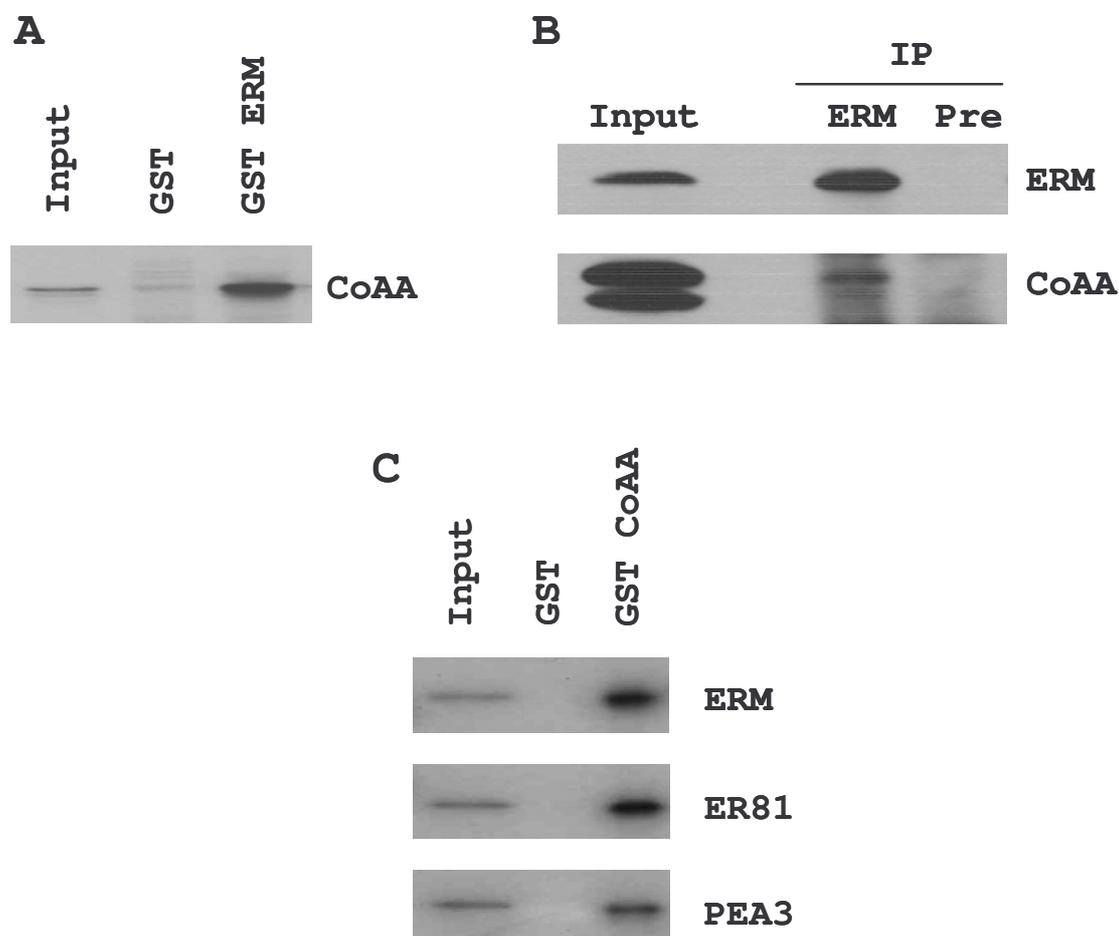


FIGURE 1. ERM and CoAA interact *in vitro* and *in vivo*

(A) *In vitro*-translated [35 S]methionine-labeled COAA was incubated with GST or GST-ERM. 10% of *in vitro*-translated [35 S]methionine-labeled COAA used is shown as Input. (B) Co-immunoprecipitation of endogenous ERM and CoAA from U2OS cells. Immunoprecipitation was performed with anti-ERM antibody or preimmune serum (Pre) and proteins were detected as indicated using antibodies specific for ERM and CoAA. (C) *In vitro*-translated [35 S]methionine-labeled ERM, PEA3 or ER81 were incubated with GST or GST-CoAA. Input: 10% of *in vitro*-translated [35 S]methionine-labeled protein used in the reaction.

RESULTS

ERM and CoAA interact *in vitro* and *in vivo*

In an attempt to isolate new nuclear proteins that might functionally modulate ERM transcriptional activity, we developed an experimental approach using biotin tagged ERM (1-370) fragment immobilized on streptavidin beads as a bait. ERM-bound nuclear proteins were then identified by mass spectrometry. Among them, we found a well-known transcriptional activator [16, 17, 19, 33], Coactivator Activator (CoAA) (data not shown).

To confirm *in vitro* direct interaction between ERM and CoAA, we performed GST-pull down assay using GST-ERM and *in vitro*-translated [³⁵S]methionine-labeled CoAA. As shown in Figure 1A, radiolabeled CoAA strongly interacted with GST-ERM but not with GST alone. To determine whether ERM associates with CoAA *in vivo*, extracts of Human U2OS osteosarcoma cells were immunoprecipitated with anti-ERM antibodies followed by western blotting with CoAA and ERM specific antibodies. As shown in Fig. 1B, significant amount of endogenous CoAA were co-precipitated with anti-ERM but not with pre-immune serum, suggesting that ERM associates with CoAA in the cell.

The *in vitro* study was extended to the two other PEA3 group members, i.e. ER81 and PEA3. As ERM, these transcription factors strongly interacted with GST-CoAA but not with GST protein in GST pull down experiments (Figure 1C). These results clearly identify CoAA as a binding partner for the PEA3 group members.

Mapping of the CoAA / ERM interaction domains

To narrow down the CoAA and ERM regions necessary for their interaction, we performed GST pull down experiments with different mutant and deletion constructs.

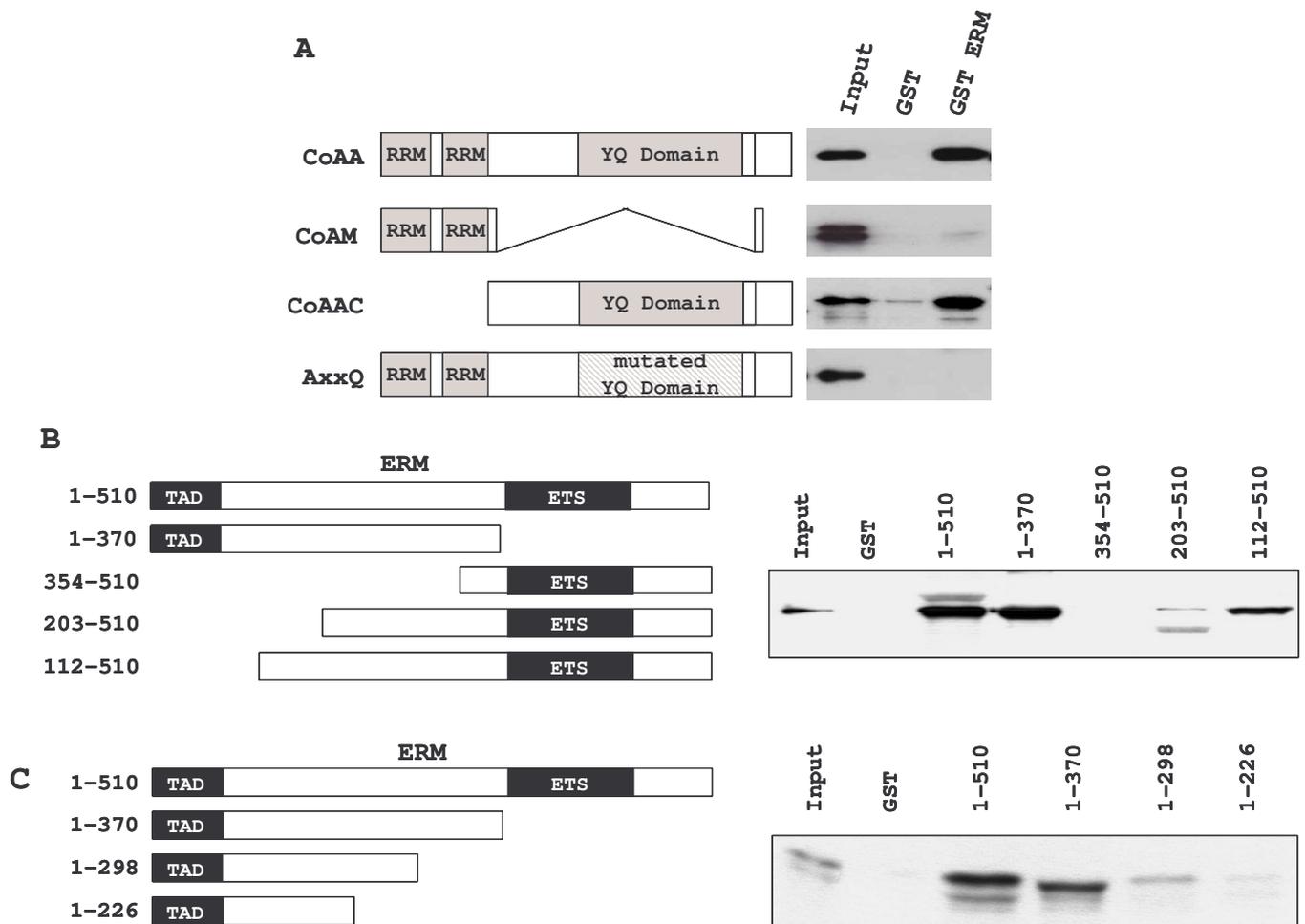


FIGURE 2. Mapping of the CoAA / ERM interaction domains

(A) Left panel: Schematic representation of CoAA and the deletion mutants used in this study. RRM: RNA Recognition Motifs, YQ Domain: Tyrosine/Glutamine-rich Domain. Right panel: *In vitro*-translated [35 S]methionine-labeled CoAA, CoAAC, CoAM or AxxQ were incubated with GST or GST-ERM. 10% of *in vitro*-translated [35 S]methionine-labeled proteins used is shown as Input. (B) Left panel: Schematic representation of ERM and the N-terminal deletion mutants. TAD: N-terminal transactivation domain, ETS: ETS DNA Binding Domain. Right panel: *In vitro*-translated [35 S] methionine-labeled CoAA was incubated with GST, GST-ERM or GST fused to various N-terminal deletion mutants. 10% of *in vitro*-translated CoAA used were shown as Input. (C) Left panel: Schematic representation of ERM and the C-terminal deletion mutants. Right panel: *In vitro*-translated [35 S] methionine-labeled CoAA was incubated with GST, GST-ERM or GST fused to various C-terminal deletion mutants as described in B.

We first used (Figure 2A, left panel) the natural CoAA spliced variant CoAM which only contains the two N-terminal RRM domains and a N-terminal deletion mutant lacking these domains (CoAAC). CoAAC but not CoAM significantly interacted with GST-ERM (Figure 2A right panel) suggesting that the C-terminal part of CoAA containing the YQ domain is responsible for ERM-CoAA interaction. We then tested the AxxQ mutant in which all tyrosine residues of the YQ domain were mutated into alanines [22]. As for CoAM, no interaction with GST-ERM was observed, indicating that ERM binding is dependent of the YQ domain of CoAA.

Concerning ERM, our results clearly demonstrated that the ETS DNA binding domain and the C-terminal part of ERM are totally dispensable for ERM-CoAA interaction. As shown in figure 2B, CoAA strongly interacted with ERM₁₋₅₁₀ and ERM₁₋₃₇₀ but not with ERM₃₅₄₋₅₁₀. Further ERM C-terminal deletions progressively decreased CoAA interaction (Figure 2C, compare ERM₁₋₃₇₀, ERM₁₋₂₉₈ and ERM₁₋₂₂₆) indicating that residues 226-370 of ERM are important for CoAA recruitment. Similar results were obtained with progressive ERM N-terminal deletion constructs (Figure 2C, compare ERM₁₋₅₁₀, ERM₁₁₂₋₅₁₀ and ERM₂₀₃₋₅₁₀). These results suggest that the region between residues 1 and 370 is necessary for optimal interaction between ERM and CoAA. Strong CoAA-ERM interaction is thus probably mediated through the YQ CoAA domain and the 1-370 ERM region.

CoAA overexpression increases ERM transcriptional activity

We next investigated the effect of CoAA on ERM transcriptional activity. Luciferase reporter gene assays were performed using ERM and the EndoA luciferase reporter plasmid. As shown in Figure 3A, CoAA alone did not significantly enhance basal EndoA promoter transcriptional activity. However, when co-expressed with ERM, CoAA increased ERM

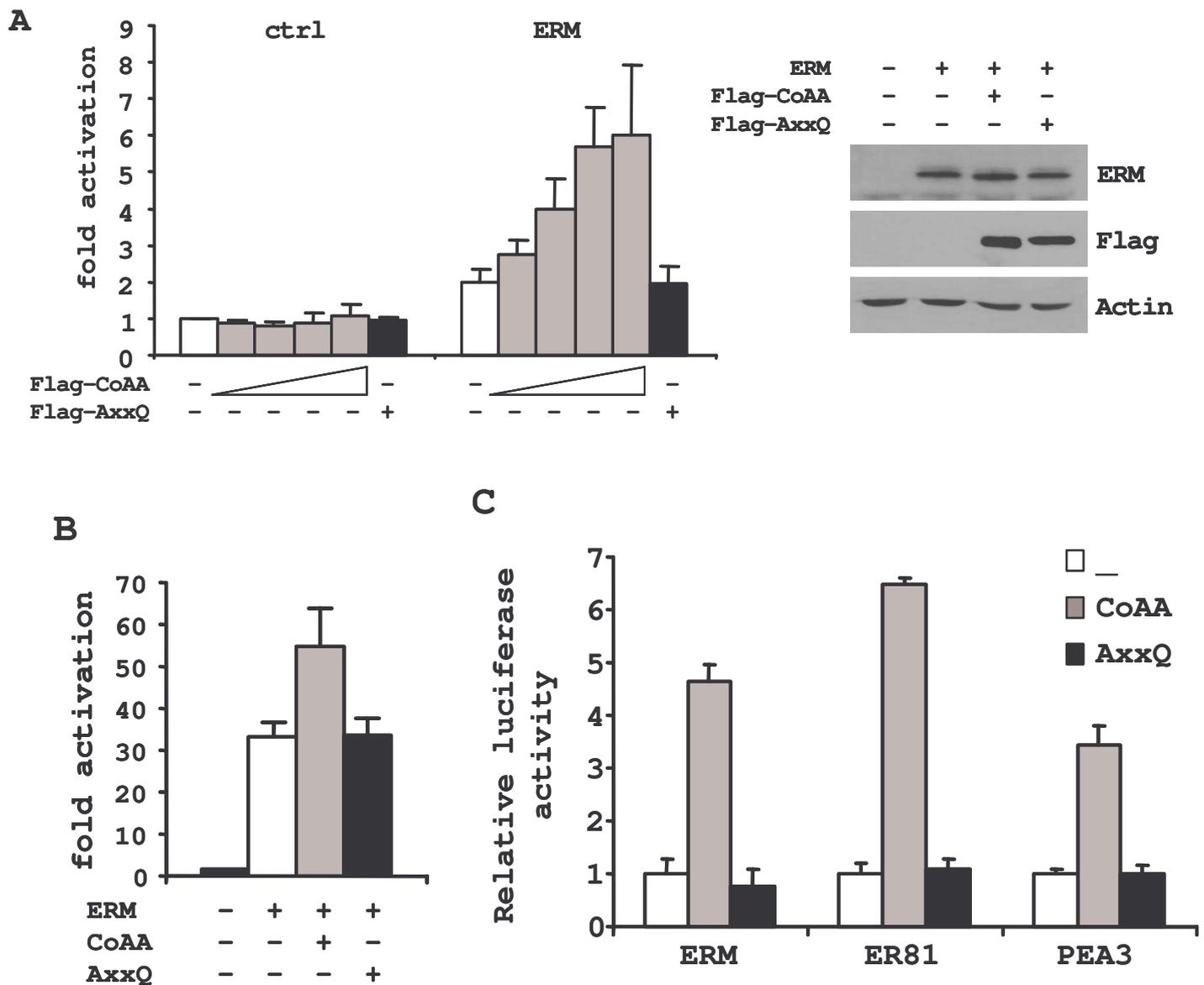


FIGURE 3. CoAA increases ERM transcriptional activity

(A) Left panel: RK13 cells were transfected without (ctrl) or with ERM and increasing quantity of CoAA together with EndoA-Luc reporter plasmid. Right panel: ERM was transfected with CoAA or AxxQ in RK13 cells and protein levels were assessed by immunoblotting as indicated. (B) CoAA increases ERM-dependent transcription of ICAM-1 promoter. RK13 cells were transfected with the ICAM-1-Luc reporter plasmid, ERM and CoAA or AxxQ. (C) RK13 cells were transfected with ERM, ER81 or PEA3 with or without CoAA together with EndoA-Luc reporter.

induced EndoA promoter transcriptional activity in a dose-dependent manner. Moreover, the AxxQ mutant, that is unable to recruit ERM, did not stimulate ERM transcriptional activity indicating that a direct interaction between the two partners was necessary. The CoAA effect was not due to a change in ERM protein level since CoAA or AxxQ mutant expression did not significantly affect ERM amounts in transfected RK13 cells (Figure 3A right panel).

We also performed experiments with a ICAM-1 luciferase reporter construct. As observed for EndoA, CoAA, but not AxxQ, increased ERM-induced transcriptional activity of the ICAM-1 promoter (Figure 3B). So, CoAA increased ERM-dependent transcription through the CoAA YQ domain on different Ets-reporters constructs. However, CoAA is unable to stimulate E2Fs transcription factors activity (data not shown) suggesting that it does not act as a general transcription factor activator.

We next investigated whether CoAA affects the transcriptional activity of the two others PEA3 group members. Figure 3C clearly shows that PEA3 and ER81 transcriptional activities of the EndoA promoter were stimulated by CoAA but not by AxxQ. These results suggest that CoAA regulates ERM, PEA3 and ER81 activity through a similar pathway.

CoAA RRM domains are required for the CoAA-mediated activation of ERM activity

Since CoAA RRM domains were dispensable for CoAA-ERM interaction, we next investigated whether they were also dispensable for CoAA-dependent ERM activation. For this purpose, luciferase reporter gene assays were performed using CoAAC (CoAA without its RRM domains). As shown in Figure 4, this CoAA deletion mutant was unable to stimulate ERM activity on EndoA promoter reporter (Figure 4A) although it still interacted with ERM (Figure 4B). This suggests that the interaction with ERM is not sufficient to induce the transcriptional activation and that the RRM domains are required in this process. The RRM domains share a conserved structure containing two short conserved sequences called RNP-1

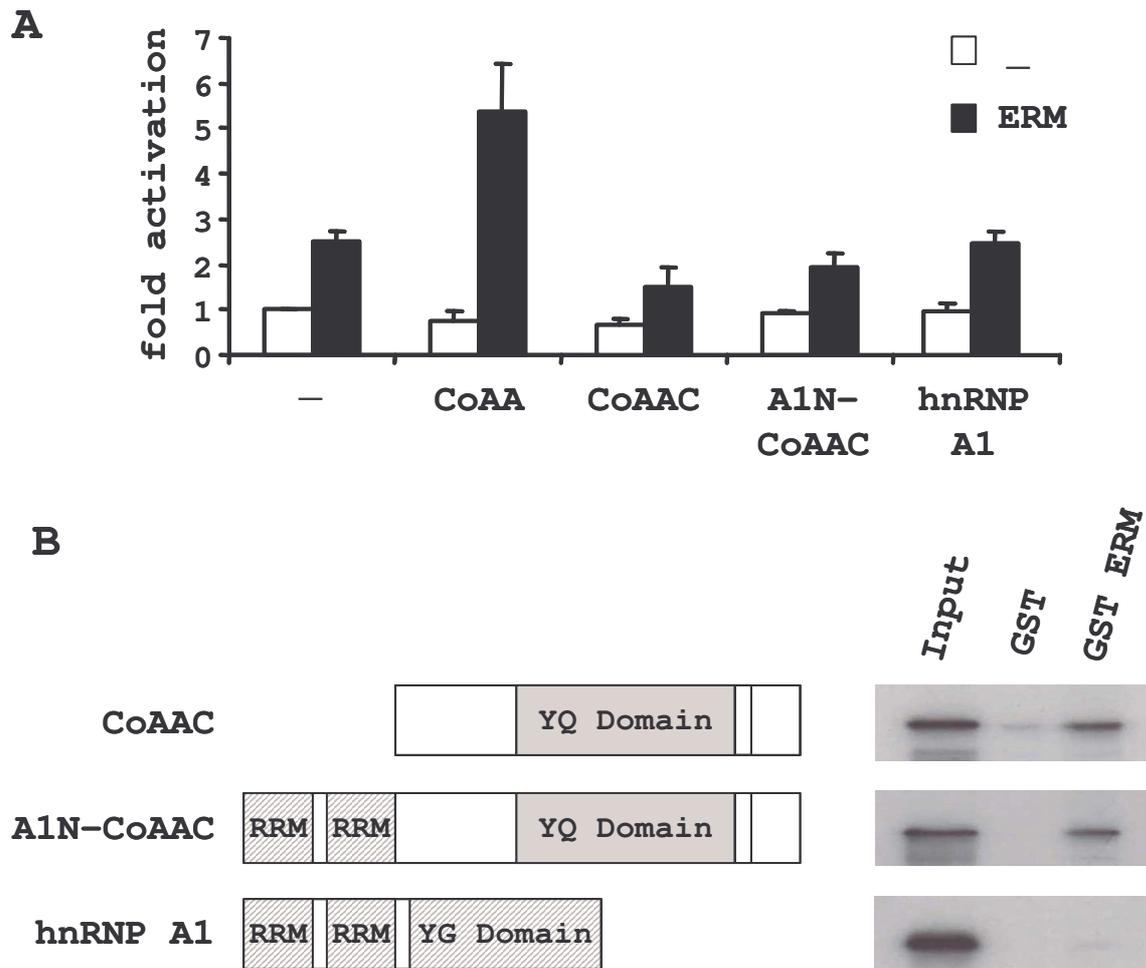


FIGURE 4. CoAA RRM s are necessary for CoAA activating function on ERM

(A) RK13 cells were transfected with ERM and either CoAA, CoAAC, A1N-CoAAC or hnRNP A1 together with EndoA-Luc reporter plasmid. (B) Left panel: Schematic representation of CoAA and the deletion mutants. YQ Domain: glycine- and tyrosine-rich auxiliary domain. Right panel: *In vitro*-translated [³⁵S]methionine-labeled CoAAC, A1N-CoAAC or hnRNP A1 were incubated with GST or GST-ERM. 20% of *in vitro*-translated [³⁵S]methionine-labeled protein used is shown as Input.

(Ribonucleoprotein Domain-1) and RNP-2, which form a four-stranded β -sheet backed by two α -helices [34]. Interestingly, CoAA shares similar architecture with two others hnRNP-related proteins, p54nrb and hnRNPA1: two N-terminal RRM s followed by an auxiliary domain. Moreover, RRM s of either hnRNPA1 or p54nrb can partially replace CoAA RRM s to mediate some of the CoAA transcriptional activity [19]. We thus evaluated the effect of CoAA RRM s on ERM by switching them with the related RRM s of hnRNPA1. As shown in Figure 4B, in contrast to hnRNPA1, A1N-CoAAC (CoAA with hnRNPA1-RRM s) interacted with ERM, confirming that the YQ domain is sufficient to recruit ERM. However, like hnRNPA1, A1N-CoAAC was unable to stimulate ERM transcriptional activity of the EndoA reporter construct (Figure 4A). Similar results were also obtained with the N-terminal RRM of p54nrb (data not shown). Taken together, our results indicate that the specific CoAA RRM s are required to mediate CoAA effect on ERM transcriptional activity even if they are dispensable for the interaction.

CoAAC and CoAM repress ERM transcriptional activity

Since two different CoAA domains were required for the interaction and the regulation of ERM transcriptional activity, we performed luciferase reporter gene assays on the ICAM-1 reporter construct to detect potential inhibitory effect of CoAAC and CoAM. As shown in Figure 5, CoAAC as well as CoAM decreased ERM transcriptional activity on ICAM-1 promoter in a dose dependent manner. Since CoAAC interacted with ERM, it acts probably by interfering with endogenous CoAA interaction with ERM while CoAM probably competes with cellular factors necessary for CoAA-dependent stimulation of ERM transcriptional activity.

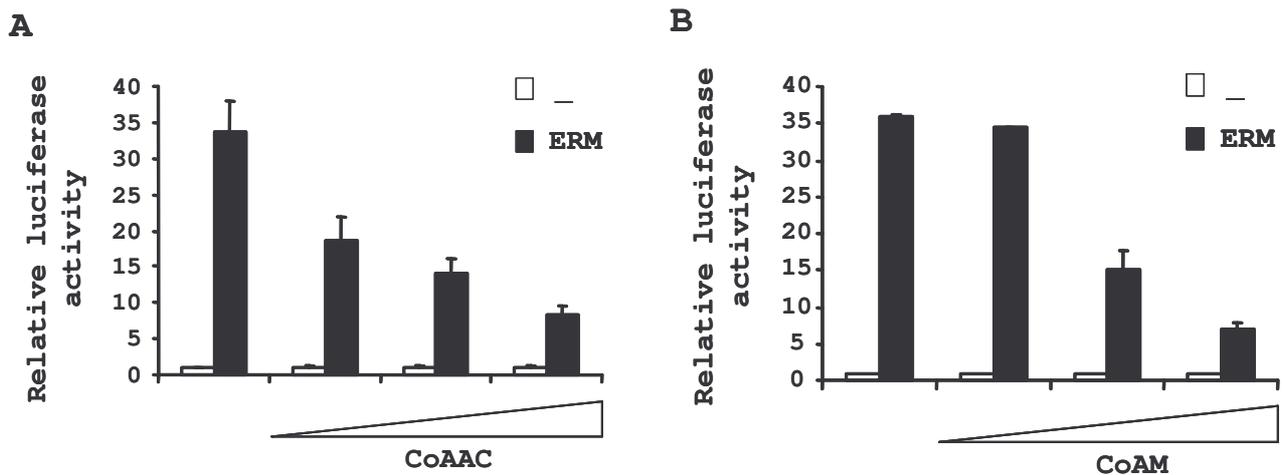


FIGURE 5. CoAAC and CoAM repress ERM transcriptional activity.

(A) RK13 cells were transfected with ERM and increasing quantity of CoAAC together with ICAM-1-Luc reporter plasmid. (B) RK13 cells were transfected with ERM and increasing quantity of CoAM together with ICAM-1-Luc reporter plasmid.

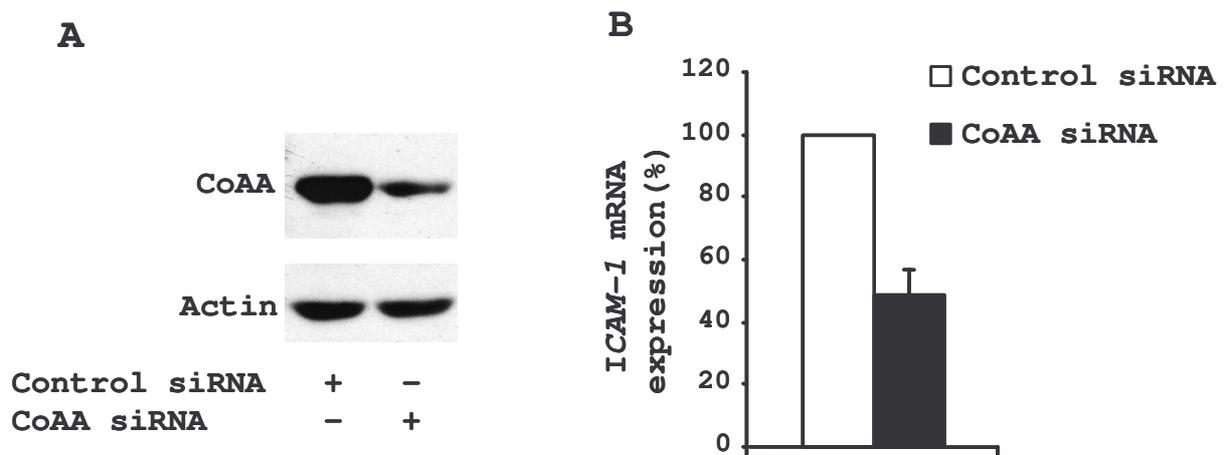


FIGURE 6. Endogenous CoAA knock-down decreases ERM transcriptional activity (A) Lysates were prepared from HeLa cells transfected by control siRNA or CoAA siRNA and equal protein samples were subjected to immunoblot analysis using specific antibodies as indicated. (B) CoAA siRNA decreases ERM-induced endogenous ICAM-1 transcription: HeLa cells were transfected with control siRNA or CoAA siRNA in presence of ERM and were used to determine the relative mRNA expression levels of *ICAM1* assessed by quantitative RT-PCR. Results are expressed as ratios of mRNA levels of *ICAM1* to *Gapdh* (endogenous control standard).

CoAA knock-down decreases ERM transcriptional activity.

The effect of CoAA knock-down on ICAM-1, an ERM target gene [26], was tested by QPCR in HeLa cells in which ERM expression induced endogenous ICAM-1 transcription (data not shown). To evaluate the role of endogenous CoAA in this process, we thus compared the ICAM-1 mRNA levels in cells overexpressing ERM in the absence and in the presence of CoAA siRNA. Our results clearly demonstrated that endogenous CoAA knock-down (Figure 5A) reduced by half the ICAM-1 mRNA level induced by ERM (Figure 5B), thus suggesting that endogenous CoAA is involved in ERM transcriptional activity on ICAM-1 promoter in a cellular context.

DISCUSSION

In the present study, we have identified Coactivator Activator (CoAA) as a new ERM partner. We demonstrated that CoAA and ERM interacted *in vitro* and in the cellular context and we showed that the CoAA domain involved in this interaction is the YQ Domain. So far, four CoAA interactors have been identified : the coactivator TRBP [16], the histone acetyltransferase CREB binding protein (CBP) [16], the proto-oncogene coactivator SYT [17, 18] and recently the extracellular domain of the GH Receptor (GH-binding protein, GHBP) [33]. Although the CoAA domain involved in the interaction with GHBP and CBP remains to be determined, the two other partners required the YQ Domain of CoAA [16, 17]. This domain contains more than 20 XYXXQ motifs (X denotes a small amino acid residue including G, A, S, and P) [16] and exhibits transcriptional activity [17]. Previous studies have shown that the interspersed aromatic residue repeats among the small residues are important for allowing protein-protein interactions [16, 18, 35, 36]. The present study confirmed that

this motif plays a crucial role in such interaction and particularly outlines the central role of the tyrosine residues since their mutation to alanine abolished the interaction with ERM. YQ domain is also present in the oncoproteins EWS (Ewings sarcoma), TLS/FUS (translocation/fusion in liposarcoma) and SYT [17, 22] and it would be interesting to test whether this domain allows interaction of these proteins with ERM.

The interaction domains defined on the known CoAA partners are relatively large regions: the SYT C-terminal transactivating domain (QPGY domain, AA 73–387) [17], the TRBP C terminus (AA 1641–2063) and the LXXLL-containing region (AA 719–999) [16] or the C-terminal region (AA 1195–2414) of histone acetyltransferase p300/CBP [16]. Nevertheless, no sequence homology can be observed between these domains. Concerning ERM, the integrity of the region upstream of the ETS domain (AA 1–370) is necessary for optimal interaction with CoAA. This region shows no significant homology with the interaction domains of the other CoAA partners. Interestingly, as observed in the SYT QPGY domain [17] and the TRBP domain involved in CoAA binding [16], the 72–370 region of the three PEA3 group members (ERM, PEA3 and ER81) are Proline-rich (about 15 % of Prolines). Since previous studies have shown that Proline-rich regions are important for protein-protein interactions [37, 38], a proline-rich region might be one of the feature necessary for CoAA binding on interacting domains.

CoAA increased ERM transcriptional activity on EndoA and ICAM-1 reporter promoter constructs in RK13 cells. This activating function was also observed in other cells such as human Hela cervical cancer or human U2OS osteosarcoma cells (data not shown). While CoAA can enhance the basal transcriptional activity of MMTV- and CMV-luciferase reporter genes in Hela cells [19], CoAA did not significantly increase the basal transcription of EndoA or ICAM-1 reporters indicating that CoAA probably acts directly on ERM activity.

Moreover siRNA knock-down of endogenous CoAA induced a decrease of ERM-dependent transcription of endogenous ICAM-1 gene. These results thus strongly suggest a role for CoAA in the regulation of ERM activity on its target genes.

To date, CoAA activating function was observed with its four known partners (SYT, CBP, TRBP and GHBP) which are transcriptional coactivators [16-18, 33]. Thus ERM is the first transcription factor that directly interacts with CoAA and whose activity is modulated by CoAA. However, CoAA does not appear to act as a general transcription factor activator since CoAA was not able to stimulate the E2Fs transcription factors activity (data not shown). CoAA clearly stimulates ERM transcriptional activity without affecting its level or its cellular localization (data not shown). Moreover, in the Gal4 reporter system, the activity of an ERM construct in which the ETS domain was replaced by the Gal4 DNA binding domain was increased by CoAA (data not shown), strongly suggesting that the CoAA-induced ERM activation is independent of the DNA-binding process. CoAA likely modulates ERM transcriptional activity by either recruiting coactivators, preventing interaction with corepressors or modulating ERM post-translational modifications.

CoAA is a hnRNP-like protein, with two N-terminal RRM, involved in promoter specific mRNA splicing as well as transcriptional activation [19-21]. It should be pointed out that the luciferase reporter constructs used in our experiments have no introns, preventing us to study the CoAA splicing effects. Deletion or substitution of its RRM domains completely abolished the CoAA stimulation of ERM transcriptional activity without affecting ERM recruitment, thus indicating that a direct interaction between CoAA and ERM was not sufficient to allow CoAA effect on ERM. This argues against the possibility that CoAA prevents interaction of ERM with corepressors. Furthermore, our results emphasize the importance and specificity of the CoAA N-terminal RRM in this process. Interestingly, similar deletion of CoAA RRM affects the MMTV reporter constructs response to

dexamethasone treatment [16]. Furthermore, Auboeuf et al demonstrated that CoAA RNA recognition motifs are necessary for transcriptional activity of CMV reporter constructs [19]. The functional role of the RRM in the CoAA enhancing effect of ERM transcriptional activity led us to suppose that they were necessary to contact coactivators or regulatory complexes. These coactivators are probably neither SYT nor TRBP since they directly bind the YQ domain. Supporting this hypothesis, CoAAC which contains the YQ domain and still interacts with ERM, induced a dose-dependent repression of ERM transcriptional activity probably by competing with endogenous CoAA. CoAM which does not interact with ERM also induces a dose-dependent decrease of ERM transcriptional activity suggesting that CoAM may compete with endogenous CoAA with regard to RRM coactivators binding function. Whether such a coactivator complex might contain a RNA is not clear since RRM can also allow direct protein-protein interaction [34].

CoAA regulation of ERM transcriptional activity could be an important process concerning the PEA3 group function. It has been previously discussed that CoAA is overexpressed in a variety of cancers [22] which led us to suppose that CoAA could enhance PEA3 group target genes expression such as genes involved in metastasis. Concerning embryogenesis, it has been described that CoAA expression was submitted to tight expression and splicing regulation [23, 24]. The PEA3 group members are involved in a number of developmental processes: they play a role in the organisation of germ layers with high proliferation and migration rates [39] and in the development of motor and sensory neurons [40]. CoAA level and its balance with its splicing variant CoAM could be important for the regulation process of ERM activity during development.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank L. Ko, JA. Iniguez-Lluhi, S. Berger and D. Auboeuf for kind gifts of plasmids.

FUNDINGS

This work was carried out thanks to grants awarded by the « Ligue Nationale Contre le Cancer » (Comité Nord, France), the « Conseil Régional Nord/Pas-de-Calais » (France), the Fondation pour la Recherche Médicale (France), the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC; France) and the European Regional Development Fund (Intergenes program). K. V. was supported by a *Institut Pasteur de Lille/Région Nord-Pas de Calais* fellowship.

REFERENCES

- 1 Graves, B. J. and Petersen, J. M. (1998) Specificity within the ets family of transcription factors. *Adv Cancer Res* **75**, 1-55
- 2 de Launoit, Y., Baert, J. L., Chotteau-Lelievre, A., Monte, D., Coutte, L., Mauen, S., Firlej, V., Degerny, C. and Verreman, K. (2006) The Ets transcription factors of the PEA3 group: transcriptional regulators in metastasis. *Biochim Biophys Acta* **1766**, 79-87
- 3 Kurpios, N. A., Sabolic, N. A., Shepherd, T. G., Fidalgo, G. M. and Hassell, J. A. (2003) Function of PEA3 Ets transcription factors in mammary gland development and oncogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **8**, 177-190.

- 4 Davidson, B., Goldberg, I., Gotlieb, W. H., Kopolovic, J., Ben-Baruch, G. and Reich, R. (2003) PEA3 is the second Ets family transcription factor involved in tumor progression in ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* **9**, 1412-1419.
- 5 Chotteau-Lelievre, A., Revillion, F., Lhotellier, V., Hornez, L., Desbiens, X., Cabaret, V., de Launoit, Y. and Peyrat, J. P. (2004) Prognostic value of ERM gene expression in human primary breast cancers. *Clin Cancer Res* **10**, 7297-7303.
- 6 Baert, J. L., Beaudoin, C., Monte, D., Degerny, C., Mauen, S. and de Launoit, Y. (2007) The 26S proteasome system degrades the ERM transcription factor and regulates its transcription-enhancing activity. *Oncogene* **26**, 415-424
- 7 Guo, B. and Sharrocks, A. D. (2009) Extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase signaling initiates a dynamic interplay between sumoylation and ubiquitination to regulate the activity of the transcriptional activator PEA3. *Mol Cell Biol* **29**, 3204-3218
- 8 Degerny, C., de Launoit, Y. and Baert, J. L. (2008) ERM transcription factor contains an inhibitory domain which functions in sumoylation-dependent manner. *Biochim Biophys Acta* **1779**, 183-194
- 9 Bojovic, B. B. and Hassell, J. A. (2001) The PEA3 Ets transcription factor comprises multiple domains that regulate transactivation and DNA binding. *J Biol Chem* **276**, 4509-4521.
- 10 Degerny, C., Monte, D., Beaudoin, C., Jaffray, E., Portois, L., Hay, R. T., de Launoit, Y. and Baert, J. L. (2005) SUMO-modification of the Ets-related transcription factor ERM inhibits its transcriptional activity. *J Biol Chem* **27**, 27
- 11 Janknecht, R., Monte, D., Baert, J. L. and de Launoit, Y. (1996) The ETS-related transcription factor ERM is a nuclear target of signaling cascades involving MAPK and PKA. *Oncogene* **13**, 1745-1754

- 12 Goel, A. and Janknecht, R. (2003) Acetylation-mediated transcriptional activation of the ETS protein ER81 by p300, P/CAF, and HER2/Neu. *Mol Cell Biol* **23**, 6243-6254.
- 13 Baert, J. L., Beaudoin, C., Coutte, L. and de Launoit, Y. (2002) ERM transactivation is up-regulated by the repression of DNA binding after the PKA phosphorylation of a consensus site at the edge of the ETS domain. *J Biol Chem* **277**, 1002-1012.
- 14 Nakae, K., Nakajima, K., Inazawa, J., Kitaoka, T. and Hirano, T. (1995) ERM, a PEA3 subfamily of Ets transcription factors, can cooperate with c-Jun. *J Biol Chem* **270**, 23795-23800.
- 15 Firlej, V., Bocquet, B., Desbiens, X., de Launoit, Y. and Chotteau-Lelievre, A. (2005) Pea3 Transcription Factor Cooperates with USF-1 in Regulation of the Murine *bax* Transcription without Binding to an Ets-binding Site. *J Biol Chem* **280**, 887-898.
- 16 Iwasaki, T., Chin, W. W. and Ko, L. (2001) Identification and characterization of RRM-containing coactivator activator (CoAA) as TRBP-interacting protein, and its splice variant as a coactivator modulator (CoAM). *J Biol Chem* **276**, 33375-33383
- 17 Perani, M., Antonson, P., Hamoudi, R., Ingram, C. J., Cooper, C. S., Garrett, M. D. and Goodwin, G. H. (2005) The proto-oncoprotein SYT interacts with SYT-interacting protein/co-activator activator (SIP/CoAA), a human nuclear receptor co-activator with similarity to EWS and TLS/FUS family of proteins. *J Biol Chem* **280**, 42863-42876
- 18 Iwasaki, T., Koibuchi, N. and Chin, W. W. (2005) Synovial sarcoma translocation (SYT) encodes a nuclear receptor coactivator. *Endocrinology* **146**, 3892-3899
- 19 Auboeuf, D., Dowhan, D. H., Li, X., Larkin, K., Ko, L., Berget, S. M. and O'Malley, B. W. (2004) CoAA, a nuclear receptor coactivator protein at the interface of transcriptional coactivation and RNA splicing. *Mol Cell Biol* **24**, 442-453

- 20 Auboeuf, D., Dowhan, D. H., Kang, Y. K., Larkin, K., Lee, J. W., Berget, S. M. and O'Malley, B. W. (2004) Differential recruitment of nuclear receptor coactivators may determine alternative RNA splice site choice in target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 2270-2274
- 21 Auboeuf, D., Dowhan, D. H., Dutertre, M., Martin, N., Berget, S. M. and O'Malley, B. W. (2005) A subset of nuclear receptor coregulators act as coupling proteins during synthesis and maturation of RNA transcripts. *Mol Cell Biol* **25**, 5307-5316
- 22 Sui, Y., Yang, Z., Xiong, S., Zhang, L., Blanchard, K. L., Peiper, S. C., Dynan, W. S., Tuan, D. and Ko, L. (2007) Gene amplification and associated loss of 5' regulatory sequences of CoAA in human cancers. *Oncogene* **26**, 822-835
- 23 Yang, Z., Sui, Y., Xiong, S., Liour, S. S., Phillips, A. C. and Ko, L. (2007) Switched alternative splicing of oncogene CoAA during embryonal carcinoma stem cell differentiation. *Nucleic Acids Res* **35**, 1919-1932
- 24 Brooks, Y. S., Wang, G., Yang, Z., Smith, K. K., Bieberich, E. and Ko, L. (2009) Functional pre-mRNA Trans-splicing of coactivator CoAA and corepressor RBM4 during stem/progenitor cell differentiation. *J Biol Chem*
- 25 Kang, Y. K., Schiff, R., Ko, L., Wang, T., Tsai, S. Y., Tsai, M. J. and O'Malley, B. W. (2008) Dual roles for coactivator activator and its counterbalancing isoform coactivator modulator in human kidney cell tumorigenesis. *Cancer Res* **68**, 7887-7896
- 26 de Launoit, Y., Audette, M., Pelczar, H., Plaza, S. and Baert, J. L. (1998) The transcription of the intercellular adhesion molecule-1 is regulated by Ets transcription factors. *Oncogene* **16**, 2065-2073.
- 27 Coutte, L., Monte, D., Baert, J. and de Launoit, Y. (1999) Genomic organization of the human e1af gene, a member of Ets transcription factors. *Gene* **240**, 201-207.

- 28 Baert, J. L., Monte, D., Musgrove, E. A., Albagli, O., Sutherland, R. L. and de Launoit, Y. (1997) Expression of the PEA3 group of ETS-related transcription factors in human breast-cancer cells. *Int J Cancer* **70**, 590-597.
- 29 Laget, M. P., Defossez, P. A., Albagli, O., Baert, J. L., Dewitte, F., Stehelin, D. and de Launoit, Y. (1996) Two functionally distinct domains responsible for transactivation by the Ets family member ERM. *Oncogene* **12**, 1325-1336.
- 30 Iniguez-Lluhi, J. A. and Pearce, D. (2000) A common motif within the negative regulatory regions of multiple factors inhibits their transcriptional synergy. *Mol Cell Biol* **20**, 6040-6050
- 31 Rocha-Perugini, V., Montpellier, C., Delgrange, D., Wychowski, C., Helle, F., Pillez, A., Drobecq, H., Le Naour, F., Charrin, S., Levy, S., Rubinstein, E., Dubuisson, J. and Cocquerel, L. (2008) The CD81 partner EWI-2wint inhibits hepatitis C virus entry. *PLoS ONE* **3**, e1866
- 32 Janknecht, R. and Monte, D. (1996) The ETS-related transcription factor ERM is a nuclear target of signaling cascades involving MAPK and PKA. *Oncogene* **13**, 1745-1754
- 33 Conway-Campbell, B. L., Brooks, A. J., Robinson, P. J., Perani, M. and Waters, M. J. (2008) The extracellular domain of the growth hormone receptor interacts with coactivator activator to promote cell proliferation. *Mol Endocrinol* **22**, 2190-2202
- 34 Maris, C., Dominguez, C. and Allain, F. H. (2005) The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression. *Febs J* **272**, 2118-2131
- 35 Cartegni, L., Maconi, M., Morandi, E., Cobianchi, F., Riva, S. and Biamonti, G. (1996) hnRNP A1 selectively interacts through its Gly-rich domain with different RNA-binding proteins. *J Mol Biol* **259**, 337-348

- 36 Biamonti, G., Ruggiu, M., Saccone, S., Della Valle, G. and Riva, S. (1994) Two homologous genes, originated by duplication, encode the human hnRNP proteins A2 and A1. *Nucleic Acids Res* **22**, 1996-2002
- 37 Solheim, S. A., Torgersen, K. M., Tasken, K. and Berge, T. (2008) Regulation of FynT function by dual domain docking on PAG/Cbp. *J Biol Chem* **283**, 2773-2783
- 38 Kay, B. K., Williamson, M. P. and Sudol, M. (2000) The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *Faseb J* **14**, 231-241
- 39 Chotteau-Lelievre, A., Montesano, R., Soriano, J., Soulie, P., Desbiens, X. and de Launoit, Y. (2003) PEA3 transcription factors are expressed in tissues undergoing branching morphogenesis and promote formation of duct-like structures by mammary epithelial cells in vitro. *Dev Biol* **259**, 241-257.
- 40 Arber, S., Ladle, D. R., Lin, J. H., Frank, E. and Jessell, T. M. (2000) ETS gene Er81 controls the formation of functional connections between group Ia sensory afferents and motor neurons. *Cell* **101**, 485-498.

Résultats

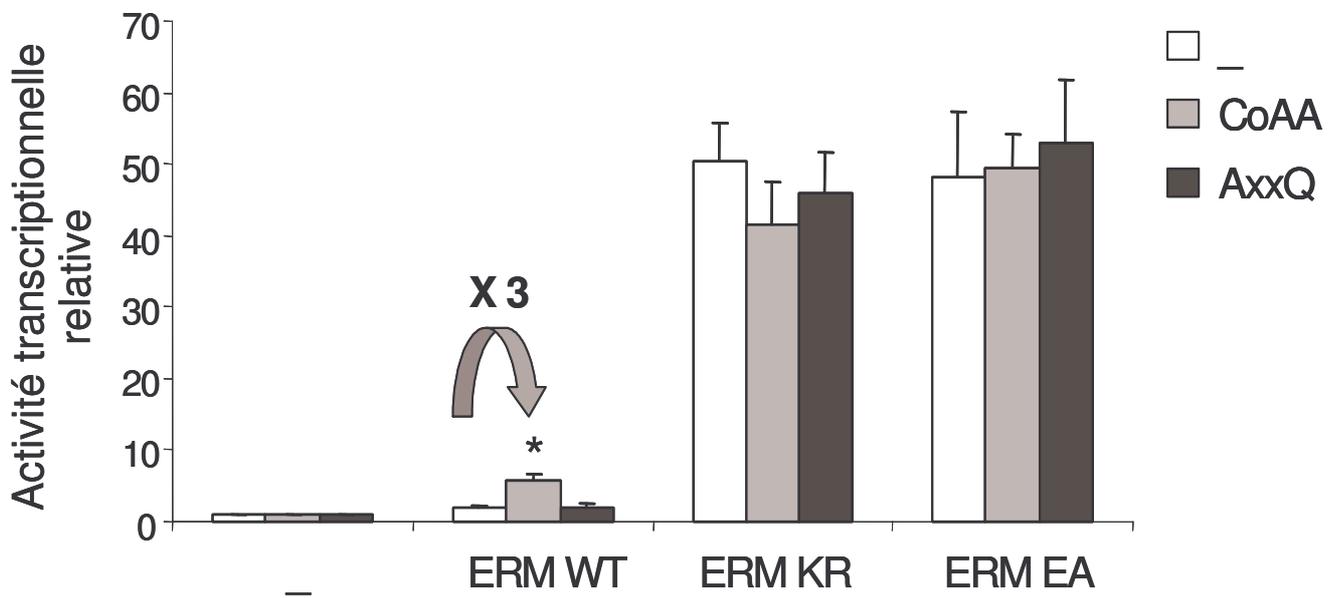


Figure 55 : CoAA n'augmente pas l'activité transcriptionnelle d'ERM KR et ERM EA.

Les cellules RK13 sont transfectées transitoirement pendant 24h avec 10ng de plasmide pCDNA3 vide ou d'expression de CoAA ou AxxQ, 20ng de plasmide pSV vide ou effecteur codant ERM WT, ERM KR ou ERM EA et 100ng de vecteur rapporteur EndoA. Les résultats sont la moyenne (+/- SEM) de 4 expériences indépendantes réalisées en triplicate. (* $p < 0.01$; ANOVA, $n = 4$). L'activité des cellules transfectées par le vecteur rapporteur et le plasmide contrôle en absence de CoAA est fixée à 1.

C CoAA module le taux de sumoylation d'ERM

La régulation des promoteurs EndoA et Icam1 par ERM peut être liée à la sumoylation d'ERM (Degerny et al., 2005) (Degerny et al., 2008). Or, nous avons précédemment décrit que CoAA augmentait l'activité transcriptionnelle d'ERM sur ces promoteurs et qu'elle interagissait avec la région 1-370 d'ERM qui contient les sites de sumoylation. Nous avons donc voulu déterminer s'il existait un lien entre l'activation induite par CoAA et la sumoylation d'ERM.

1 CoAA n'augmente pas l'activité transcriptionnelle des formes non sumoylables d'ERM

Nous avons évalué l'impact de CoAA sur l'activité transcriptionnelle d'ERM sauvage (ERM WT) ou d'une forme d'ERM dans laquelle les lysines ciblées par la sumoylation ont été mutées en arginines (Lys => Arg, ERM KR). Comme l'illustre la figure 55, la forme non sumoylable d'ERM stimule le promoteur EndoA environ 50 fois alors que l'activation induite par la protéine ERM WT n'est proche que de 2 fois. En présence de CoAA, la forme WT d'ERM est activée d'un facteur trois. *A contrario*, CoAA n'augmente pas l'activité d'ERM KR bien qu'elle interagisse avec cette protéine dans des expériences de GST-pull down (donnée non montrée). Ce défaut d'augmentation n'est pas non plus lié à une saturation du système car des doses plus élevées d'ERM KR augmentent l'activité transcriptionnelle alors que CoAA n'a toujours pas d'effet (donnée non montrée).

Néanmoins, la mutation des lysines peut affecter d'autres modifications post-traductionnelles que la sumoylation. Afin de déterminer si ce sont les résidus lysines ou les motifs de sumoylation qui sont importants pour permettre l'effet de CoAA, nous avons réalisé la même expérience en ayant recours à une construction d'ERM dans laquelle les acides glutamiques des sites de sumoylation (yKxE) sont mutés en alanines (Glu => Ala, ERM EA). Il a en effet été démontré que cette mutation abolit la sumoylation d'ERM sans affecter les lysines (Degerny et al., 2005). Comme cela avait été observé pour ERM KR, CoAA, tout comme le mutant AxxQ, n'a pas d'effet significatif sur l'activité transcriptionnelle d'ERM EA (Figure 55).

L'ensemble de ces résultats suggère donc que l'activation induite par CoAA sur ERM WT peut être reliée à la capacité d'ERM à être sumoylée.

Résultats

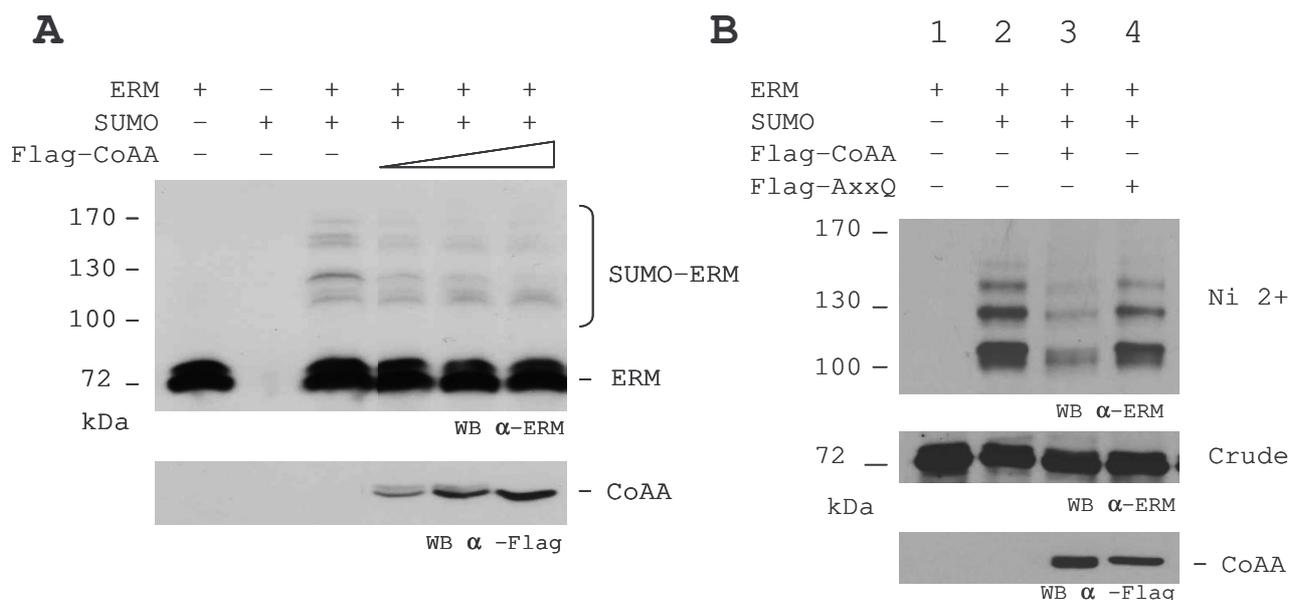


Figure 56 : CoAA diminue le taux de protéine ERM conjuguée à SUMO

A CoAA induit une diminution du taux d'ERM sumoylée de façon dose-dépendante. Les cellules RK 13 ont été transfectées de façon transitoire par 200ng d'ERM, 600ng de SUMO1-6His (SUMO) et une quantité croissante de Flag-CoAA. Les cellules sont lysées par du tampon de Laemmli et analysées par western blot en utilisant les anticorps indiqués (WB α-ERM, WB α-flag).

B CoAA diminue fortement le taux d'ERM conjuguée à SUMO tandis qu'AxxQ n'a qu'un effet marginal. Les cellules RK 13 ont été transfectées comme précédemment (Figure 56 A). Les extraits cellulaires ont été préparés (crude) et les protéines conjuguées à SUMO ont été purifiées par chromatographie d'affinité sur billes de Ni²⁺ (Ni²⁺) et analysées par Western-blot avec un anticorps anti-ERM.

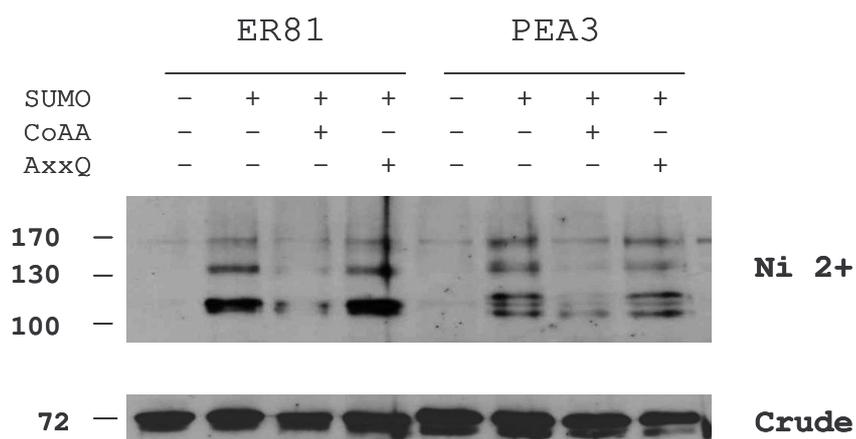


Figure 57: CoAA diminue le taux de protéines ER81 et PEA3 conjuguées à SUMO.

Les cellules RK13 ont été transfectées comme précédemment (figure 56B). Les formes conjuguées à SUMO ont été purifiées selon le protocole décrit précédemment et analysées par western blot grâce à l'anticorps anti-ERM (qui reconnaît également les protéines PEA3 et ER81).

2 CoAA diminue la sumoylation d'ERM et des autres membres du groupe PEA3

Afin d'étudier le lien entre CoAA et sumoylation d'ERM, nous avons évalué l'impact de la surexpression de CoAA sur la sumoylation d'ERM. Pour cela, nous avons cotransfecté les cellules RK 13 avec les vecteurs d'expression d'ERM, de SUMO1-6His (SUMO) et de CoAA. Après transfection, les lysats cellulaires sont analysés par western blot avec les anticorps indiqués. Comme l'illustre la figure 56A, en absence de SUMO, nous observons une protéine à environ 70kDa qui correspond à la protéine ERM non modifiée. Lorsque SUMO est exprimé, nous détectons la présence d'espèces protéiques de plus haute masse moléculaire qui correspondent aux différentes formes d'ERM sumoylée. De manière intéressante, la co-expression de CoAA induit une diminution du taux d'ERM conjuguée à SUMO de façon dose dépendante (Figure 56A). Cette diminution du taux de protéine ERM sumoylée est aussi clairement observée lorsque les formes conjuguées à SUMO sont purifiées sur des billes de Nickel (Ni 2+) grâce à l'étiquette 6His présente sur SUMO. Comme l'illustre la figure 56B, CoAA diminue fortement le taux d'ERM sumoylée (comparer pistes 2 et 3) alors que AxxQ n'a qu'un effet marginal (piste 4). L'ensemble de ces résultats indique donc clairement que CoAA diminue le taux de protéine ERM conjuguée à SUMO.

CoAA interagit avec ERM mais aussi avec les deux autres membres du groupe PEA3, ER81 et PEA3. Cette protéine augmente leur pouvoir transcriptionnel sur le promoteur EndoA (voir article). Nous avons voulu déterminer si cette activation induite par CoAA était également liée à une diminution de la sumoylation de ces facteurs. Nous avons ainsi co-transfecté comme décrit précédemment les cellules RK 13 avec les vecteurs d'expression de SUMO1-6His (SUMO), de CoAA et d'ER81 ou de PEA3 (figure 57). Les formes conjuguées à SUMO ont été purifiées selon le protocole décrit plus haut sur des billes de Nickel (Ni 2+) et analysées par western blot grâce à l'anticorps anti-ERM (qui reconnaît également les protéines PEA3 et ER81). Comme cela a été montré précédemment pour ERM, l'expression de CoAA mais non celle d'AxxQ induit une diminution du taux des formes PEA3 et ER81 conjuguées à SUMO (figure 57).

Ces résultats nous laissent donc supposer que CoAA régule l'activité des membres du groupe PEA3 par un mécanisme similaire.

Résultats

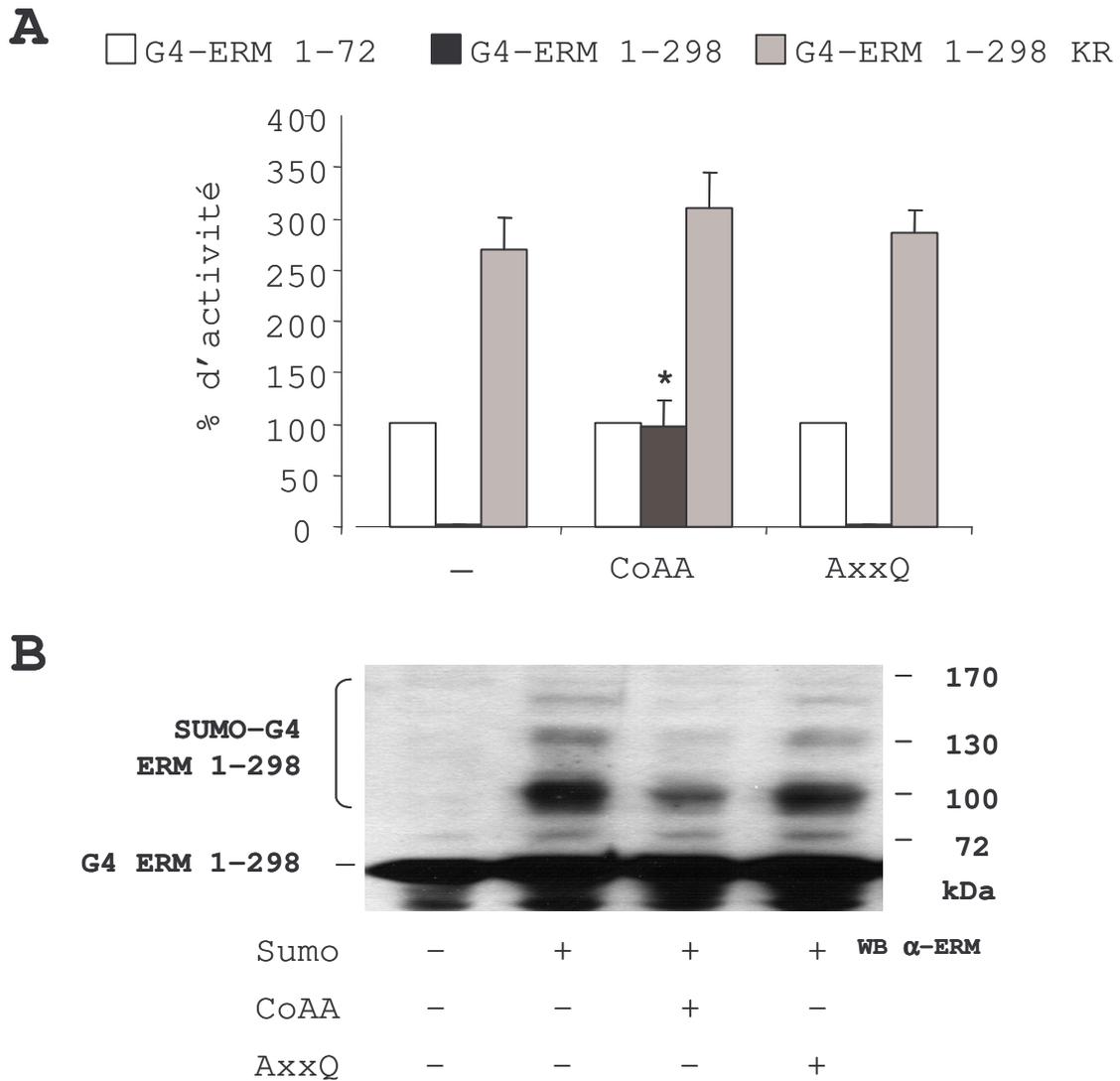


FIGURE 58. L'augmentation d'activité de G4-ERM 1-298 induite par CoAA est liée à sa sumoylation

A CoAA augmente l'activité transcriptionnelle de G4-ERM 1-298 mais non de G4-ERM 1-298 KR. Les cellules RK13 ont été transfectées avec 100ng de vecteur rapporteur Gal4-tk-Luc, 25ng de plasmide contrôle ou G4-ERM1-72, G4-ERM1-298 WT ou KR et 10 ng de plasmide codant CoAA ou son mutant AxxQ. (* $p < 0.01$; ANOVA, $n=4$). Les résultats sont présentés en % d'activité, 100% correspondant à l'activité de Gal4-ERM 1-72 en absence de CoAA.

B CoAA mais non AxxQ diminue le taux de sumoylation de G4-ERM1-298. Les cellules RK 13 ont été transfectées avec 250ng de plasmide G4-ERM1-298, 600ng de SUMO1-6His (SUMO) et 100 ng de plasmide codant CoAA ou son mutant AxxQ. La purification des protéines conjuguées à SUMO a été réalisée comme précédemment (Figure 56A).

3 L'augmentation d'activité de G4-ERM 1-298 induite par CoAA est liée à sa sumoylation

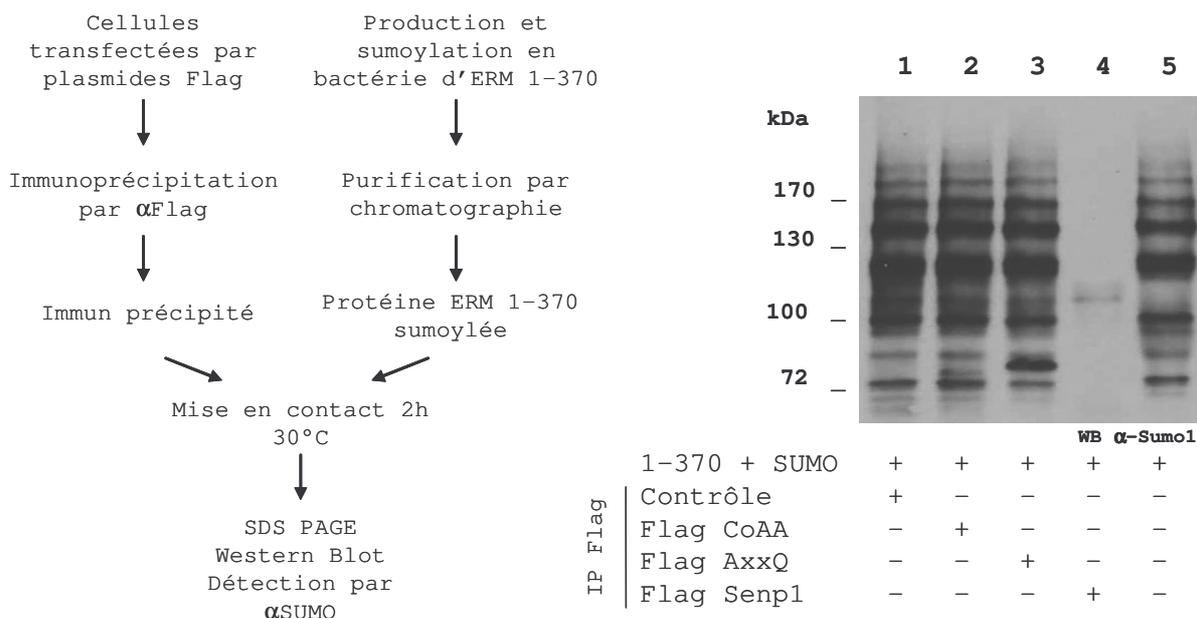
Il a été récemment démontré dans le système hétérologue Gal4 que l'inhibition de l'activité du domaine de transactivation N-terminal (TAD) d'ERM par le DRN est liée à la sumoylation de ce domaine. Ce système hétérologue est un outil très performant pour analyser l'impact de la sumoylation d'ERM sur son activité transcriptionnelle. Nous l'avons donc utilisé pour analyser le rôle de CoAA sur l'activité d'ERM dépendante de la sumoylation. En accord avec les résultats précédemment décrits (Degerny et al., 2008), la construction TAD-DRN (G4-ERM 1-298) possède une activité transcriptionnelle très faible comparée à celle de la construction ne contenant que le TAD (G4-ERM 1-72) et l'effet inhibiteur du DRN est annulé par la mutation KR des 3 sites de sumoylation présents (G4-ERM 1-298 KR). Ces mutations confèrent à la fusion G4-ERM 1-298 KR une activité transcriptionnelle plus importante que celle de la construction G4-ERM 1-72 car le TAD est en fait plus étendu qu'il n'a été initialement décrit (figure 58A) (Degerny et al., 2008). Dans ce contexte, CoAA induit une forte augmentation de l'activité transcriptionnelle de G4-ERM 1-298 (figure 58A). Cet effet est spécifique de la forme sumoylable G4-ERM 1-298 puisque CoAA n'a pas d'effet significatif sur la forme non sumoylable G4-ERM 1-298 KR. De plus, le mutant AxxQ n'affecte pas de façon significative l'activation d'ERM (figure 58A).

Afin de confirmer l'influence de CoAA sur la sumoylation d'ERM, nous avons évalué l'impact de CoAA sur le taux de conjugaison à SUMO de la construction G4-ERM 1-298. Pour cela nous avons co-transfecté les cellules RK13 avec cette construction, le plasmide SUMO1-6His (SUMO) et le plasmide CoAA ou AxxQ. Les formes conjuguées à SUMO ont été purifiées sur des billes de Nickel (Ni²⁺) et analysées par western blot grâce à l'anticorps anti-ERM. Le résultat obtenu dans la figure 58B montre que le taux de conjugaison de G4-ERM 1-298 à SUMO est fortement diminué lorsque CoAA est surexprimé ; *a contrario* la surexpression d'AxxQ n'a pas d'effet significatif sur la sumoylation de cette construction.

L'ensemble de ces résultats montre que l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de G4-ERM1-298 induite par CoAA est due à une diminution de la sumoylation de cette construction : CoAA restaure une part importante de l'activité de G4-ERM 1-298 mais n'atteint pas le niveau d'activité de G4-ERM 1-298 KR, ce qui est en accord avec le fait que la conjugaison à SUMO de la protéine G4-ERM 1-298 en présence de CoAA est diminuée et non pas abolie.

Résultats

A



B

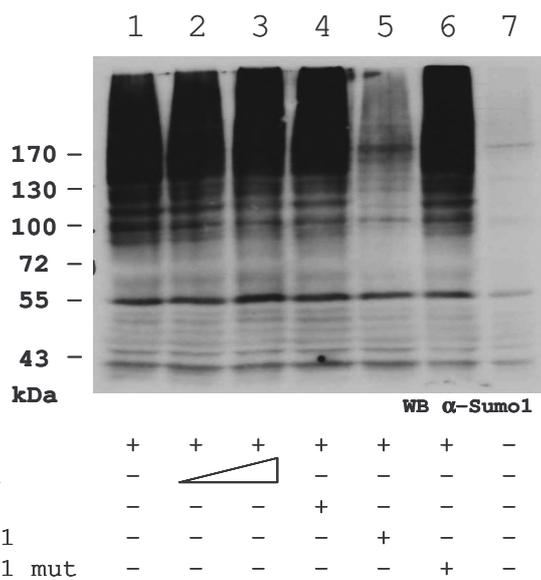


Figure 59 : CoAA n'agit pas comme une sumo-protéase sur ERM et n'influence pas la sumoylation globale de la cellule

A CoAA n'agit pas comme une sumo-protéase sur ERM. A gauche, schéma illustrant la procédure expérimentale suivie. Les cellules RK13 ont été transfectées avec Flag-CoAA, Flag-AxxQ ou Flag-Senp1. Les protéines ont été immunoprécipitées avec l'anticorps anti-Flag et incubées 2 heures avec la protéine ERM 1-370 sumoylée purifiée (1-370 + SUMO) puis révélées par western blot par l'anticorps anti-SUMO1 (à droite).

B CoAA n'influence pas la sumoylation globale de la cellule. Les cellules RK 13 ont été transfectées avec les plasmides codant SUMO1, CoAA, AxxQ, Senp1 ou Senp1 mutée (Senp1 mut). Les protéines cellulaires conjuguées à SUMO sont détectées par western blot grâce à l'anticorps anti-SUMO1.

4 CoAA n'agit pas comme une sumo-protéase sur ERM et n'influence pas la sumoylation globale de la cellule

CoAA diminuant le taux de sumoylation d'ERM, nous avons voulu déterminer si elle pouvait agir comme une sumo-protéase (Figure 59A). Pour cela, nous avons immunoprécipité les protéines Flag-CoAA, Flag-AxxQ ou la sumo-protéase Flag-Senp1 (Gong et al., 2000) exprimées dans les cellules RK13 transfectées et réalisé une immunoprécipitation contrôle à partir d'extraits cellulaires n'exprimant pas ces protéines. Les protéines immunoprécipitées ont ensuite toutes été incubées avec la protéine recombinante ERM 1-370 sumoylée. Cette dernière a été produite et sumoylée grâce à un système de sumoylation en bactérie puis purifiée grâce à une étiquette 6His. Finalement, après incubation et séparation par SDS-PAGE, le niveau de conjugaison d'ERM 1-370 à SUMO a été évalué par l'anticorps anti-SUMO1 (voir figure 59A gauche).

Comme l'illustre la figure 59A, ERM 1-370 sumoylée renferme de nombreuses formes sumoylées à différents niveaux (piste 5) qui sont également observées dans le contrôle négatif (piste 1). A *contrario* de Senp1 (piste 4), CoAA (piste 2) et AxxQ (piste 3) ne sont pas capables de désumoyer la protéine ERM 1-370 conjuguée à SUMO. Ainsi, dans nos conditions expérimentales, CoAA n'agit pas comme une sumo-protéase sur ERM.

Afin de déterminer si CoAA pouvait moduler le taux de sumoylation cellulaire, des cellules RK 13 ont été transfectées avec les plasmides codant SUMO1 en absence ou en présence de CoAA, d'AxxQ ou de la sumo-protéase Senp1 sauvage (contrôle positif) ou mutée (contrôle négatif : Senp1 mut) (Figure 59B). Les protéines cellulaires conjuguées à SUMO ont ensuite été analysées par SDS-PAGE et détectées par l'anticorps anti-SUMO1. Comme l'illustre la figure 59B, on observe peu de bandes dans les extraits cellulaires ne surexprimant pas SUMO (piste 7). En revanche, suite à sa surexpression, de nombreuses bandes surtout dans les hautes masses moléculaires sont observées (piste 1). Senp1 induit une forte diminution du taux de protéines cellulaires conjuguées à SUMO (piste 5) alors que la protéine Senp1 mutée n'a pas d'effet (piste 6). En revanche, des quantités croissantes de CoAA (pistes 2 et 3) ou AxxQ (piste 4) n'influencent pas le taux global de sumoylation cellulaire.

Nos résultats indiquent clairement que CoAA n'exerce pas d'effet significatif sur la sumoylation globale dans la cellule.

D Conclusion

Nous avons démontré que CoAA interagit avec ERM et augmente son activité transcriptionnelle. Les différents domaines de CoAA jouent un rôle à des niveaux différents dans ce phénomène: le domaine YQ permet l'interaction avec ERM tandis que les domaines RRM sont requis pour l'activation de cette protéine. Cette activation induite par CoAA est liée, tout au moins en partie, à la levée de l'inhibition exercée par la sumoylation d'ERM. Nous avons en effet démontré que la surexpression de CoAA diminue le taux de sumoylation d'ERM. Ce même phénomène est observé dans le système hétérologue Gal4 ainsi que sur les autres membres du groupe PEA3. Néanmoins, nous n'avons pas pu mettre en évidence, pour le moment, une augmentation de la sumoylation d'ERM suite à la diminution de l'expression de CoAA par l'utilisation de siRNA. De nombreuses questions restent également posées concernant le mécanisme moléculaire impliqué dans cette régulation du taux de sumoylation. Toutefois, ce mécanisme ne semble pas être lié à une diminution de la sumoylation globale de la cellule ou à une activité sumoprotéase de CoAA.

DISCUSSION

Discussion

I De l'intérêt d'utiliser plusieurs approches de purification

L'activité des membres du groupe PEA3 est modulée, en particulier, par des interactions avec d'autres protéines. Jusqu'à présent, les partenaires du groupe PEA3 ont été identifiés par des études ciblées et par double hybride. Cette dernière technique a permis l'identification de quelques partenaires tels que Ubc9 (Degerny et al., 2005), CHD3 (Pastorcic and Das, 2007), ZNF237 (Pastorcic and Das, 2006) ou LPP (Guo et al., 2006) (voir introduction). Afin de mieux appréhender la régulation de l'activité de ces facteurs, mon travail a consisté à rechercher de nouveaux partenaires par d'autres approches. Ainsi, nous avons mis au point différentes techniques de purification basées sur des méthodes biochimiques afin d'identifier de nouveaux partenaires protéiques d'ERM, un des membres du groupe PEA3.

La première technique, la purification TAP, avait pour objectif de purifier dans un contexte cellulaire des complexes associés à une protéine ERM étiquetée et produite dans les cellules. Nous avons pu constater par gel filtration que les protéines ERM endogène et CBP-SBP-ERM étaient majoritairement associées à d'autres molécules dans un contexte cellulaire normal. La purification de partenaires associés à ERM apparaissait donc comme envisageable. Toutefois, malgré de nombreuses optimisations et l'utilisation de différentes étiquettes, nous n'avons réussi à identifier qu'un nombre extrêmement limité d'interacteurs potentiels d'ERM. Il est envisageable que la position de la protéine CBP-SBP-ERM dans les complexes limite l'accessibilité des étiquettes. Ce phénomène pourrait en partie expliquer que le rendement des étapes de purification SBP et CBP n'atteigne, après optimisation, que 90% et 60%. De plus, il est possible, que malgré l'utilisation de conditions d'extraction et de purification relativement « douces », les complexes associés à ERM se dissocient lors des étapes de purification. En particulier, lorsque la protéine étiquetée interagit avec les résines, des changements conformationnels ou l'encombrement stérique pourrait entraîner la dissociation des complexes. Enfin, la principale limitation de cette technique est l'identification des partenaires potentiels par une méthode d'analyse protéomique performante. De nombreuses études TAP ont en effet été réalisées en utilisant la spectrométrie de masse LC-MS/MS (Rohila et al., 2009) ou la technologie MudPIT (multidimensional protein identification technology) (Koch et al., 2007). Ne disposant que d'un MALDI-TOF, il semble que de nombreuses protéines n'aient pu être identifiées faute d'une sensibilité suffisante.

Discussion

Face aux problèmes rencontrés lors de la purification TAP de partenaires associés à ERM dans le contexte cellulaire, nous avons envisagé d'autres techniques de purification *in vitro* dérivées du GST pull-down. Tout d'abord, l'utilisation de GST-ERM a permis d'identifier de nouveaux interacteurs potentiels. Néanmoins, nous avons constaté que l'élution des partenaires par une faible dose de sarcosyl provoquait également l'élution d'une faible quantité de protéine GST-ERM ou de sous-produits de cette fusion, rendant ainsi quasi impossible l'identification d'interacteurs d'une masse inférieure à la protéine de fusion GST-ERM utilisée comme appât. Seuls des interacteurs d'une masse moléculaire supérieure à celle de la protéine appât ont pu être identifiés par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Afin de supprimer ce problème, nous avons remplacé la GST par un site de biotinylation permettant de ne pas perdre la protéine appât lors de l'étape d'élution grâce à la très forte affinité existant entre la biotine et la streptavidine. Cette approche a permis, entre autres, d'identifier des partenaires potentiels de masse moléculaire inférieure à celle de la GST-ERM.

L'ensemble de nos purifications a permis d'identifier de façon reproductible dix sept protéines candidates récapitulées dans le tableau 8 (page 92). Il est intéressant de constater que la majorité de ces protéines ont un rôle plus ou moins connu dans la transcription, ce qui est cohérent avec la fonction d'ERM. Parmi les candidats identifiés, seule CBP était déjà connue pour interagir avec les membres du groupe PEA3 ((Goel and Janknecht, 2003; Mitchell et al., 2006) (Papoutsopoulou and Janknecht, 2000) (Baert, données non publiées)). Ainsi, nos purifications ont permis d'identifier des protéines candidates différentes de celles trouvées auparavant par des études ciblées ou utilisant la technique du double hybride. Il faut aussi remarquer que les partenaires auxquels nous nous sommes intéressés (CoAA, MED23 et MED25) interagissent avec le domaine de transactivation des membres du groupe PEA3. Ce domaine n'avait pas pu être utilisé comme appât lors du double hybride car il est transcriptionnellement actif en levure. En revanche, nos techniques de purification utilisent une protéine appât produite en bactérie ce qui ne nous permet pas d'isoler des partenaires d'ERM qui interagissent plus spécifiquement avec ERM modifiée post-traductionnellement. De même, une autre limitation de notre approche est que l'identification de partenaires est fortement dépendante de la présence des protéines (dont l'expression peut varier d'un type cellulaire à l'autre) et des quantités de protéine disponibles dans les extraits nucléaires utilisés. C'est le cas, par exemple, des facteurs de transcription dont l'expression peut être dépendante du type cellulaire. Ce sont des protéines peu représentées dans les cellules et donc présentes en faible quantité dans nos extraits cellulaires. Ainsi, nous constatons que, bien que les membres du groupe PEA3 soient connus pour interagir avec d'autres facteurs

de transcription (Li et al., 2000), notre étude n'a révélé aucune de ces protéines comme partenaire potentiel. Toutefois, il faut noter que ce type de partenaire n'a pas été identifié par des criblages ou des purifications à grande échelle mais grâce à l'étude de promoteurs. Il est envisageable que les interactions entre les membres du groupe PEA3 et d'autres facteurs de transcription puissent être facilitées en présence d'ADN. Or, nos extraits en sont dépourvus car nous les avons traités à la benzonase, une enzyme qui digère l'ADN et l'ARN. Il est également possible que l'affinité de ces interactions soit trop faible pour résister aux contraintes d'une purification par voie biochimique.

Ainsi, les techniques de purification basées sur des aspects biochimiques que nous avons développées ont permis de mettre en évidence des interacteurs potentiels différents de ceux identifiés par les méthodes utilisées précédemment et apparaissent donc comme complémentaires. De plus, seuls cinq candidats ont été identifiés par des techniques biochimiques différentes, ces méthodes de purifications peuvent donc être considérées comme complémentaires les unes des autres.

II ERM interagit avec le complexe médiateur

Suite à l'identification de MED15, MED23 et MED25 comme interacteurs potentiels d'ERM, nous avons testé l'interaction *in vitro* de ce facteur de transcription avec différentes sous-unités du complexe médiateur. Ceci nous a permis de mettre en évidence une interaction directe entre ERM et MED23 et entre ERM et MED25. Nous ne pouvons néanmoins pas écarter le fait qu'ERM puisse interagir également avec d'autres sous-unités car nous n'avons pas pu toutes les tester. Concernant MED15, elle n'interagit pas directement avec ERM et doit être recrutée de façon indirecte via le complexe médiateur. Malheureusement cela n'a pas pu être examiné dans les expériences de recrutement *in vitro* du médiateur sur ERM faute d'anticorps de bonne qualité disponible.

En ce qui concerne MED23, nous avons pu mettre en évidence que cette protéine interagissait *in vitro* et *in cellulo* avec ERM. Nous avons constaté que l'affinité de MED23 pour ERM apparaît plus importante lorsque la protéine est produite en cellule plutôt que traduite *in vitro* en lysat de réticulocytes. Ceci nous laisse penser que, dans un contexte cellulaire, l'interaction avec ERM est stabilisée par la présence d'autres protéines et/ou par une modification post-traductionnelle affectant MED23. Nous avons déterminé que la région

Discussion

transactivatrice 1-72 d'ERM était suffisante pour permettre cette interaction. MED23 interagit également avec la région transactivatrice de HSF, ELK1, E1A et ESX (Asada et al., 2002) (Stevens et al., 2002) (Boyer et al., 1999) (Kim et al., 2004). En ce qui concerne ESX, un autre facteur de la famille ETS, la zone d'interaction a été définie de façon précise. Elle nécessite la face hydrophobe d'une hélice α située entre les résidus 137 et 144 et contient, entre autres, un tryptophane dont la présence est primordiale pour l'interaction (Asada et al., 2002). Il n'existe pas d'identité de séquence entre cette région et le domaine de transactivation d'ERM. Néanmoins, la région 42-62 d'ERM contient un tryptophane et est prédite pour se structurer en hélice α (Defossez et al., 1997). Il sera donc intéressant de tester si cette région est suffisante pour permettre l'interaction avec MED23. Ceci permettrait de développer, comme cela a été fait pour ESX, un peptide ou une molécule de synthèse inhibant l'interaction entre ERM et MED23 afin d'évaluer l'importance de cette interaction au niveau cellulaire.

Il a été démontré que l'interaction entre MED23 et un autre membre de la famille ETS, ELK1, nécessitait la phosphorylation de ELK1 par la voie MAPK (Stevens et al., 2002). Bien que dans le cas d'ERM cette modification post-traductionnelle n'apparaisse pas nécessaire pour permettre l'interaction avec MED23, il est envisageable qu'une telle modification puisse influencer la stabilité de l'interaction ou le recrutement de complexes médiateurs différents. Néanmoins, une étude réalisée sur les protéines fixant ETS1 et ETS2 suite à leur phosphorylation par cette même voie a permis de mettre en évidence que MED23 se fixait à ces protéines indépendamment de leur phosphorylation (Foulds et al., 2004). Il est également possible que d'autres modifications post-traductionnelles affectant ERM modulent l'affinité de ce facteur pour MED23. Ainsi, la sumoylation, qui inhibe l'activité d'ERM, pourrait diminuer l'interaction avec MED23 ou une autre sous-unité du médiateur. Ceci diminuerait le recrutement du complexe médiateur et donc l'activation transcriptionnelle qu'il induit.

Aucun domaine fonctionnel n'a pour le moment été décrit dans MED23. Or nous avons montré que la région de MED23 nécessaire à l'interaction avec ERM se situe principalement entre les acides aminés 327 et 513. En alignant les régions décrites pour interagir avec différents partenaires de MED23 (voir paragraphe présentation de MED23), une zone précise de MED23 semble être impliquée dans ces interactions. Ce domaine se situe entre les résidus 327 et 625 et nous nous proposons de le dénommer Domaine d'Interaction avec les Facteurs de Transcription ou DIFT (Figure 60). Il serait maintenant intéressant de produire cette région et de vérifier qu'elle puisse effectivement permettre l'interaction avec ERM. Il reste par ailleurs à définir au sein de cette protéine le ou les domaines impliqués dans l'interaction avec les différents complexes médiateurs dans lesquels elle a été retrouvée.

Interaction avec

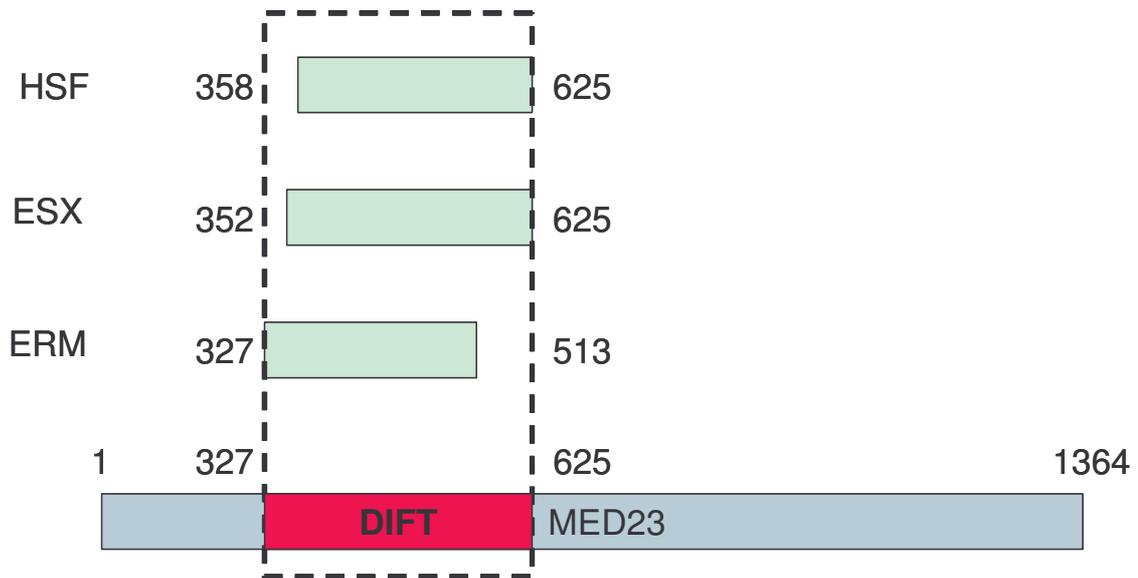


Figure 60 : Définition au sein de MED23 d'un domaine d'interaction avec les facteurs de transcription (DIFT).

Les domaines d'interactions définis pour HSF (Kim et al., 2004), ESX (Asada et al., 2002) et ERM permettent de délimiter une région de MED23 impliquée dans les interactions avec des régulateurs de la transcription. Le domaine d'interaction de MED23 avec E1A et ELK1 n'a pas été défini.

En parallèle des travaux sur MED23, nous avons démontré que la sous-unité MED25 interagissait également *in vitro* et *in cellulo* avec ERM. L'interaction de cette protéine avec ERM apparaît très forte *in vitro*. Cette interaction nécessite le domaine ACID de MED25 précédemment décrit pour interagir avec les domaines transactivateurs acides des protéines virales VP16 et IE62 (Mittler et al., 2003) (Yang et al., 2008). De façon intéressante, ERM interagit également avec cette protéine par son domaine transactivateur N-terminal (1-72) qui est riche en acides aminés acides. Le domaine ACID de MED25 étant basique (pI théorique de 9.71), l'interaction entre ce domaine et les domaines transactivateurs acides pourrait faire intervenir des liaisons ioniques. Cependant il existe une spécificité au delà de la charge puisque MED25 n'interagit pas avec le domaine transactivateur de p53 bien que ce dernier soit acide (Yang et al., 2004). De manière remarquable, Yamamoto *et al* ont démontré que la mutation des résidus basiques 484 à 488 du domaine ACID de MED25 abolit l'interaction avec IE62. Il serait intéressant de tester si un tel mutant est toujours capable d'interagir avec ERM. Il existe peu d'homologie entre les domaines acides de VP16 et de IE62 (Yamamoto et al., 2009), ainsi qu'entre ceux d'ERM et de IE62. En revanche, une identité de séquence est retrouvée entre le domaine acide de VP16 et celui d'ERM (figure 61). Cette homologie explique peut être pourquoi ces deux protéines interagissent de manière plus intense avec MED25 que ne le fait IE62 et pourrait aider à la détermination

Discussion

D'un point de vue fonctionnel, la surexpression de MED23 ainsi que son absence induisent une diminution de l'activité transcriptionnelle d'ERM. Cette diminution suite à la surexpression de MED23 est probablement due à un phénomène de « rétention protéique » ou « squelching ». Confortant cette hypothèse, nos données préliminaires indiquent que le fragment F2, qui contient une partie du domaine DIFT de MED23 et qui doit donc agir comme un dominant négatif, diminue l'activité transcriptionnelle d'ERM (données non montrées). Ce phénomène de squelching a aussi été observé dans le cas de l'interaction de cette sous-unité avec E1A par exemple (Stevens et al., 2002) (Boyer et al., 1999). De manière similaire, la surexpression de MED25 induit également une forte répression de l'activation transcriptionnelle d'ERM. Le même phénomène est observé lors de la surexpression de la partie N-terminale de MED25 qui n'interagit pas avec ERM. De plus, nos données préliminaires indiquent que la sous-expression de MED25 réduit d'environ 80% la transactivation de la construction Gal4-ERM 1-122 (donnée non montrée). L'ensemble de ces résultats tend à démontrer l'importance de cette protéine dans l'activation induite par ERM. La surexpression de cette sous-unité provoque sûrement un effet dominant négatif comme cela est observé dans le cas de VP16 ou IE62 (Mittler et al., 2003; Yang et al., 2008). Il reste désormais à démontrer que MED25 et MED23 régulent l'expression de gènes-cibles endogènes d'ERM et qu'ERM recrute ces sous-unités au niveau des promoteurs de ses gènes cibles par des expériences de ChIP.

La construction MED25-Nterm qui contient le domaine VWA joue le rôle de dominant négatif comme cela a été observé pour VP16 (Mittler et al., 2003). Cet effet doit être lié à une compétition entre MED25 et MED25-Nterm pour le recrutement d'éléments nécessaires à l'activation d'ERM. Le domaine VWA étant connu pour permettre l'interaction avec le complexe médiateur (Mittler et al., 2003), il semble donc que la régulation de l'activité d'ERM par MED25 nécessite son interaction avec ce complexe. Toutefois, il est possible que cette forme tronquée de MED25 déstabilise le complexe médiateur ou le module MED16/MED23/MED24/MED25, rendant ainsi impossible le recrutement par MED23, par exemple, sans que MED25 soit directement la voie d'entrée entre ERM et le médiateur. Nous ne pouvons pas non plus exclure le fait que ce domaine recrute d'autres co-facteurs qui pourraient réguler l'activité transcriptionnelle d'ERM indépendamment du médiateur.

Lors de tests de recrutement *in vitro* de complexes médiateurs par ERM, nous avons mis en évidence que l'absence ou la diminution d'expression de MED23 provoquait une baisse drastique du recrutement de MED24 et de MED6. Ces protéines font respectivement partie du module incluant MED23 et du « core » du médiateur. Ceci suggère que MED23 est nécessaire pour recruter sur ERM, tout au moins *in vitro*, une part importante des complexes

Discussion

médiateurs contenant ces sous-unités. Faute d'anticorps de bonne qualité disponibles, nous n'avons pas pu rechercher la présence d'autres sous-unités afin de prouver que le complexe médiateur entier était présent. Nous n'avons également pas pu déterminer si le recrutement de complexes médiateurs ne contenant pas ces sous-unités était affecté par l'absence de MED23. Néanmoins, il apparaît peu probable qu'il existe des complexes médiateurs dépourvus des sous-unités MED24 et MED6. En effet, la protéine MED24 a été identifiée dans tous les complexes médiateurs purifiés à partir d'extraits de cellules humaines (Conaway et al., 2005). La protéine MED6, quant à elle, a été identifiée dans toutes les purifications à l'exception de celle réalisée par Ryu *et al* (Conaway et al., 2005) (Ryu et al., 1999). Toutefois, cette purification n'a permis la reconnaissance que de 9 sous-unités du médiateur. Il est donc possible que certaines sous-unités n'aient pas été identifiées ou aient été perdues lors de la purification. De plus, une purification d'un complexe médiateur présumé similaire réalisée par Taatjes révèle, quant à elle, la présence de MED6 (Taatjes et al., 2002). Il importera désormais de définir si MED23 est directement responsable du recrutement de ces complexes médiateurs sur ERM ou si sa perte entraîne la déstabilisation de sous-unités nécessaires à cette interaction. En effet, il a été précédemment démontré que la délétion du gène MED23 ou de celui codant MED24 entraînait une déstabilisation du module MED23/MED24/MED16 (dans lequel MED25 peut être présent ou non), qui est alors moins stablement fixé au complexe médiateur (Stevens et al., 2002) (Ito et al., 2002). Il suffit qu'une sous-unité soit absente pour déstabiliser ce module et donc perturber le recrutement du médiateur sur ERM sans que cette sous-unité soit directement impliquée dans l'interaction avec ERM. Néanmoins, nous observons une fixation résiduelle des sous-unités MED6 et MED 24 sur ERM en absence de MED23 ce qui laisse penser que certains complexes ne nécessitent pas la présence de MED23 pour se fixer à ERM *in vitro*.

Ces expériences de recrutement *in vitro* devront être complétées par des expériences *in vivo* afin de déterminer si le complexe médiateur peut être recruté par ERM dans le contexte cellulaire. La présence d'ERM dans des fractions de haut poids moléculaire lors des séparations chromatographiques réalisées à partir d'extraits cellulaires (voir figure 25, page 85) indique que ce facteur de transcription est associé dans la cellule à des complexes multiprotéiques. Cette donnée est donc compatible avec une interaction entre ERM et le complexe médiateur dans un contexte cellulaire. Il serait intéressant de déterminer si les protéines du médiateur sont dans les mêmes fractions qu'ERM. Par ailleurs, il faut noter que l'absence de MED23 entraîne une baisse drastique du recrutement de complexes médiateurs par ERM mais aussi une diminution de l'activation transcriptionnelle induite par ERM. Ceci laisse penser qu'il existerait un lien entre activation transcriptionnelle d'ERM et recrutement des complexes médiateurs nécessitant la présence de MED23. Afin de déterminer si ces deux phénomènes sont reliés, des expériences complémentaires seront

Discussion

nécessaires. Il faudra déterminer si MED23 est également nécessaire au recrutement de complexes médiateurs au niveau d'un promoteur régulé par ERM. Enfin, il sera de surcroît intéressant d'étudier l'impact sur l'activation transcriptionnelle d'ERM d'une construction MED23 délétée du domaine DIFT. En complément, l'impact d'un mutant n'interagissant plus avec le médiateur serait également intéressant à étudier même si pour le moment une telle construction n'est pas réalisable car les domaines d'interactions avec le médiateur ne sont pas connus pour MED23.

Nous avons aussi démontré que la sous-expression de MED25 n'entraîne qu'une faible diminution du recrutement *in vitro* de complexes médiateurs contenant les sous-unités MED6 et MED24 et n'affecte pas significativement le recrutement de MED23 sur ERM. MED25 semble n'avoir dans ces expériences qu'un rôle limité dans le recrutement ou la stabilisation de ces complexes. Néanmoins, ces expériences consistent en un recrutement *in vitro*. Des expériences de ChIP seront nécessaires pour déterminer le rôle de MED25 dans le recrutement de complexes médiateurs par ERM sur les promoteurs de ses gènes cibles. De plus, il est possible que MED25 ne soit présent que dans une faible proportion des complexes médiateurs contenant ces sous-unités si l'on se réfère au peu de purifications dans lesquelles elle a été identifiée (Conaway et al., 2005; Mittler et al., 2003). Toutefois, nous ne pouvons exclure que MED25 soit présente au sein de complexes ne contenant pas les sous-unités MED6 et MED24, même si, jusqu'à présent, il n'a pas été décrit de complexe médiateur contenant MED25 sans contenir MED6 et MED24 (Conaway et al., 2005).

Enfin, il est possible que MED25 régule l'activation transcriptionnelle d'ERM par des mécanismes indépendants du recrutement de complexes médiateurs. Il a en effet été décrit que MED25 pouvait exister sous forme non associée au médiateur (Mittler et al., 2003; Sato et al., 2004) et agir comme un coactivateur indépendamment du médiateur (Lee et al., 2007). Il est donc possible que tout ou partie de son effet sur ERM passe par le recrutement de coactivateurs. Nous pouvons citer le coactivateur CBP qui interagit avec le domaine ACID de MED25 (Lee et al., 2007).

Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées en ce qui concerne le recrutement de complexes médiateurs par ERM (Figure 62). Tout d'abord, MED23 et MED25 seraient présents au sein d'un même complexe médiateur et seraient toutes les deux impliquées dans l'activation transcriptionnelle d'ERM. Des complexes associant MED23 et MED25 existent dans la cellule car ces sous-unités sont co-purifiées dans certaines purifications du médiateur (pour revue (Conaway et al., 2005)). Si tel est le cas, d'après nos expériences *in vitro*, MED23 jouerait un rôle prépondérant dans le recrutement du médiateur alors que MED25 n'aurait qu'un rôle plus limité dans ce phénomène, permettant peut-être de stabiliser

l'interaction. D'un point de vue fonctionnel, il est intéressant de constater que la sous-expression de MED25 ne diminue que faiblement le recrutement du médiateur *in vitro* alors que nos premières données montrent qu'elle affecte fortement l'activation transcriptionnelle du domaine transactivateur d'ERM : MED25 aurait donc un rôle prépondérant dans l'activation transcriptionnelle d'ERM et un rôle plus limité dans le recrutement du médiateur. L'influence de MED23 sur l'activation induite par ERM ne se limiterait peut-être alors qu'au recrutement du complexe médiateur, apportant ainsi MED25 et sa fonction activatrice.

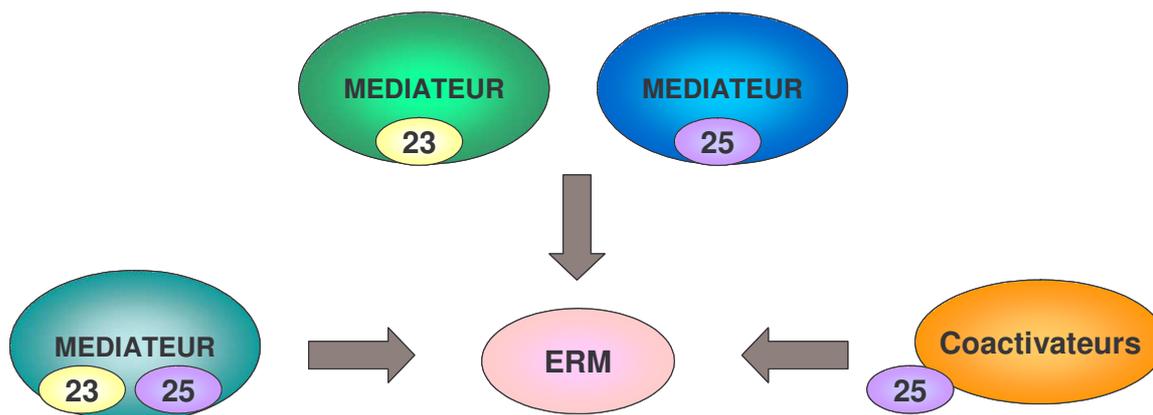


Figure 62 : Schéma illustrant les différentes hypothèses possibles sur le rôle de MED23 et MED25 dans le recrutement du médiateur ou de coactivateurs par ERM.

ERM pourrait recruter un complexe médiateur contenant les sous-unités MED23 et MED25. L'interaction pouvant se faire soit par MED23, soit par MED25 soit par les deux sous-unités. ERM pourrait aussi recruter des complexes médiateurs contenant soit MED23 soit MED25. Enfin, il est envisageable que MED25 permette le recrutement sur ERM de coactivateurs indépendamment du médiateur.

Une autre hypothèse est que ces protéines soient impliquées dans le recrutement de complexes différents par ERM. Nous avons en effet observé que lorsque l'une de ces deux sous-unités est sous-exprimée, l'autre est toujours recrutée sur ERM ; MED23 et MED25 pourrait donc faire partie de complexes différents. De manière intéressante, en absence de MED23, il subsiste une faible présence de MED6 et MED24 sur ERM alors que la présence de MED25 n'est pas modifiée. Ces résultats suggèrent qu'au moins une partie de MED25 n'est pas associée aux complexes MED23/MED6/MED24. La question se pose de savoir si les complexes résiduels fixés sur ERM sont recrutés via MED25 ou par une autre voie d'entrée que nous ne connaissons pas. Il serait intéressant de réaliser, dans les cellules MEF MED23 *-/-*, une sous-expression de MED25 afin de déterminer si ces complexes résiduels recrutés par ERM nécessitent la présence de cette sous-unité. Nous ne pouvons pas exclure non plus que MED25 soit présent dans des complexes médiateurs ne contenant pas les sous-unités MED6 et MED24 même si cela n'a encore jamais été observé (voir discussion MED25). Ainsi, il est envisageable qu'ERM recrute des complexes médiateurs contenant des sous-unités différentes selon le contexte. Dans ce sens, il a été montré que

p53 interagit avec MED1 et MED17 (Ito et al., 1999) (Sato et al., 2004). Ces sous-unités sont recrutées sur le promoteur de *p21* (Donner et al., 2007). Mais lors de l'activation de p53 par la Nutlin3, on observe un recrutement du module CDK8 qui est associé, cas relativement rare, à une forte activation transcriptionnelle (Donner et al., 2007). Il se pourrait donc qu'un complexe contenant MED23 mais pas MED25 soit recruté sur ERM et qu'une activation ou un signal permette le recrutement de MED25, provoquant alors l'activation transcriptionnelle. L'existence de complexes médiateurs contenant la sous-unité MED23 mais pas la sous-unité MED25 a en effet été montrée dans certaines purifications (pour revue (Conaway et al., 2005)). Des études d'immunoprécipitation de la chromatine permettront de déterminer si ERM, MED23 et MED25 co-localisent dans un contexte physiologique sur les promoteurs des gènes cibles mais également de déterminer les circonstances (telles que des modifications post-traductionnelles ou la présence de coactivateurs) nécessaires à leur présence. Il est également possible que ce recrutement dépende du promoteur étudié comme le laisse supposer la variation dans l'intensité de réponse observée sur les promoteurs testés. Enfin, nous ne pouvons écarter le fait que MED25 soit associée à d'autres complexes que le Médiateur tels que des complexes contenant des coactivateurs. Son interaction avec ERM permettrait alors une activation transcriptionnelle par le recrutement de ces coactivateurs, hypothèse déjà émise quant à l'effet dominant négatif du domaine VWA (voir discussion MED25).

III ERM et le Coactivateur CoAA

CoAA interagit *in vitro* et *in vivo* avec ERM et est donc un nouveau partenaire de cette protéine. Le domaine de CoAA impliqué dans cette interaction est le domaine YQ. A l'exception des partenaires CBP et GHBP pour lesquels le domaine d'interaction de CoAA n'a pas été recherché, tous les partenaires de CoAA identifiés à ce jour interagissent avec ce domaine (Iwasaki et al., 2001) (Iwasaki et al., 2005) (Perani et al., 2005) (Li et al., 2009). Ce dernier, qui possède une activité transcriptionnelle (Perani et al., 2005), contient plus de vingt motifs XYXXQ (où X dénote un petit acide aminé incluant G, A, S ou P) (Iwasaki et al., 2001). De précédentes études ont montré que la répétition d'acides aminés aromatiques parmi des résidus de petite taille était importante pour permettre les interactions protéine-protéine (Biamonti et al., 1994; Cartegni et al., 1996; Iwasaki et al., 2001; Iwasaki et al., 2005). Nos travaux confirment que ce motif joue un rôle crucial dans ces interactions et mettent en exergue le rôle central des tyrosines puisque leur mutation abolit l'interaction avec ERM. Comme un domaine YQ est également présent dans les oncoprotéines EWS,

Discussion

TLS/FUS et SYT (Perani et al., 2005; Sui et al., 2007), il serait intéressant de tester la capacité d'interaction d'ERM avec ces protéines.

Les zones d'interactions définies chez les partenaires de CoAA sont des régions relativement larges : le domaine C-terminal transactivateur de SYT (QPGY domain, AA 73–387) (Perani et al., 2005), la région C-terminale (AA 1641–2063) et celle contenant le motif LXXLL (AA 719–999) de TRBP (Iwasaki et al., 2001), la région C-terminale de CBP (AA 1195-2414) (Iwasaki et al., 2001) ou encore le domaine de fixation à l'ADN RUNT du facteur de transcription RUNX2 (AA 50-179) (Li et al., 2009). Aucune identité de séquence n'a pu être établie entre ces domaines. En ce qui concerne ERM, nous avons clairement démontré que, contrairement à ce qui est observé pour RUNX2, CoAA n'interagit pas avec son domaine de fixation à l'ADN (Li et al., 2009). En revanche, l'intégrité de la région située en amont du domaine ETS (AA 1-370) est nécessaire pour permettre une interaction optimale avec CoAA. Cette région ne présente pas d'identité de séquence avec les régions d'interaction définies chez les autres partenaires de CoAA. Cependant, de façon intéressante, la région 72-370 des trois membres du groupe PEA3 est riche en prolines (environ 15% de prolines) comme cela a été observé dans le domaine QPGY de SYT (Perani et al., 2005) et le domaine C-terminal de TRBP (Iwasaki et al., 2001). Or des études ont montré que les régions enrichies en ce résidu pouvaient être importantes pour les interactions protéiques (Kay et al., 2000; Solheim et al., 2008). Il se pourrait donc qu'une région riche en prolines soit une caractéristique permettant la fixation de CoAA.

CoAA est une ribonucléoprotéine impliquée dans l'épissage alternatif et l'activation transcriptionnelle de certains promoteurs (Auboeuf et al., 2005; Auboeuf et al., 2004a; Auboeuf et al., 2004b). Nous avons montré que CoAA augmente l'activité transcriptionnelle d'ERM sur les promoteurs *EndoA* et *Icam-1* dans les cellules RK13 mais également dans les cellules humaines de cancer du col de l'utérus HeLa ou les cellules humaines d'ostéosarcome U2OS (données non montrées). L'effet de CoAA observé sur l'activité transcriptionnelle d'ERM n'est pas relié à des phénomènes d'épissage puisque les rapporteurs luciférase que nous utilisons n'ont pas d'introns. Bien que CoAA augmente l'activité basale des promoteurs CMV et MMTV dans les cellules HeLa (Auboeuf et al., 2004b), cette protéine n'affecte pas de manière significative la transcription basale des promoteurs *EndoA* ou *Icam-1*. Ceci indique que CoAA agit probablement directement sur l'activité d'ERM. De plus, la diminution de l'expression de CoAA entraîne une diminution de l'activation du gène *Icam1* endogène par ERM. Ces résultats suggèrent que la protéine CoAA endogène est bien impliquée dans la régulation de l'activité transcriptionnelle d'ERM sur ses gènes cibles et à l'heure actuelle, nous mettons au point des expériences de CHIP pour confirmer cette donnée. Nous avons également démontré que l'activation induite par

Discussion

CoAA nécessitait l'interaction avec ERM. En effet, le mutant AxxQ, qui n'interagit pas avec ERM, ne stimule pas l'activité d'ERM. Cette notion est confirmée par le fait que CoAAC, qui interagit avec ERM par le domaine YQ, induit une répression dose-dépendante de l'activité transcriptionnelle de ce facteur, probablement en entrant en compétition avec la protéine CoAA endogène pour la fixation sur ERM. Toutefois, nous avons également établi que la délétion ou la substitution des domaines RRM de CoAA abolissait complètement l'augmentation de l'activité d'ERM sans affecter l'interaction avec ce facteur. Ceci signifie qu'une interaction directe entre ERM et CoAA est nécessaire mais n'est pas suffisante pour permettre à CoAA d'augmenter l'activité d'ERM. En outre, nos résultats soulignent l'importance et la spécificité des domaines RRM de CoAA dans ce processus. De façon intéressante, il a été démontré précédemment que la délétion des RRM de CoAA affectait également la réponse du promoteur MMTV à la dexaméthasone (Iwasaki et al., 2001). Ces motifs de reconnaissance des ARN sont aussi nécessaires à l'activité transcriptionnelle du promoteur CMV (Auboeuf et al., 2004b). Les RRM de CoAA jouent donc un rôle dans une partie des régulations transcriptionnelles induites par CoAA.

Jusqu'à présent, CoAA a été identifiée comme partenaire de quatre coactivateurs (SYT, CBP, TRBP et GHBP) dont elle augmente le pouvoir transactivateur (Conway-Campbell et al., 2008; Iwasaki et al., 2001; Iwasaki et al., 2005; Perani et al., 2005). Toutefois, CoAA ne semble pas être un activateur général de la transcription puisque nous avons établi qu'elle n'est pas capable de stimuler l'activité des facteurs de transcription E2F (donnée non montrée). Cette protéine a également été très récemment identifiée comme partenaire du facteur de transcription RUNX2 (Li et al., 2009). Dans ce dernier cas, CoAA interagit avec le domaine de fixation à l'ADN de cette protéine ce qui diminue sa capacité de fixation à l'ADN. RUNX2 pouvant agir en tant qu'activateur ou répresseur selon les promoteurs, l'interaction avec CoAA permet de diminuer ou augmenter l'expression de ses gènes-cibles (Li et al., 2009). ERM est donc le deuxième facteur de transcription identifié dont l'activité est modulée par CoAA. Néanmoins, les mécanismes de régulation de l'activité exercés par CoAA sur ces deux facteurs de transcription semblent être différents. En effet, dans le cas d'ERM, CoAA n'interagit pas avec le domaine ETS. De plus, nous avons montré que le remplacement de ce domaine par le domaine de fixation à l'ADN de Gal4 n'abolissait pas la stimulation induite par CoAA (donnée non montrée). Ceci suggère que l'activation d'ERM induite par CoAA est indépendante de la fixation à l'ADN d'ERM. Des expériences de retard sur gel permettraient de confirmer cette hypothèse. Par ailleurs, l'augmentation de l'activité d'ERM par CoAA n'est pas non plus reliée à une modulation du taux d'ERM ou un changement de sa localisation intracellulaire (expériences d'immunofluorescence non montrées).

Discussion

Nous avons pu établir que cette stimulation de l'activité d'ERM par CoAA est au moins partiellement reliée à la sumoylation d'ERM, une modification post-traductionnelle connue pour réguler négativement l'activité d'ERM (Degerny et al., 2005). En effet, l'activité transcriptionnelle des deux formes d'ERM non sumoylables (ERM KR et ERM EA) n'est pas affectée de manière significative par CoAA. De plus, CoAA diminue le taux de protéine ERM conjuguée à SUMO. La fonction de CoAA sur la sumoylation d'ERM est clairement confirmée dans le système Gal4 dans lequel la sumoylation des trois premiers sites SUMO d'ERM est responsable de l'inhibition exercée par le DRN (Degerny et al., 2008). Ainsi, nos données indiquent que l'augmentation d'activité d'ERM induite par CoAA peut être corrélée à une diminution du taux de sumoylation d'ERM. En d'autres termes, CoAA induit une diminution du niveau d'ERM sumoylée dans la cellule ce qui entraîne une augmentation de l'activité d'ERM puisque cette modification est connue pour réguler négativement l'activité d'ERM (Degerny et al., 2005). Ce même phénomène est observé sur PEA3 et ER81 ce qui laisse supposer que CoAA régule les membres du groupe PEA3 par un mécanisme équivalent. Cependant, il faut noter que l'activation d'ERM par CoAA ne permet pas d'atteindre le niveau d'activité d'ERM non sumoylable (ERM KR). Ceci est probablement lié au fait que le taux de sumoylation d'ERM est diminué en présence de CoAA mais n'est pas aboli. En effet, il a été montré précédemment qu'une faible proportion d'ERM sumoylée était suffisante pour induire une diminution importante de son activité (Degerny et al., 2008). Néanmoins, nous n'avons pas pu mettre en évidence pour le moment une augmentation nette de la sumoylation d'ERM suite à la diminution de l'expression de CoAA par l'utilisation de siRNA. Il est envisageable que la surexpression de SUMO, nécessaire à la visualisation des formes sumoylées d'ERM, permette déjà une sumoylation optimale de la protéine ERM qui ne peut plus être augmentée par la diminution de l'expression de CoAA. Il est également possible que la quantité de CoAA subsistante dans la cellule soit suffisante pour remplir sa fonction au niveau de la sumoylation d'ERM. Les expériences doivent être poursuivies afin d'examiner ces possibilités.

CoAA interagit avec ERM par la région 1-370 qui contient les quatre sites de sumoylation. Il est possible que cette protéine puisse limiter le recrutement de la machinerie de sumoylation en induisant un encombrement stérique ou un changement de conformation affectant la capacité de cette région à interagir avec les protéines impliquées dans le processus de sumoylation. Néanmoins, lorsque nous utilisons une protéine CoAA chimérique contenant les RRM d'une autre hnRNP, nous n'observons ni augmentation de l'activité d'ERM ni variation de sa sumoylation (donnée non montrée). La présence de ces RRM induisant probablement un encombrement du même ordre que celui induit par la protéine CoAA, la notion de limitation de recrutement de la machinerie de sumoylation

semble donc peu probable. Une autre possibilité serait que CoAA soit une sumoprotéase qui, recrutée par ERM, entraînerait sa désumoylation. Bien que nos résultats préliminaires d'interaction montrent que la GST-CoAA se fixe aussi bien à la protéine ERM 1-370 non modifiée qu'à la forme ERM 1-370 conjuguée à SUMO (résultat non montré), nous avons pu établir que CoAA, n'était capable ni de désumoyler ERM 1-370 sumoylée ni d'influencer la sumoylation globale de la cellule contrairement à la sumoprotéase Senp1. De plus, le domaine C-terminal de CoAA ne contient pas les résidus HDQC qui ont été décrits comme essentiels à la formation des sites catalytiques de toutes les sumoprotéases précédemment étudiées (Gong et al., 2000). L'ensemble de ces résultats nous amène à conclure que CoAA n'est pas une sumoprotéase pour ERM.

En revanche, nous ne pouvons pas exclure le fait que CoAA puisse induire le recrutement d'une sumoprotéase sur ERM. En effet, nous avons précédemment décrit que les RRM de CoAA étaient spécifiquement requis pour permettre la stimulation d'ERM et que le variant CoAM, qui contient ces domaines mais qui n'interagit pas avec ERM, induit une diminution dose-dépendante de l'activité de ce facteur de transcription. Ceci suggère que les RRM de CoAM pourraient entrer en compétition avec ceux de CoAA pour le recrutement de coactivateurs ou de complexes régulateurs. Ces complexes pourraient contenir, entre autres, une sumoprotéase (Figure 63). Il n'est pas impératif que ces complexes régulateurs doivent contenir un ARN puisqu'il a été montré que les domaines RRM pouvaient également permettre des interactions protéine-protéine (Maris et al., 2005).

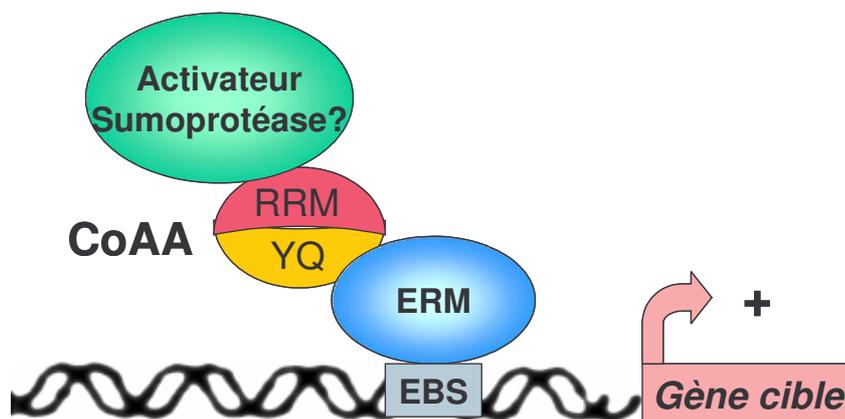


Figure 63 : Représentation schématique du modèle proposé de régulation de l'activité transcriptionnelle d'ERM par CoAA

CoAA pourrait ainsi réguler l'activation transcriptionnelle de ses interacteurs en modulant leur taux de conjugaison à SUMO. De manière intéressante, il a été décrit que le coactivateur CBP, dont l'activité est augmentée par CoAA (Iwasaki et al., 2001), peut être sumoylé (Girdwood et al., 2003). Cette modification post-traductionnelle réprime son activité transcriptionnelle (Girdwood et al., 2003). L'activation de CBP induite par CoAA pourrait

Discussion

donc être liée, comme nous l'avons observé pour ERM, à une modulation de son taux de sumoylation. Les trois autres activateurs dont l'activité est régulée par CoAA, en l'occurrence TRBP, SYT et GHBP n'ont pas été décrits, pour le moment, comme pouvant être sumoylés. Néanmoins, le logiciel Sumoplot (Abgent) prédit la présence avec une haute probabilité d'au moins un motif de sumoylation sur chacune de ces protéines. Il serait intéressant de tester si CoAA influence l'activité de ces différents coactivateurs en modulant leur taux de conjugaison à SUMO. Toutefois, nos données préliminaires indiquent que CoAA interagit avec p53 et augmente son activité transcriptionnelle sans moduler son taux de sumoylation. CoAA possède donc sûrement une fonction plus complexe qui ne se limite pas à la modulation du taux de sumoylation. Comme CoAA interagit avec des coactivateurs variés tels que CBP, PARP1 ou TRBP (Iwasaki et al., 2001), cette protéine est probablement intégrée dans des complexes multiprotéiques impliqués dans la régulation de l'activation transcriptionnelle. Ainsi, CoAA pourrait réguler l'activité transcriptionnelle d'ERM en modulant son taux de sumoylation mais aussi en recrutant des coactivateurs tels que CBP qui est connu pour réguler les membres du groupe PEA3 (voir introduction, paragraphe II3b, page 63).

La régulation de l'activité transcriptionnelle des membres du groupe PEA3 par CoAA pourrait être un processus important dans leur fonction. Lors de l'embryogenèse, il a en effet été décrit que l'expression de CoAA est relativement ubiquiste mais soumise à une régulation très fine de son expression et de son épissage (Brooks et al., 2009; Sui et al., 2007). Or les membres du groupe PEA3 sont impliqués dans de nombreux processus de développement tels que la morphogenèse de branchement (Chotteau-Lelievre et al., 2003) ou la mise en place du système nerveux (Arber et al., 2000) (voir introduction). La balance entre les isoformes CoAA et CoAM et leur niveau d'expression pourraient être un processus important pour la régulation de l'activité des membres du groupe PEA3 dans le développement.

Il a également été montré que la surexpression de CoAA induit la transformation des NIH 3T3 dans des tests en soft agar et que la diminution de son expression par siRNA entraînent une diminution de la prolifération des cellules cancéreuses pulmonaires H69 (Sui et al., 2007). De manière intéressante, CoAA est surexprimée dans nombre de cancers (Sui et al., 2007) dans lesquels les membres du groupe PEA3 sont aussi surexprimés (pour revue (de Launoit, 2006)). La surexpression concomitante dans un tissu cancéreux de CoAA et des membres du groupe PEA3 pourrait induire une augmentation de leur activité transcriptionnelle sur les promoteurs de leurs gènes cibles. Parmi ces derniers, certains sont des gènes impliqués dans le processus de métastase et l'augmentation de leur expression

pourrait donc conduire à l'apparition du phénotype métastatique. La modulation de l'expression des membres du groupe PEA3 dans certaines lignées cellulaires mammaires a été décrite comme ayant des conséquences sur les propriétés cellulaires notamment au niveau de la capacité d'invasion *in vitro* (Chotteau-Lelievre et al., 2003; Firlej et al., 2008; Kaya et al., 1996). Ainsi, au sein de notre équipe, il a été montré que la surexpression d'*erm* ou *pea3* dans des cellules de la lignée épithéliale mammaire TAC-2.1 augmente leur capacité à former des structures branchées et accroît leur capacité invasive (Chotteau-Lelievre et al., 2003). De plus, la surexpression de PEA3 est suffisante pour induire un phénotype invasif dans la lignée mammaire MCF-7 (Kaya et al., 1996). Il serait intéressant de reprendre ce type d'expérience en comparant le phénotype induit lorsque la surexpression de ces facteurs est associée à une sous-expression ou à une surexpression de CoAA afin d'évaluer l'impact de cet interacteur sur les propriétés cellulaires induites par ERM ou PEA3. Enfin, notre équipe a récemment décrit que l'utilisation de shRNA dirigés contre *pea3* ou *erm* dans des cellules agressives de tumeurs mammaires murines (MMT) permettait de diminuer leur prolifération, leur migration ainsi que leur capacité à s'organiser en 3D et à faire des clones en agar (Firlej et al., 2008). Ces altérations des propriétés de ces cellules sont corrélées à une modulation de l'expression de gènes impliqués dans la prolifération, la migration ou l'invasion (Firlej et al., 2008). CoAA modulant l'activité transcriptionnelle des membres du groupe PEA3, il serait intéressant de reprendre cette étude en diminuant l'expression de CoAA afin de déterminer si l'expression de ces gènes en est conséquemment plus inhibée.

IV Autres partenaires potentiels d'ERM

Nous avons identifié de façon reproductible environ 20 candidats. Parmi ceux-ci, sur la base de données bibliographiques, nous en avons sélectionné sept qui avaient des chances sérieuses de jouer un rôle dans la modulation de l'activité d'ERM et nous avons testé leur interaction avec ERM. Parmi ces protéines, trois interagissent de manière évidente avec ERM : MED23, MED25 et CoAA et l'étude de ces interacteurs a été engagée (voir les deux chapitres précédents). Trois autres protéines n'interagissent pas directement avec ERM : MED15, Sp100 qui est un coactivateur de EBNA2 (Broadhurst et al., 2005), de STAT5 et STAT6 (Paukku et al., 2003) et enfin MybBP1a qui est pourtant connue pour interagir avec des facteurs de transcription tels que Myb, NF- κ B, c-Jun, AhR et PGC-1 α (Owen et al., 2007). Soit ces protéines interagissent de façon indirecte avec ERM via une protéine intermédiaire, soit ce sont des faux-positifs. En ce qui concerne la septième protéine, PARP1

Discussion

(PolyADP-Ribose Polymerase I), nous avons observé une faible interaction directe avec ERM. Cette protéine est connue, entre autres, pour moduler la transcription en modifiant la structure de la chromatine (pour revue (Kraus, 2008)). Elle interagit également, en tant que coactivateur, avec de nombreux facteurs de transcription tels que NF- κ B, B-Myb, Oct-1 ou encore Sp1 (pour revue (Kraus, 2008)). Une étude préliminaire des effets de PARP1 sur l'activité transcriptionnelle d'ERM a montré que cette protéine semblait moduler faiblement l'activité du facteur de transcription dans les conditions testées. Il est possible qu'une éventuelle régulation de l'activité d'ERM par PARP1 nécessite la présence d'un co-facteur ou d'une modification post-traductionnelle : il a ainsi été montré que l'activation de PARP1 par ERK2 amplifie les signaux de la voie ERK qui, provoquant une augmentation de la phosphorylation de ELK1, aboutit à une expression accrue des gènes cibles de ELK1 (Cohen-Armon et al., 2007). Cette protéine reste donc un partenaire potentiel intéressant à étudier. Il faudra en particulier déterminer si cette protéine et ERM sont présents au sein des mêmes complexes *in vivo*.

A ce jour et à la lumière de nouvelles informations, d'autres protéines identifiées dans les purifications et non retenues dans ce travail peuvent représenter des candidats dignes d'intérêt (Tableau 9). Ainsi, KAP1 (KRAB domain-associated protein) aussi connu sous le nom de TIF1 β (transcription intermediary factor 1 β), est un corépresseur qui recrute, entre autres, le complexe NuRD/Mi-2 α (Schultz et al., 2001) (Tableau 9). Ce complexe comprend CHD3, protéine maintenant connue pour interagir avec ERM (Pastorcic and Das, 2007). KAP1 pourrait donc être capable d'inhiber l'activité transcriptionnelle d'ERM en aidant au recrutement des complexes répresseurs ou en stabilisant l'interaction entre ERM et CHD3. Nous ne pouvons cependant pas exclure le fait que KAP1 ait été purifiée sur ERM par l'intermédiaire de CHD3, bien que cette protéine n'ait pas été identifiée dans nos approches. Nous savons maintenant que CoAA, une protéine fixant les ARN, interagit et module l'activité transcriptionnelle d'ERM. De manière intéressante, nous avons trouvé dans nos purifications, outre CoAA, trois autres protéines fixant les ARNs. Cette présence n'est pas due à une contamination par de l'ARN car les extraits ont été traités à la benzonase. Ainsi, SFPQ (splicing factor proline and glutamate-rich), aussi nommée PSF (PTB associated splicing factor) est une protéine impliquée dans l'épissage des ARN (Shav-Tal and Zipori, 2002) et dans la transcription (Tableau 9). Elle peut être associée en complexe avec p54nrb et la matrin3 (Zhang and Carmichael, 2001), protéines que nous avons également retrouvées dans nos purifications (p54nrb n'ayant été trouvée qu'une fois, celle-ci ne figure pas dans le tableau 8, page 92). De façon intéressante, son inactivation chez le poisson zèbre a montré son rôle important dans le développement neuronal (Lowery et al., 2007), plus particulièrement dans la survie cellulaire et la différenciation. Les membres du groupe

Discussion

PEA3 étant également impliqués dans le développement neuronal (cf. Introduction), l'interaction entre ERM et SFPQ pourrait exercer un rôle important dans ce processus. La RNA Hélicase RHII/Gu, que nous avons identifiée dans nos purifications, déroule les ARN double-brin et introduit une structure secondaire dans les ARN simple brin (Valdez et al., 2002). Cette protéine a également été identifiée (par la technique TAP) comme partenaire de c-Jun dont elle stimule l'activité transcriptionnelle (Westermarck et al., 2002) (Tableau 9). Enfin, hnRNP U, aussi connue sous le nom de SAF-A (scaffold attachment factor A) est une protéine de la matrice nucléaire jouant un rôle majeur dans l'organisation structurale de la chromatine mais également capable de réguler la transcription (Kukalev et al., 2009) (tableau 9). Cette protéine est également capable de recruter p300 et p/CAF (Obordlik et al., 2008) (Martens et al., 2002), des partenaires connus des membres du groupe PEA3. HnRNP U ayant été identifié dans des purifications avec CBP, il est possible que l'une ou l'autre des protéines ait entraîné l'autre sur ERM.

Nom	Rôle connu dans la transcription
KAP1 ou TIF1 β	<ul style="list-style-type: none"> - impliquée dans la régulation épigénétique de la transcription - Corépresseur des facteurs de transcription ayant un domaine doigt de zinc de type KRAB (Friedman et al., 1996) mais aussi de c-Myb (Nomura et al., 2004), E2F1 (Chen et al., 2005) et STAT3 (Tsuruma et al., 2008). - Interagit avec TEL, une protéine de la famille ETS (Kawamura-Saito et al., 2006). - Recrute entre autres CHD3, partenaire connu d'ERM (Pastorcic and Das, 2007)
SFPQ ou PSF	<ul style="list-style-type: none"> - se fixe sur les régions régulatrices d'oncogènes ce qui les réprime inhibant ainsi l'oncogénèse (Koo et al., 2005) - interagit avec des récepteurs nucléaires ce qui conduit selon le cas à une répression ou une activation de leur pouvoir transcriptionnel (Kuwahara et al., 2006; Mathur et al., 2001)
RNA Hélicase RHII/Gu	<ul style="list-style-type: none"> - partenaire du facteur de transcription c-Jun (Westermarck et al., 2002) dont elle stimule l'activité transcriptionnelle par un mécanisme inconnu nécessitant son activité hélicase
HnRNPU ou SAF-A	<ul style="list-style-type: none"> - exerce un rôle général dans la transcription en participant à la régulation de l'activité de la pol II (Kim and Nikodem, 1999; Kukalev et al., 2005; Kukalev et al., 2009). - interagit avec le récepteur aux glucocorticoïdes (Eggert et al., 1997) et le facteur de transcription WT1 (Spraggon et al., 2007) dont elle réprime leur pouvoir transactivateur.

Tableau 9 : Rôle connu dans la transcription de partenaires potentiels d'ERM

A l'avenir, il serait intéressant d'engager des études sur ces protéines afin de déterminer si elles interagissent directement avec ERM et si elles sont présentes au sein de complexes contenant ERM. Si ces protéines sont bien des partenaires d'ERM, des études fonctionnelles devraient être entamées afin de mettre en évidence le rôle exercé par ces interactions sur la régulation transcriptionnelle d'ERM. Il est envisageable que plusieurs de ces protéines soient des interacteurs d'ERM mais que la régulation qu'elles exercent sur ERM soit fonction du gène cible impliqué.

V Conclusion et perspectives

Durant ma thèse, j'ai identifié une vingtaine de nouveaux partenaires potentiels d'ERM et plus particulièrement caractérisé trois d'entre eux (MED23, MED25 et CoAA) qui régulent positivement l'activité transcriptionnelle d'ERM mais aussi celle des autres membres du groupe PEA3. Ces protéines sont peut-être également impliquées dans la modulation de l'activité transcriptionnelle d'autres facteurs de la famille ETS tels que ETS1 comme le laisse supposer nos résultats préliminaires avec CoAA et MED23 (données non montrées). Il s'agit désormais de définir les mécanismes moléculaires responsables des activations transcriptionnelles observées.

Nous avons montré que les protéines MED23 et MED25 augmentaient l'activité transcriptionnelle d'ERM par des mécanismes encore inconnus. Ces protéines ayant une capacité différente en ce qui concerne le recrutement de complexes médiateur *in vitro* par ERM, leurs mécanismes d'action ne sont peut-être pas similaires. Il faudra ainsi déterminer si ces protéines ont des rôles indépendants ou non l'une de l'autre. En particulier, il importera de définir si ces deux sous-unités du médiateur coopèrent au sein d'un même complexe ou si elles peuvent être impliquées dans des complexes différents ou à des phases différentes de recrutement. Une récente étude d'immunoprécipitation de la chromatine chez la levure tend à montrer que le médiateur ne se fixerait que sur un nombre limité de promoteurs et de façon spécifique suite à un stress ou pour un activateur donné (Fan and Struhl, 2009). Il est donc possible que MED23 et MED25 soient des portes d'entrée pour recruter des complexes médiateurs différents selon les promoteurs et les circonstances. Les mécanismes moléculaires par lesquels le complexe médiateur régule finement la transcription ne sont pas encore bien connus, l'étude du rôle des sous-unités MED23 et MED25 devrait contribuer à mieux comprendre ces modes de fonctionnement. Enfin, l'étude du rôle potentiel de MED25 dans des complexes indépendants du médiateur permettra de mieux appréhender les interconnexions pouvant exister entre le médiateur et les complexes coactivateurs.

En ce qui concerne CoAA, nous avons pu démontrer que l'activation transcriptionnelle d'ERM induite par cette protéine pouvait être liée à une diminution du taux d'ERM conjuguée à SUMO. Ce nouvel interacteur a permis d'établir un premier mécanisme par lequel la sumoylation des membres du groupe PEA3 pouvait être régulée. Néanmoins, il reste à définir si cette modulation de la sumoylation est due au recrutement par CoAA d'une sumoprotéase ou si elle implique un autre phénomène non encore identifié. En outre, nous

Discussion

pouvons nous demander si cette molécule n'affecte pas d'autres modifications post-traductionnelles d'ERM. En effet, nos résultats préliminaires montrent que CoAA provoquerait également une augmentation de l'ubiquitination d'ERM. Il est donc envisageable que cette protéine joue un rôle dans la balance Ubiquitination/Sumoylation. CoAA pourrait alors être un élément important pour comprendre les interconnexions existant entre les modifications post-traductionnelles des membres du groupe PEA3. Elle pourrait également être impliquée dans le recrutement sur ERM de protéines différentes selon ces modifications. CoAA est en effet probablement intégrée au sein de complexes macromoléculaires et doit sûrement être impliquée dans le recrutement de coactivateurs tels que TRBP ou CBP. Cette protéine pourrait donc être l'intermédiaire entre ERM et les complexes coactivateurs.

L'étape suivante de cette étude consistera à définir les signaux qui participent à la modulation du recrutement de ces partenaires d'ERM. Il est probable que ce recrutement soit dépendant du promoteur étudié ; la protéine ERM interagissant avec des interacteurs différents selon le contexte physiologique. De plus, ces interactions pourraient être modulées par des modifications post-traductionnelles ou par la présence d'autres partenaires d'ERM qui les faciliteraient ou les déstabiliseraient. Il importera donc de définir les interconnexions potentiellement existantes dans le recrutement de ces différents partenaires, afin de mieux comprendre comment ils modulent finement l'activité des membres du groupe PEA3 au niveau de leurs gènes cibles. Il est ainsi intéressant de constater que TRBP interagit avec CoAA mais aussi avec MED23 (Ko et al., 2000) (Iwasaki et al., 2001). Ce coactivateur pourrait donc être recruté par l'un ou l'autre de ces partenaires d'ERM et faciliter le recrutement du second sur ce facteur de transcription.

Enfin, il sera primordial de replacer ces interactions dans un contexte physiologique afin de déterminer leur impact sur les membres du groupe PEA3. Ceci passera, entre autres, par la réalisation d'études transcriptomiques de manière à déterminer les gènes cibles d'ERM dont la régulation dépend du recrutement de ces partenaires. Il sera également intéressant d'étudier l'expression et le rôle de ces partenaires dans les cancers. Il a ainsi été montré que CoAA est surexprimée dans de nombreux cancers (Sui et al., 2007), ce qui pourrait en faire un régulateur important de l'activité d'ERM dans cette pathologie. L'ensemble de ces données permettra de mieux cerner le rôle des membres du groupe PEA3 dans un contexte physiologique normal mais aussi dans un contexte pathologique tel que le cancer.

Discussion

Bibliographie

Bibliographie

Bibliographie

- Anzick, S. L., Kononen, J., Walker, R. L., Azorsa, D. O., Tanner, M. M., Guan, X. Y., Sauter, G., Kallioniemi, O. P., Trent, J. M., and Meltzer, P. S. (1997). AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science* *277*, 965-968.
- Arber, S., Ladle, D. R., Lin, J. H., Frank, E., and Jessell, T. M. (2000). ETS gene Er81 controls the formation of functional connections between group Ia sensory afferents and motor neurons. *Cell* *101*, 485-498.
- Argasinska, J., Zhou, K., Donnelly, R. J., Hay, R. T., and Lee, C. G. (2004). A functional interaction between RHA and Ubc9, an E2-like enzyme specific for Sumo-1. *J Mol Biol* *341*, 15-25.
- Asada, S., Choi, Y., Yamada, M., Wang, S. C., Hung, M. C., Qin, J., and Uesugi, M. (2002). External control of Her2 expression and cancer cell growth by targeting a Ras-linked coactivator. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 12747-12752.
- Auboeuf, D., Dowhan, D. H., Dutertre, M., Martin, N., Berget, S. M., and O'Malley, B. W. (2005). A subset of nuclear receptor coregulators act as coupling proteins during synthesis and maturation of RNA transcripts. *Mol Cell Biol* *25*, 5307-5316.
- Auboeuf, D., Dowhan, D. H., Kang, Y. K., Larkin, K., Lee, J. W., Berget, S. M., and O'Malley, B. W. (2004a). Differential recruitment of nuclear receptor coactivators may determine alternative RNA splice site choice in target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 2270-2274.
- Auboeuf, D., Dowhan, D. H., Li, X., Larkin, K., Ko, L., Berget, S. M., and O'Malley, B. W. (2004b). CoAA, a nuclear receptor coactivator protein at the interface of transcriptional coactivation and RNA splicing. *Mol Cell Biol* *24*, 442-453.
- Ayadi, A., Zheng, H., Sobieszczuk, P., Buchwalter, G., Moerman, P., Alitalo, K., and Wasylyk, B. (2001). Net-targeted mutant mice develop a vascular phenotype and up-regulate *egr-1*. *Embo J* *20*, 5139-5152.
- Baert, J. L., Beaudoin, C., Coutte, L., and de Launoit, Y. (2002). ERM transactivation is up-regulated by the repression of DNA binding after the PKA phosphorylation of a consensus site at the edge of the ETS domain. *J Biol Chem* *277*, 1002-1012. Epub 2001 Oct 1026.
- Baert, J. L., Beaudoin, C., Monte, D., Degerny, C., Mauen, S., and de Launoit, Y. (2007). The 26S proteasome system degrades the ERM transcription factor and regulates its transcription-enhancing activity. *Oncogene* *26*, 415-424.
- Baert, J. L., Monte, D., Musgrove, E. A., Albagli, O., Sutherland, R. L., and de Launoit, Y. (1997). Expression of the PEA3 group of ETS-related transcription factors in human breast-cancer cells. *Int J Cancer* *70*, 590-597.
- Baldet, P., Alban, C., Axiotis, S., and Douce, R. (1992). Characterization of Biotin and 3-Methylcrotonyl-Coenzyme A Carboxylase in Higher Plant Mitochondria. *Plant Physiol* *99*, 450-455.
- Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani, S., Spensberger, D., de Knecht, Y., Tang, M., Lowenberg, B., and Delwel, R. (2005). Somatic heterozygous mutations in ETV6 (TEL) and frequent absence of ETV6 protein in acute myeloid leukemia. *Oncogene* *24*, 4129-4137.
- Bartel, F. O., Higuchi, T., and Spyropoulos, D. D. (2000). Mouse models in the study of the Ets family of transcription factors. *Oncogene* *19*, 6443-6454.
- Bassuk, A. G., and Leiden, J. M. (1995). A direct physical association between ETS and AP-1 transcription factors in normal human T cells. *Immunity* *3*, 223-237.
- Benedit, P., Paciucci, R., Thomson, T. M., Valeri, M., Nadal, M., Caceres, C., de Torres, I., Estivill, X., Lozano, J. J., Morote, J., and Reventos, J. (2001). PTOV1, a novel protein overexpressed in prostate cancer containing a new class of protein homology blocks. *Oncogene* *20*, 1455-1464.
- Benz, C. C., O'Hagan, R. C., Richter, B., Scott, G. K., Chang, C. H., Xiong, X., Chew, K., Ljung, B. M., Edgerton, S., Thor, A., and Hassell, J. A. (1997). HER2/Neu and the Ets transcription activator PEA3 are coordinately upregulated in human breast cancer. *Oncogene* *15*, 1513-1525.
- Bernier-Villamor, V., Sampson, D. A., Matunis, M. J., and Lima, C. D. (2002). Structural basis for E2-mediated SUMO conjugation revealed by a complex between ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 and RanGAP1. *Cell* *108*, 345-356.
- Biamonti, G., Ruggiu, M., Saccone, S., Della Valle, G., and Riva, S. (1994). Two homologous genes, originated by duplication, encode the human hnRNP proteins A2 and A1. *Nucleic Acids Res* *22*, 1996-2002.
- Bianchi, E., Denti, S., Catena, R., Rossetti, G., Polo, S., Gasparian, S., Putignano, S., Rogge, L., and Pardi, R. (2003). Characterization of human constitutive photomorphogenesis protein 1, a RING finger ubiquitin ligase that interacts with Jun transcription factors and modulates their transcriptional activity. *J Biol Chem* *278*, 19682-19690.

Bibliographie

- Bieche, I., Tozlu, S., Girault, I., Onody, P., Driouch, K., Vidaud, M., and Lidereau, R. (2004). Expression of PEA3/E1AF/ETV4, an Ets-related transcription factor, in breast tumors: positive links to MMP2, NRG1 and CGB expression. *Carcinogenesis* *25*, 405-411.
- Blazek, E., Mittler, G., and Meisterernst, M. (2005). The mediator of RNA polymerase II. *Chromosoma* *113*, 399-408.
- Boedefeld, W. M., 2nd, Soong, R., Weiss, H., Diasio, R. B., Urist, M. M., Bland, K. I., and Heslin, M. J. (2005). E1A-F is overexpressed early in human colorectal neoplasia and associated with cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-7. *Mol Carcinog* *43*, 13-17.
- Bojovic, B. B., and Hassell, J. A. (2001). The PEA3 Ets transcription factor comprises multiple domains that regulate transactivation and DNA binding. *J Biol Chem* *276*, 4509-4521. Epub 2000 Nov 4528.
- Bojovic, B. B., and Hassell, J. A. (2008). The transactivation function of the Pea3 subfamily Ets transcription factors is regulated by sumoylation. *DNA Cell Biol* *27*, 289-305.
- Bories, J. C., Willerford, D. M., Grevin, D., Davidson, L., Camus, A., Martin, P., Stehelin, D., and Alt, F. W. (1995). Increased T-cell apoptosis and terminal B-cell differentiation induced by inactivation of the Ets-1 proto-oncogene. *Nature* *377*, 635-638.
- Bosc, D. G., Goueli, B. S., and Janknecht, R. (2001). HER2/Neu-mediated activation of the ETS transcription factor ER81 and its target gene MMP-1. *Oncogene* *20*, 6215-6224.
- Boulukos, K. E., Pognonec, P., Begue, A., Galibert, F., Gesquiere, J. C., Stehelin, D., and Ghysdael, J. (1988). Identification in chickens of an evolutionarily conserved cellular ets-2 gene (c-ets-2) encoding nuclear proteins related to the products of the c-ets proto-oncogene. *Embo J* *7*, 697-705.
- Bourbon, H. M. (2008). Comparative genomics supports a deep evolutionary origin for the large, four-module transcriptional mediator complex. *Nucleic Acids Res* *36*, 3993-4008.
- Bourbon, H. M., Aguilera, A., Ansari, A. Z., Asturias, F. J., Berk, A. J., Bjorklund, S., Blackwell, T. K., Borggreffe, T., Carey, M., Carlson, M., *et al.* (2004). A unified nomenclature for protein subunits of mediator complexes linking transcriptional regulators to RNA polymerase II. *Mol Cell* *14*, 553-557.
- Bouwmeester, T., Bauch, A., Ruffner, H., Angrand, P. O., Bergamini, G., Croughton, K., Cruciat, C., Eberhard, D., Gagneur, J., Ghidelli, S., *et al.* (2004). A physical and functional map of the human TNF-alpha/NF-kappa B signal transduction pathway. *Nat Cell Biol* *6*, 97-105. Epub 2004 Jan 2025.
- Bowen, N. J., Fujita, N., Kajita, M., and Wade, P. A. (2004). Mi-2/NuRD: multiple complexes for many purposes. *Biochim Biophys Acta* *1677*, 52-57.
- Boyer-Guittaut, M., Birsoy, K., Potel, C., Elliott, G., Jaffray, E., Desterro, J. M., Hay, R. T., and Oelgeschlager, T. (2005). SUMO-1 modification of human transcription factor (TF) IID complex subunits: inhibition of TFIID promoter-binding activity through SUMO-1 modification of hTAF5. *J Biol Chem* *280*, 9937-9945. Epub 2005 Jan 9936.
- Boyer, T. G., Martin, M. E., Lees, E., Ricciardi, R. P., and Berk, A. J. (1999). Mammalian Srb/Mediator complex is targeted by adenovirus E1A protein. *Nature* *399*, 276-279.
- Broadhurst, M. K., Lee, R. S., Hawkins, S., and Wheeler, T. T. (2005). The p100 EBNA-2 coactivator: a highly conserved protein found in a range of exocrine and endocrine cells and tissues in cattle. *Biochim Biophys Acta* *1681*, 126-133.
- Brooks, C. L., and Gu, W. (2003). Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation. *Curr Opin Cell Biol* *15*, 164-171.
- Brooks, Y. S., Wang, G., Yang, Z., Smith, K. K., Bieberich, E., and Ko, L. (2009). Functional pre-mRNA Trans-splicing of coactivator CoAA and corepressor RBM4 during stem/progenitor cell differentiation. *J Biol Chem*.
- Brown, T. A., and McKnight, S. L. (1992). Specificities of protein-protein and protein-DNA interaction of GABP alpha and two newly defined ets-related proteins. *Genes Dev* *6*, 2502-2512.
- Cai, C., Hsieh, C. L., Omwancha, J., Zheng, Z., Chen, S. Y., Baert, J. L., and Shemshedini, L. (2007). ETV1 Is a Novel Androgen Receptor-Regulated Gene That Mediates Prostate Cancer Cell Invasion. *Mol Endocrinol* *21*, 1835-1846.
- Cantin, G. T., Stevens, J. L., and Berk, A. J. (2003). Activation domain-mediator interactions promote transcription preinitiation complex assembly on promoter DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 12003-12008.
- Cartegni, L., Maconi, M., Morandi, E., Cobianchi, F., Riva, S., and Biamonti, G. (1996). hnRNP A1 selectively interacts through its Gly-rich domain with different RNA-binding proteins. *J Mol Biol* *259*, 337-348.

Bibliographie

- Carver, B. S., Tran, J., Chen, Z., Carracedo-Perez, A., Alimonti, A., Nardella, C., Gopalan, A., Scardino, P. T., Cordon-Cardo, C., Gerald, W., and Pandolfi, P. P. (2009). ETS rearrangements and prostate cancer initiation. *Nature* *457*, E1; discussion E2-3.
- Casamassimi, A., and Napoli, C. (2007). Mediator complexes and eukaryotic transcription regulation: an overview. *Biochimie* *89*, 1439-1446.
- Cesari, F., Rennekampff, V., Vintersten, K., Vuong, L. G., Seibler, J., Bode, J., Wiebel, F. F., and Nordheim, A. (2004). Elk-1 knock-out mice engineered by Flp recombinase-mediated cassette exchange. *Genesis* *38*, 87-92.
- Chadick, J. Z., and Asturias, F. J. (2005). Structure of eukaryotic Mediator complexes. *Trends Biochem Sci* *30*, 264-271.
- Chauvet, S., Dessaud, E., and de Lapeyriere, O. (2004). [Molecular mechanisms leading to spinal motoneurons specialization in vertebrates]. *Med Sci (Paris)* *20*, 135-139.
- Chen, C., Ouyang, W., Grigura, V., Zhou, Q., Carnes, K., Lim, H., Zhao, G. Q., Arber, S., Kurpios, N., Murphy, T. L., *et al.* (2005). ERM is required for transcriptional control of the spermatogonial stem cell niche. *Nature* *436*, 1030-1034.
- Chen, J. H., and Wright, C. D. (1993). PEA3, Oct 1 and Oct 2 positively regulate the human ETS1 promoter. *Oncogene* *8*, 3375-3383.
- Chotteau-Lelievre, A., Desbiens, X., Pelczar, H., Defossez, P. A., and de Launoit, Y. (1997). Differential expression patterns of the PEA3 group transcription factors through murine embryonic development. *Oncogene* *15*, 937-952.
- Chotteau-Lelievre, A., Dolle, P., Peronne, V., Coutte, L., de Launoit, Y., and Desbiens, X. (2001). Expression patterns of the Ets transcription factors from the PEA3 group during early stages of mouse development. *Mech Dev* *108*, 191-195.
- Chotteau-Lelievre, A., Montesano, R., Soriano, J., Soulie, P., Desbiens, X., and de Launoit, Y. (2003). PEA3 transcription factors are expressed in tissues undergoing branching morphogenesis and promote formation of duct-like structures by mammary epithelial cells in vitro. *Dev Biol* *259*, 241-257.
- Chotteau-Lelievre, A., Revillion, F., Lhotellier, V., Hornez, L., Desbiens, X., Cabaret, V., de Launoit, Y., and Peyrat, J. P. (2004). Prognostic value of ERM gene expression in human primary breast cancers. *Clin Cancer Res* *10*, 7297-7303.
- Cohen-Armon, M., Visochek, L., Rozensal, D., Kalal, A., Geistrikh, I., Klein, R., Bendetz-Nezer, S., Yao, Z., and Seger, R. (2007). DNA-Independent PARP-1 Activation by Phosphorylated ERK2 Increases Elk1 Activity: A Link to Histone Acetylation. *Mol Cell* *25*, 297-308.
- Conaway, J. W., Florens, L., Sato, S., Tomomori-Sato, C., Parmely, T. J., Yao, T., Swanson, S. K., Banks, C. A., Washburn, M. P., and Conaway, R. C. (2005). The mammalian Mediator complex. *FEBS Lett* *579*, 904-908.
- Conway-Campbell, B. L., Brooks, A. J., Robinson, P. J., Perani, M., and Waters, M. J. (2008). The extracellular domain of the growth hormone receptor interacts with coactivator activator to promote cell proliferation. *Mol Endocrinol* *22*, 2190-2202.
- Corre, S., and Galibert, M. D. (2006). [USF as a key regulatory element of gene expression]. *Med Sci (Paris)* *22*, 62-67.
- Costello, P. S., Nicolas, R. H., Watanabe, Y., Rosewell, I., and Treisman, R. (2004). Ternary complex factor SAP-1 is required for Erk-mediated thymocyte positive selection. *Nat Immunol* *5*, 289-298.
- Cousins, D. J., Lee, T. H., and Staynov, D. Z. (2002). Cytokine coexpression during human Th1/Th2 cell differentiation: direct evidence for coordinated expression of Th2 cytokines. *J Immunol* *169*, 2498-2506.
- Coutte, L., Monte, D., Imai, K., Pouilly, L., Dewitte, F., Vidaud, M., Adamski, J., Baert, J. L., and de Launoit, Y. (1999). Characterization of the human and mouse ETV1/ER81 transcription factor genes: role of the two alternatively spliced isoforms in the human. *Oncogene* *18*, 6278-6286.
- Cowden Dahl, K. D., Zeineldin, R., and Hudson, L. G. (2007). PEA3 is necessary for optimal epidermal growth factor receptor-stimulated matrix metalloproteinase expression and invasion of ovarian tumor cells. *Mol Cancer Res* *5*, 413-421.
- Crawford, H. C., Fingleton, B., Gustavson, M. D., Kurpios, N., Wagenaar, R. A., Hassell, J. A., and Matrisian, L. M. (2001). The PEA3 subfamily of Ets transcription factors synergizes with beta-catenin-LEF-1 to activate matrilysin transcription in intestinal tumors. *Mol Cell Biol* *21*, 1370-1383.
- Croonquist, P. A., Linden, M. A., Zhao, F., and Van Ness, B. G. (2003). Gene profiling of a myeloma cell line reveals similarities and unique signatures among IL-6 response, N-ras-activating mutations, and coculture with bone marrow stromal cells. *Blood* *102*, 2581-2592.

Bibliographie

- Davidson, B., Goldberg, I., Gotlieb, W. H., Kopolovic, J., Ben-Baruch, G., and Reich, R. (2003). PEA3 is the second Ets family transcription factor involved in tumor progression in ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 9, 1412-1419.
- de Launoit, Y., Audette, M., Pelczar, H., Plaza, S., and Baert, J. L. (1998). The transcription of the intercellular adhesion molecule-1 is regulated by Ets transcription factors. *Oncogene* 16, 2065-2073.
- de Launoit, Y., Baert, J. L., Chotteau-Lelievre, A., Monte, D., Coutte, L., Mauen, S., Firlej, V., Degerny, C., and Verreman, K. (2006). The Ets transcription factors of the PEA3 group: transcriptional regulators in metastasis. *Biochim Biophys Acta* 1766, 79-87.
- de Launoit, Y., Chotteau-Lelievre, A., Beaudoin, C., Coutte, L., Netzer, S., Brenner, C., Huvent, I., and Baert, J. L. (2000). The PEA3 group of ETS-related transcription factors. Role in breast cancer metastasis. *Adv Exp Med Biol* 480, 107-116.
- Defosse, P. A., Baert, J. L., Monnot, M., and de Launoit, Y. (1997). The ETS family member ERM contains an alpha-helical acidic activation domain that contacts TAFII60. *Nucleic Acids Res* 25, 4455-4463.
- Degerny, C., de Launoit, Y., and Baert, J. L. (2008). ERM transcription factor contains an inhibitory domain which functions in sumoylation-dependent manner. *Biochim Biophys Acta* 1779, 183-194.
- Degerny, C., Monte, D., Beaudoin, C., Jaffray, E., Portois, L., Hay, R. T., de Launoit, Y., and Baert, J. L. (2005). SUMO modification of the Ets-related transcription factor ERM inhibits its transcriptional activity. *J Biol Chem* 280, 24330-24338.
- Disenza, M. T., Vaz, D., Hassell, J. A., and Pelletier, J. (2004). Activation of the WT1 tumor suppressor gene promoter by Pea3. *FEBS Lett* 560, 183-191.
- Donner, A. J., Szostek, S., Hoover, J. M., and Espinosa, J. M. (2007). CDK8 is a stimulus-specific positive coregulator of p53 target genes. *Mol Cell* 27, 121-133.
- Dowdy, S. C., Mariani, A., and Janknecht, R. (2003). HER2/Neu- and TAK1-mediated up-regulation of the transforming growth factor beta inhibitor Smad7 via the ETS protein ER81. *J Biol Chem* 278, 44377-44384.
- Dziembowski, A., and Seraphin, B. (2004). Recent developments in the analysis of protein complexes. *FEBS Lett* 556, 1-6.
- Eggert, M., Michel, J., Schneider, S., Bornfleth, H., Baniahmad, A., Fackelmayer, F. O., Schmidt, S., and Renkawitz, R. (1997). The glucocorticoid receptor is associated with the RNA-binding nuclear matrix protein hnRNP U. *J Biol Chem* 272, 28471-28478.
- El-Tanani, M., Platt-Higgins, A., Rudland, P. S., and Campbell, F. C. (2004). Ets gene, PEA3 cooperates with beta-Catenin-Lef-1 and c-jun in regulation of Osteopontin transcription. *J Biol Chem* 5, 5.
- El-Tanani, M. K., Campbell, F. C., Crowe, P., Erwin, P., Harkin, D. P., Pharoah, P., Ponder, B., and Rudland, P. S. (2006). BRCA1 suppresses osteopontin-mediated breast cancer. *J Biol Chem*.
- Fan, X., and Struhl, K. (2009). Where does mediator bind in vivo? *PLoS One* 4, e5029.
- Fauquette, V., Perrais, M., Cerulis, S., Jonckheere, N., Ducourouble, M. P., Aubert, J. P., Pigny, P., and Seuning, I. V. (2005). The antagonistic regulation of human MUC4 and ErbB-2 genes by the Ets protein PEA3 in pancreatic cancer cells: implications for the proliferation/differentiation balance in the cells. *Biochem J* 386, 35-45.
- Firlej, V., Bocquet, B., Desbiens, X., de Launoit, Y., and Chotteau-Lelievre, A. (2005). Pea3 Transcription Factor Cooperates with USF-1 in Regulation of the Murine bax Transcription without Binding to an Ets-binding Site. *J Biol Chem* 280, 887-898. Epub 2004 Oct 2005.
- Firlej, V., Ladam, F., Brysbaert, G., Dumont, P., Fuks, F., de Launoit, Y., Benecke, A., and Chotteau-Lelievre, A. (2008). Reduced tumorigenesis in mouse mammary cancer cells following inhibition of Pea3- or Erm-dependent transcription. *J Cell Sci* 121, 3393-3402.
- Firnberg, N., and Neubuser, A. (2002). FGF signaling regulates expression of Tbx2, Erm, Pea3, and Pax3 in the early nasal region. *Dev Biol* 247, 237-250.
- Flames, N., and Hobert, O. (2009). Gene regulatory logic of dopamine neuron differentiation. *Nature* 458, 885-889.
- Fondell, J. D., Guermah, M., Malik, S., and Roeder, R. G. (1999). Thyroid hormone receptor-associated proteins and general positive cofactors mediate thyroid hormone receptor function in the absence of the TATA box-binding protein-associated factors of TFIID. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1959-1964.
- Foulds, C. E., Nelson, M. L., Blaszczyk, A. G., and Graves, B. J. (2004). Ras/mitogen-activated protein kinase signaling activates Ets-1 and Ets-2 by CBP/p300 recruitment. *Mol Cell Biol* 24, 10954-10964.

Bibliographie

- Friedman, J. R., Fredericks, W. J., Jensen, D. E., Speicher, D. W., Huang, X. P., Neilson, E. G., and Rauscher, F. J., 3rd (1996). KAP-1, a novel corepressor for the highly conserved KRAB repression domain. *Genes Dev* 10, 2067-2078.
- Funaoka, K., Shindoh, M., Yoshida, K., Hanzawa, M., Hida, K., Nishikata, S., Totsuka, Y., and Fujinaga, K. (1997). Activation of the p21(Waf1/Cip1) promoter by the ets oncogene family transcription factor E1AF. *Biochem Biophys Res Commun* 236, 79-82.
- Galang, C. K., Muller, W. J., Foos, G., Oshima, R. G., and Hauser, C. A. (2004). Changes in the expression of many ets family transcription factors and of potential target genes in normal mammary tissue and tumors. *J Biol Chem* 279, 11281-11292. Epub 12003 Dec 11288.
- Gavin, A. C., Bosche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J. M., Michon, A. M., Cruciat, C. M., *et al.* (2002). Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* 415, 141-147.
- Gegonne, A., Leprince, D., Duterque-Coquillaud, M., Vandenbunder, B., Flourens, A., Ghysdael, J., Debuire, B., and Stehelin, D. (1987). Multiple domains for the chicken cellular sequences homologous to the v-ets oncogene of the E26 retrovirus. *Mol Cell Biol* 7, 806-812.
- Girdwood, D., Bumpass, D., Vaughan, O. A., Thain, A., Anderson, L. A., Snowden, A. W., Garcia-Wilson, E., Perkins, N. D., and Hay, R. T. (2003). P300 transcriptional repression is mediated by SUMO modification. *Mol Cell* 11, 1043-1054.
- Gocke, C. B., and Yu, H. (2008). ZNF198 stabilizes the LSD1-CoREST-HDAC1 complex on chromatin through its MYM-type zinc fingers. *PLoS One* 3, e3255.
- Gocke, C. B., Yu, H., and Kang, J. (2005). Systematic Identification and Analysis of Mammalian Small Ubiquitin-like Modifier Substrates. *J Biol Chem* 280, 5004-5012. Epub 2004 Nov 5023.
- Goel, A., and Janknecht, R. (2003). Acetylation-mediated transcriptional activation of the ETS protein ER81 by p300, P/CAF, and HER2/Neu. *Mol Cell Biol* 23, 6243-6254.
- Goel, A., and Janknecht, R. (2004). Concerted activation of ETS protein ER81 by p160 coactivators, the acetyltransferase p300 and the receptor tyrosine kinase HER2/Neu. *J Biol Chem* 279, 14909-14916.
- Goldberg, S. F., Miele, M. E., Hatta, N., Takata, M., Paquette-Straub, C., Freedman, L. P., and Welch, D. R. (2003). Melanoma metastasis suppression by chromosome 6: evidence for a pathway regulated by CRSP3 and TXNIP. *Cancer Res* 63, 432-440.
- Gong, L., Millas, S., Maul, G. G., and Yeh, E. T. (2000). Differential regulation of sentrinized proteins by a novel sentrin-specific protease. *J Biol Chem* 275, 3355-3359.
- Goueli, B. S., and Janknecht, R. (2004). Upregulation of the Catalytic Telomerase Subunit by the Transcription Factor ER81 and Oncogenic HER2/Neu, Ras, or Raf. *Mol Cell Biol* 24, 25-35.
- Graves, B. J., and Petersen, J. M. (1998). Specificity within the ets family of transcription factors. *Adv Cancer Res* 75, 1-55.
- Greenall, A., Willingham, N., Cheung, E., Boam, D. S., and Sharrocks, A. D. (2001). DNA binding by the ETS-domain transcription factor PEA3 is regulated by intramolecular and intermolecular protein-protein interactions. *J Biol Chem* 276, 16207-16215. Epub 12001 Jan 16217.
- Gu, W., Malik, S., Ito, M., Yuan, C. X., Fondell, J. D., Zhang, X., Martinez, E., Qin, J., and Roeder, R. G. (1999). A novel human SRB/MED-containing cofactor complex, SMCC, involved in transcription regulation. *Mol Cell* 3, 97-108.
- Guo, B., Sallis, R. E., Greenall, A., Petit, M. M., Jansen, E., Young, L., Van de Ven, W. J., and Sharrocks, A. D. (2006). The LIM Domain Protein LPP Is a Coactivator for the ETS Domain Transcription Factor PEA3. *Mol Cell Biol* 26, 4529-4538.
- Guo, B., and Sharrocks, A. D. (2009). Extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase signaling initiates a dynamic interplay between sumoylation and ubiquitination to regulate the activity of the transcriptional activator PEA3. *Mol Cell Biol* 29, 3204-3218.
- Haase, G., Dessaud, E., Garces, A., de Bovis, B., Birling, M., Filippi, P., Schmalbruch, H., Arber, S., and deLapeyriere, O. (2002). GDNF acts through PEA3 to regulate cell body positioning and muscle innervation of specific motor neuron pools. *Neuron* 35, 893-905.
- Habelhah, H., Okada, F., Kobayashi, M., Nakai, K., Choi, S., Hamada, J., Moriuchi, T., Kaya, M., Yoshida, K., Fujinaga, K., and Hosokawa, M. (1999). Increased E1AF expression in mouse fibrosarcoma promotes metastasis through induction of MT1-MMP expression. *Oncogene* 18, 1771-1776.
- Hagedorn, L., Paratore, C., Brugnoli, G., Baert, J. L., Mercader, N., Suter, U., and Sommer, L. (2000). The Ets domain transcription factor Erm distinguishes rat satellite glia from Schwann cells and is regulated in satellite cells by neuregulin signaling. *Dev Biol* 219, 44-58.
- Hannemann, J. R., McManus, D. M., Kabarowski, J. H., and Wiedemann, L. M. (1998). Haemopoietic transformation by the TEL/ABL oncogene. *Br J Haematol* 102, 475-485.

Bibliographie

- Hasegawa, H., Ashigaki, S., Takamatsu, M., Suzuki-Migishima, R., Ohbayashi, N., Itoh, N., Takada, S., and Tanabe, Y. (2004). Laminar patterning in the developing neocortex by temporally coordinated fibroblast growth factor signaling. *J Neurosci* *24*, 8711-8719.
- Hay, R. T. (2005). SUMO A History of Modification. *Mol Cell* *18*, 1-12.
- Helgeson, B. E., Tomlins, S. A., Shah, N., Laxman, B., Cao, Q., Prensner, J. R., Cao, X., Singla, N., Montie, J. E., Varambally, S., *et al.* (2008). Characterization of TMPRSS2:ETV5 and SLC45A3:ETV5 gene fusions in prostate cancer. *Cancer Res* *68*, 73-80.
- Helmbacher, F., Dessaud, E., Arber, S., deLapeyriere, O., Henderson, C. E., Klein, R., and Maina, F. (2003). Met signaling is required for recruitment of motor neurons to PEA3-positive motor pools. *Neuron* *39*, 767-777.
- Hendricks, T., Francis, N., Fyodorov, D., and Deneris, E. S. (1999). The ETS domain factor Pet-1 is an early and precise marker of central serotonin neurons and interacts with a conserved element in serotonergic genes. *J Neurosci* *19*, 10348-10356.
- Hengartner, C. J., Thompson, C. M., Zhang, J., Chao, D. M., Liao, S. M., Koleske, A. J., Okamura, S., and Young, R. A. (1995). Association of an activator with an RNA polymerase II holoenzyme. *Genes Dev* *9*, 897-910.
- Hess, R. A., Cooke, P. S., Hofmann, M. C., and Murphy, K. M. (2006). Mechanistic insights into the regulation of the spermatogonial stem cell niche. *Cell Cycle* *5*, 1164-1170.
- Hesselbrock, D. R., Kurpios, N., Hassell, J. A., Watson, M. A., and Fleming, T. P. (2005). PEA3, AP-1, and a unique repetitive sequence all are involved in transcriptional regulation of the breast cancer-associated gene, mammaglobin. *Breast Cancer Res Treat* *89*, 289-296.
- Hida, K., Shindoh, M., Yoshida, K., Kudoh, A., Furaoka, K., Kohgo, T., Fujinaga, K., and Totsuka, Y. (1997). Expression of E1AF, an ets-family transcription factor, is correlated with the invasive phenotype of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* *33*, 426-430.
- Higashino, F., Yoshida, K., Fujinaga, Y., Kamio, K., and Fujinaga, K. (1993). Isolation of a cDNA encoding the adenovirus E1A enhancer binding protein: a new human member of the ets oncogene family. *Nucleic Acids Res* *21*, 547-553.
- Higashino, F., Yoshida, K., Noumi, T., Seiki, M., and Fujinaga, K. (1995). Ets-related protein E1A-F can activate three different matrix metalloproteinase gene promoters. *Oncogene* *10*, 1461-1463.
- Hittelman, A. B., Burakov, D., Iniguez-Lluhi, J. A., Freedman, L. P., and Garabedian, M. J. (1999). Differential regulation of glucocorticoid receptor transcriptional activation via AF-1-associated proteins. *Embo J* *18*, 5380-5388.
- Hoeller, D., Hecker, C. M., and Dikic, I. (2006). Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer* *6*, 776-788.
- Hollenhorst, P. C., Shah, A. A., Hopkins, C., and Graves, B. J. (2007). Genome-wide analyses reveal properties of redundant and specific promoter occupancy within the ETS gene family. *Genes Dev* *21*, 1882-1894.
- Holstege, F. C., Jennings, E. G., Wyrick, J. J., Lee, T. I., Hengartner, C. J., Green, M. R., Golub, T. R., Lander, E. S., and Young, R. A. (1998). Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome. *Cell* *95*, 717-728.
- Howe, L. R., Crawford, H. C., Subbaramaiah, K., Hassell, J. A., Dannenberg, A. J., and Brown, A. M. (2001). PEA3 is up-regulated in response to Wnt1 and activates the expression of cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* *276*, 20108-20115. Epub 22001 Mar 20126.
- Howe, L. R., Watanabe, O., Leonard, J., and Brown, A. M. (2003). Twist is up-regulated in response to Wnt1 and inhibits mouse mammary cell differentiation. *Cancer Res* *63*, 1906-1913.
- Hsia, N., and Cornwall, G. A. (2004). DNA microarray analysis of region-specific gene expression in the mouse epididymis. *Biol Reprod* *70*, 448-457.
- Hsu, T., and Schulz, R. A. (2000). Sequence and functional properties of Ets genes in the model organism *Drosophila*. *Oncogene* *19*, 6409-6416.
- Iguchi, A., Kitajima, I., Yamakuchi, M., Ueno, S., Aikou, T., Kubo, T., Matsushima, K., Mukaida, N., and Maruyama, I. (2000). PEA3 and AP-1 are required for constitutive IL-8 gene expression in hepatoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* *279*, 166-171.
- Im, Y. H., Kim, H. T., Lee, C., Poulin, D., Welford, S., Sorensen, P. H., Denny, C. T., and Kim, S. J. (2000). EWS-FLI1, EWS-ERG, and EWS-ETV1 oncoproteins of Ewing tumor family all suppress transcription of transforming growth factor beta type II receptor gene. *Cancer Res* *60*, 1536-1540.
- Ishida, S., Higashino, F., Aoyagi, M., Takahashi, A., Suzuki, T., Shindoh, M., Fujinaga, K., and Yoshida, K. (2006). Genomic structure and promoter activity of the E1AF gene, a member of the ETS oncogene family. *Biochem Biophys Res Commun* *339*, 325-330.

Bibliographie

- Ito, M., Okano, H. J., Darnell, R. B., and Roeder, R. G. (2002). The TRAP100 component of the TRAP/Mediator complex is essential in broad transcriptional events and development. *Embo J* 21, 3464-3475.
- Ito, M., Yuan, C. X., Malik, S., Gu, W., Fondell, J. D., Yamamura, S., Fu, Z. Y., Zhang, X., Qin, J., and Roeder, R. G. (1999). Identity between TRAP and SMCC complexes indicates novel pathways for the function of nuclear receptors and diverse mammalian activators. *Mol Cell* 3, 361-370.
- Ivanov, A. V., Peng, H., Yurchenko, V., Yap, K. L., Negorev, D. G., Schultz, D. C., Psulkowski, E., Fredericks, W. J., White, D. E., Maul, G. G., *et al.* (2007). PHD domain-mediated E3 ligase activity directs intramolecular sumoylation of an adjacent bromodomain required for gene silencing. *Mol Cell* 28, 823-837.
- Ivanov X, M. Z., Nedyalkov S, Todorov TG (1962). Experimental investigation into avian leukosis. Transmission experiments of certain diseases of the avian leukosis complex found in Bulgaria. *Bulgarian Acad Sci Inst Pathol Comp Animaux Domestiques* 5, 5-36.
- Iwama, A., Zhang, P., Darlington, G. J., McKercher, S. R., Maki, R., and Tenen, D. G. (1998). Use of RDA analysis of knockout mice to identify myeloid genes regulated in vivo by PU.1 and C/EBPalpha. *Nucleic Acids Res* 26, 3034-3043.
- Iwasaki, T., Chin, W. W., and Ko, L. (2001). Identification and characterization of RRM-containing coactivator activator (CoAA) as TRBP-interacting protein, and its splice variant as a coactivator modulator (CoAM). *J Biol Chem* 276, 33375-33383.
- Iwasaki, T., Koibuchi, N., and Chin, W. W. (2005). Synovial sarcoma translocation (SYT) encodes a nuclear receptor coactivator. *Endocrinology* 146, 3892-3899.
- Izumiyama, Y., Ohiro, Y., Higashino, F., Yoshida, K., Taguchi, K., Todo, S., Kohgo, T., Totsuka, Y., and Shindoh, M. (2005). E1AF expression is closely correlated with malignant phenotype of tongue squamous cell carcinoma through activation of MT1-MMP gene promoters. *Oncol Rep* 13, 715-720.
- Janknecht, R. (1996). Analysis of the ERK-stimulated ETS transcription factor ER81. *Mol Cell Biol* 16, 1550-1556.
- Janknecht, R. (2001). Cell type-specific inhibition of the ETS transcription factor ER81 by mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2. *J Biol Chem* 276, 41856-41861. Epub 42001 Sep 41810.
- Janknecht, R. (2003). Regulation of the ER81 transcription factor and its coactivators by mitogen- and stress-activated protein kinase 1 (MSK1). *Oncogene* 22, 746-755.
- Janknecht, R. (2005). EWS-ETS oncoproteins: the linchpins of Ewing tumors. *Gene* 363, 1-14.
- Janknecht, R., and Hunter, T. (1996). Transcription. A growing coactivator network. *Nature* 383, 22-23.
- Jeon, I. S., Davis, J. N., Braun, B. S., Sublett, J. E., Roussel, M. F., Denny, C. T., and Shapiro, D. N. (1995). A variant Ewing's sarcoma translocation (7;22) fuses the EWS gene to the ETS gene ETV1. *Oncogene* 10, 1229-1234.
- Jiang, J., Wei, Y., Liu, D., Zhou, J., Shen, J., Chen, X., Zhang, S., Kong, X., and Gu, J. (2007). E1AF promotes breast cancer cell cycle progression via upregulation of Cyclin D3 transcription. *Biochem Biophys Res Commun* 358, 53-58.
- Kaneko, Y., Yoshida, K., Handa, M., Toyoda, Y., Nishihira, H., Tanaka, Y., Sasaki, Y., Ishida, S., Higashino, F., and Fujinaga, K. (1996). Fusion of an ETS-family gene, E1AF, to EWS by t(17;22)(q12;q12) chromosome translocation in an undifferentiated sarcoma of infancy. *Genes Chromosomes Cancer* 15, 115-121.
- Kang, Y. K., Schiff, R., Ko, L., Wang, T., Tsai, S. Y., Tsai, M. J., and O'Malley, B. W. (2008). Dual roles for coactivator activator and its counterbalancing isoform coactivator modulator in human kidney cell tumorigenesis. *Cancer Res* 68, 7887-7896.
- Karamouzis, M. V., Konstantinopoulos, P. A., Badra, F. A., and Papavassiliou, A. G. (2007). SUMO and estrogen receptors in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*.
- Kathuria, H., Cao, Y., Hinds, A., Ramirez, M. I., and Williams, M. C. (2007). ERM is expressed by alveolar epithelial cells in adult mouse lung and regulates caveolin-1 transcription in mouse lung epithelial cell lines. *J Cell Biochem* 102, 13-27.
- Kato, H., Tjernberg, A., Zhang, W., Krutchinsky, A. N., An, W., Takeuchi, T., Ohtsuki, Y., Sugano, S., de Bruijn, D. R., Chait, B. T., and Roeder, R. G. (2002). SYT associates with human SNF/SWI complexes and the C-terminal region of its fusion partner SSX1 targets histones. *J Biol Chem* 277, 5498-5505.
- Kawamura-Saito, M., Yamazaki, Y., Kaneko, K., Kawaguchi, N., Kanda, H., Mukai, H., Gotoh, T., Motoi, T., Fukayama, M., Aburatani, H., *et al.* (2006). Fusion between CIC and DUX4 up-regulates PEA3 family genes in Ewing-like sarcomas with t(4;19)(q35;q13) translocation. *Hum Mol Genet* 15, 2125-2137.

Bibliographie

- Kay, B. K., Williamson, M. P., and Sudol, M. (2000). The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *Faseb J* 14, 231-241.
- Kaya, M., Yoshida, K., Higashino, F., Mitaka, T., Ishii, S., and Fujinaga, K. (1996). A single ets-related transcription factor, E1AF, confers invasive phenotype on human cancer cells. *Oncogene* 12, 221-227.
- Keefe, A. D., Wilson, D. S., Seelig, B., and Szostak, J. W. (2001). One-step purification of recombinant proteins using a nanomolar-affinity streptavidin-binding peptide, the SBP-Tag. *Protein Expr Purif* 23, 440-446.
- Kim, M. K., and Nikodem, V. M. (1999). hnRNP U inhibits carboxy-terminal domain phosphorylation by TFIIH and represses RNA polymerase II elongation. *Mol Cell Biol* 19, 6833-6844.
- Kim, T. W., Kwon, Y. J., Kim, J. M., Song, Y. H., Kim, S. N., and Kim, Y. J. (2004). MED16 and MED23 of Mediator are coactivators of lipopolysaccharide- and heat-shock-induced transcriptional activators. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 12153-12158.
- Kim, Y. J., Bjorklund, S., Li, Y., Sayre, M. H., and Kornberg, R. D. (1994). A multiprotein mediator of transcriptional activation and its interaction with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II. *Cell* 77, 599-608.
- Kinoshita, J., Kitamura, K., Tanaka, S., Sugimachi, K., Ishida, M., and Saeki, H. (2002). Clinical significance of PEA3 in human breast cancer. *Surgery* 131, S222-225.
- Knuesel, M., Wan, Y., Xiao, Z., Holinger, E., Lowe, N., Wang, W., and Liu, X. (2003). Identification of novel protein-protein interactions using a versatile Mammalian tandem affinity purification expression system. *Mol Cell Proteomics* 2, 1225-1233. Epub 2003 Sep 1228.
- Ko, L., Cardona, G. R., and Chin, W. W. (2000). Thyroid hormone receptor-binding protein, an LXXLL motif-containing protein, functions as a general coactivator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6212-6217.
- Koch, H. B., Zhang, R., Verdoodt, B., Bailey, A., Zhang, C. D., Yates, J. R., 3rd, Menssen, A., and Hermeking, H. (2007). Large-scale identification of c-MYC-associated proteins using a combined TAP/MudPIT approach. *Cell Cycle* 6, 205-217.
- Koleske, A. J., and Young, R. A. (1994). An RNA polymerase II holoenzyme responsive to activators. *Nature* 368, 466-469.
- Koo, S. J., and Pfaff, S. L. (2002). Fine-tuning motor neuron properties: signaling from the periphery. *Neuron* 35, 823-826.
- Koo, T. B., Song, H., Moon, I., Han, K., Chen, C., Murphy, K., and Lim, H. (2005). Differential expression of the PEA3 subfamily of ETS transcription factors in the mouse ovary and peri-implantation uterus. *Reproduction* 129, 651-657.
- Kopp, J. L., Wilder, P. J., Desler, M., Kim, J. H., Hou, J., Nowling, T., and Rizzino, A. (2004). Unique and selective effects of five Ets family members, Elf3, Ets1, Ets2, PEA3 and PU.1, on the promoter of the type II TGF-beta receptor gene. *J Biol Chem* 279, 26626-26634.
- Korenjak, M., Taylor-Harding, B., Binne, U. K., Satterlee, J. S., Stevaux, O., Aasland, R., White-Cooper, H., Dyson, N., and Brehm, A. (2004). Native E2F/RBF complexes contain Myb-interacting proteins and repress transcription of developmentally controlled E2F target genes. *Cell* 119, 181-193.
- Korz, C., Pscherer, A., Benner, A., Mertens, D., Schaffner, C., Leupolt, E., Dohner, H., Stilgenbauer, S., and Lichter, P. (2002). Evidence for distinct pathomechanisms in B-cell chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma by quantitative expression analysis of cell cycle and apoptosis-associated genes. *Blood* 99, 4554-4561.
- Kraus, W. L. (2008). Transcriptional control by PARP-1: chromatin modulation, enhancer-binding, coregulation, and insulation. *Curr Opin Cell Biol* 20, 294-302.
- Kubota, H., Avarbock, M. R., and Brinster, R. L. (2004). Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 16489-16494.
- Kukalev, A., Nord, Y., Palmberg, C., Bergman, T., and Percipalle, P. (2005). Actin and hnRNP U cooperate for productive transcription by RNA polymerase II. *Nat Struct Mol Biol* 12, 238-244.
- Kukalev, A. S., Lobov, I. B., Percipalle, P., and Podgornaya, O. I. (2009). SAF-A/hnRNP-U localization in interphase and metaphase. *Cytogenet Genome Res* 124, 288-297.
- Kumar-Sinha, C., Tomlins, S. A., and Chinnaiyan, A. M. (2008). Recurrent gene fusions in prostate cancer. *Nat Rev Cancer* 8, 497-511.
- Kurpios, N. A., MacNeil, L., Shepherd, T. G., Gludish, D. W., Giacomelli, A. O., and Hassell, J. A. (2009). The Pea3 Ets transcription factor regulates differentiation of multipotent progenitor cells during mammary gland development. *Dev Biol* 325, 106-121.

Bibliographie

- Kurpios, N. A., Sabolic, N. A., Shepherd, T. G., Fidalgo, G. M., and Hassell, J. A. (2003). Function of PEA3 Ets transcription factors in mammary gland development and oncogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 8, 177-190.
- Kuwahara, S., Ikei, A., Taguchi, Y., Tabuchi, Y., Fujimoto, N., Obinata, M., Uesugi, S., and Kurihara, Y. (2006). PSPC1, NONO, and SFPQ are expressed in mouse Sertoli cells and may function as coregulators of androgen receptor-mediated transcription. *Biol Reprod* 75, 352-359.
- Lacorazza, H. D., Miyazaki, Y., Di Cristofano, A., Deblasio, A., Hedvat, C., Zhang, J., Cordon-Cardo, C., Mao, S., Pandolfi, P. P., and Nimer, S. D. (2002). The ETS protein MEF plays a critical role in perforin gene expression and the development of natural killer and NK-T cells. *Immunity* 17, 437-449.
- Lacorazza, H. D., and Nimer, S. D. (2003). The emerging role of the myeloid Elf-1 like transcription factor in hematopoiesis. *Blood Cells Mol Dis* 31, 342-350.
- Lacronique, V., Boureux, A., Valle, V. D., Poirel, H., Quang, C. T., Mauchauffe, M., Berthou, C., Lessard, M., Berger, R., Ghysdael, J., and Bernard, O. A. (1997). A TEL-JAK2 fusion protein with constitutive kinase activity in human leukemia. *Science* 278, 1309-1312.
- Ladle, D. R., and Frank, E. (2002). The role of the ETS gene PEA3 in the development of motor and sensory neurons. *Physiol Behav* 77, 571-576.
- Laget, M. P., Defosse, P. A., Albagli, O., Baert, J. L., Dewitte, F., Stehelin, D., and de Launoit, Y. (1996). Two functionally distinct domains responsible for transactivation by the Ets family member ERM. *Oncogene* 12, 1325-1336.
- Laing, M. A., Coonrod, S., Hinton, B. T., Downie, J. W., Tozer, R., Rudnicki, M. A., and Hassell, J. A. (2000). Male sexual dysfunction in mice bearing targeted mutant alleles of the PEA3 ets gene. *Mol Cell Biol* 20, 9337-9345.
- Laitem, C., Choul-Li, S., Baillat, D., Begue, A., and Aumercier, M. (2008). Efficient system for biotinylated recombinant Ets-1 production in *Escherichia coli*: a useful tool for studying interactions between Ets-1 and its partners. *Protein Expr Purif* 62, 53-63.
- Laudet, V., Hanni, C., Stehelin, D., and Duterque-Coquillaud, M. (1999). Molecular phylogeny of the ETS gene family. *Oncogene* 18, 1351-1359.
- Lee, D., Park, C., Lee, H., Lugus, J. J., Kim, S. H., Arentson, E., Chung, Y. S., Gomez, G., Kyba, M., Lin, S., *et al.* (2008). ER71 acts downstream of BMP, Notch, and Wnt signaling in blood and vessel progenitor specification. *Cell Stem Cell* 2, 497-507.
- Lee, H. K., Park, U. H., Kim, E. J., and Um, S. J. (2007). MED25 is distinct from TRAP220/MED1 in cooperating with CBP for retinoid receptor activation. *Embo J* 26, 3545-3557.
- Leo, C., and Chen, J. D. (2000). The SRC family of nuclear receptor coactivators. *Gene* 245, 1-11.
- Leprince, D., Gegonne, A., Coll, J., de Taisne, C., Schneeberger, A., Lagrou, C., and Stehelin, D. (1983). A putative second cell-derived oncogene of the avian leukaemia retrovirus E26. *Nature* 306, 395-397.
- Li, R., Pei, H., and Watson, D. K. (2000). Regulation of Ets function by protein - protein interactions. *Oncogene* 19, 6514-6523.
- Li, X., Hoepfner, L. H., Jensen, E. D., Gopalakrishnan, R., and Westendorf, J. J. (2009). Co-activator activator (CoAA) prevents the transcriptional activity of Runt domain transcription factors. *J Cell Biochem*.
- Lin, S., Perl, A. K., and Shannon, J. M. (2006). Erm/thyroid transcription factor 1 interactions modulate surfactant protein C transcription. *J Biol Chem*.
- Liu, Y., Borchert, G. L., and Phang, J. M. (2004). Polyoma enhancer activator 3, an ets transcription factor, mediates the induction of cyclooxygenase-2 by nitric oxide in colorectal cancer cells. *J Biol Chem* 279, 18694-18700. Epub 12004 Feb 18619.
- Liu, Y., Jiang, H., Crawford, H. C., and Hogan, B. L. (2003). Role for ETS domain transcription factors Pea3/Erm in mouse lung development. *Dev Biol* 261, 10-24.
- Livet, J., Sigrist, M., Stroebel, S., De Paola, V., Price, S. R., Henderson, C. E., Jessell, T. M., and Arber, S. (2002). ETS gene Pea3 controls the central position and terminal arborization of specific motor neuron pools. *Neuron* 35, 877-892.
- Lowery, L. A., Rubin, J., and Sive, H. (2007). Whitesnake/sfpq is required for cell survival and neuronal development in the zebrafish. *Dev Dyn* 236, 1347-1357.
- Malik, S., Gu, W., Wu, W., Qin, J., and Roeder, R. G. (2000). The USA-derived transcriptional coactivator PC2 is a submodule of TRAP/SMCC and acts synergistically with other PCs. *Mol Cell* 5, 753-760.
- Malik, S., and Roeder, R. G. (2005). Dynamic regulation of pol II transcription by the mammalian Mediator complex. *Trends Biochem Sci* 30, 256-263.

Bibliographie

- Mao, J., McGlenn, E., Huang, P., Tabin, C. J., and McMahon, A. P. (2009). Fgf-dependent Etv4/5 activity is required for posterior restriction of Sonic Hedgehog and promoting outgrowth of the vertebrate limb. *Dev Cell* 16, 600-606.
- Maris, C., Dominguez, C., and Allain, F. H. (2005). The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression. *Febs J* 272, 2118-2131.
- Markus, M., Husen, B., and Adamski, J. (1995). The subcellular localization of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 4 and its interaction with actin. *J Steroid Biochem Mol Biol* 55, 617-621.
- Martens, J. H., Verlaan, M., Kalkhoven, E., Dorsman, J. C., and Zantema, A. (2002). Scaffold/matrix attachment region elements interact with a p300-scaffold attachment factor A complex and are bound by acetylated nucleosomes. *Mol Cell Biol* 22, 2598-2606.
- Martin, M. E., Piette, J., Yaniv, M., Tang, W. J., and Folk, W. R. (1988). Activation of the polyomavirus enhancer by a murine activator protein 1 (AP1) homolog and two contiguous proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 5839-5843.
- Massie, C. E., Adryan, B., Barbosa-Morais, N. L., Lynch, A. G., Tran, M. G., Neal, D. E., and Mills, I. G. (2007). New androgen receptor genomic targets show an interaction with the ETS1 transcription factor. *EMBO Rep* 8, 871-878.
- Mathur, M., Tucker, P. W., and Samuels, H. H. (2001). PSF is a novel corepressor that mediates its effect through Sin3A and the DNA binding domain of nuclear hormone receptors. *Mol Cell Biol* 21, 2298-2311.
- Matsui, K., Sugimori, K., Motomura, H., Ejiri, N., Tsukada, K., and Kitajima, I. (2006). PEA3 cooperates with c-Jun in regulation of HER2/neu transcription. *Oncol Rep* 16, 153-158.
- Mavrothalassitis, G., and Ghysdael, J. (2000). Proteins of the ETS family with transcriptional repressor activity. *Oncogene* 19, 6524-6532.
- McKercher, S. R., Torbett, B. E., Anderson, K. L., Henkel, G. W., Vestal, D. J., Baribault, H., Klemsz, M., Feeney, A. J., Wu, G. E., Paige, C. J., and Maki, R. A. (1996). Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *Embo J* 15, 5647-5658.
- Minty, A., Dumont, X., Kaghad, M., and Caput, D. (2000). Covalent modification of p73alpha by SUMO-1. Two-hybrid screening with p73 identifies novel SUMO-1-interacting proteins and a SUMO-1 interaction motif. *Journal of biological chemistry, The* 275, 36316-36323.
- Mitchell, D. C., Stafford, L. J., Li, D., Bar-Eli, M., and Liu, M. (2006). Transcriptional regulation of KiSS-1 gene expression in metastatic melanoma by specificity protein-1 and its coactivator DRIP-130. *Oncogene* 26, 1739-1747.
- Mittler, G., Stuhler, T., Santolin, L., Uhlmann, T., Kremmer, E., Lottspeich, F., Berti, L., and Meisterernst, M. (2003). A novel docking site on Mediator is critical for activation by VP16 in mammalian cells. *Embo J* 22, 6494-6504.
- Mo, X., Kowenz-Leutz, E., Xu, H., and Leutz, A. (2004). Ras induces mediator complex exchange on C/EBP beta. *Mol Cell* 13, 241-250.
- Monge, M., Colas, E., Doll, A., Gil-Moreno, A., Castellvi, J., Diaz, B., Gonzalez, M., Lopez-Lopez, R., Xercavins, J., Carreras, R., *et al.* (2009). Proteomic approach to ETV5 during endometrial carcinoma invasion reveals a link to oxidative stress. *Carcinogenesis* 30, 1288-1297.
- Monge, M., Colas, E., Doll, A., Gonzalez, M., Gil-Moreno, A., Planaguma, J., Quiles, M., Arbos, M. A., Garcia, A., Castellvi, J., *et al.* (2007). ERM/ETV5 Up-regulation Plays a Role during Myometrial Infiltration through Matrix Metalloproteinase-2 Activation in Endometrial Cancer. *Cancer Res* 67, 6753-6759.
- Monte, D., Baert, J. L., Defosse, P. A., de Launoit, Y., and Stehelin, D. (1994). Molecular cloning and characterization of human ERM, a new member of the Ets family closely related to mouse PEA3 and ER81 transcription factors. *Oncogene* 9, 1397-1406.
- Monte, D., Coutte, L., Baert, J. L., Angeli, I., Stehelin, D., and de Launoit, Y. (1995). Molecular characterization of the ets-related human transcription factor ER81. *Oncogene* 11, 771-779.
- Monte, D., Coutte, L., Dewitte, F., Defosse, P. A., Le Coniat, M., Stehelin, D., Berger, R., and de Launoit, Y. (1996). Genomic organization of the human ERM (ETV5) gene, a PEA3 group member of ETS transcription factors. *Genomics* 35, 236-240.
- Morrow, C. M., Tyagi, G., Simon, L., Carnes, K., Murphy, K. M., Cooke, P. S., Hofmann, M. C., and Hess, R. A. (2009). Claudin 5 Expression in Mouse Seminiferous Epithelium Is Dependent upon the Transcription Factor Ets-Variant 5 and Contributes to Blood-Testis Barrier Function. *Biol Reprod.*
- Moss, A. C., Lawlor, G., Murray, D., Tighe, D., Madden, S. F., Mulligan, A. M., Keane, C. O., Brady, H. R., Doran, P. P., and Macmathuna, P. (2006). ETV4 and Myeov knockdown impairs colon cancer cell line proliferation and invasion. *Biochem Biophys Res Commun* 345, 216-221.

Bibliographie

- Mueller, B. U., Pabst, T., Osato, M., Asou, N., Johansen, L. M., Minden, M. D., Behre, G., Hiddemann, W., Ito, Y., and Tenen, D. G. (2002). Heterozygous PU.1 mutations are associated with acute myeloid leukemia. *Blood* *100*, 998-1007.
- Munchberg, S. R., and Steinbeisser, H. (1999). The *Xenopus* Ets transcription factor XER81 is a target of the FGF signaling pathway. *Mech Dev* *80*, 53-65.
- Muratani, M., and Tansey, W. P. (2003). How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol* *4*, 192-201.
- Muthusamy, N., Barton, K., and Leiden, J. M. (1995). Defective activation and survival of T cells lacking the Ets-1 transcription factor. *Nature* *377*, 639-642.
- Myers, E., Hill, A. D., Kelly, G., McDermott, E. W., O'Higgins N, J., and Young, L. S. (2006). A positive role for PEA3 in HER2-mediated breast tumour progression. *Br J Cancer* *95*, 1404-1409.
- Naar, A. M., Beaurang, P. A., Zhou, S., Abraham, S., Solomon, W., and Tjian, R. (1999). Composite co-activator ARC mediates chromatin-directed transcriptional activation. *Nature* *398*, 828-832.
- Naar, A. M., Taatjes, D. J., Zhai, W., Nogales, E., and Tjian, R. (2002). Human CRSP interacts with RNA polymerase II CTD and adopts a specific CTD-bound conformation. *Genes Dev* *16*, 1339-1344.
- Nakae, K., Nakajima, K., Inazawa, J., Kitaoka, T., and Hirano, T. (1995). ERM, a PEA3 subfamily of Ets transcription factors, can cooperate with c-Jun. *J Biol Chem* *270*, 23795-23800.
- Nakazawa, Y., Suzuki, M., Manabe, N., Yamada, T., Kihara-Negishi, F., Sakurai, T., Tenen, D. G., Iwama, A., Mochizuki, M., and Oikawa, T. (2007). Cooperative interaction between ETS1 and GFI1 transcription factors in the repression of Bax gene expression. *Oncogene* *26*, 3541-3550.
- Narod, S. A., Seth, A., and Nam, R. (2008). Fusion in the ETS gene family and prostate cancer. *Br J Cancer* *99*, 847-851.
- Nerlov, C., De Cesare, D., Pergola, F., Caracciolo, A., Blasi, F., Johnsen, M., and Verde, P. (1992). A regulatory element that mediates co-operation between a PEA3-AP-1 element and an AP-1 site is required for phorbol ester induction of urokinase enhancer activity in HepG2 hepatoma cells. *Embo J* *11*, 4573-4582.
- Netzer, S., Leenders, F., Dumont, P., Baert, J. L., and de Launoit, Y. (2002). Ectopic expression of the ets transcription factor ER81 in transgenic mouse mammary gland enhances both urokinase plasminogen activator and stromelysin-1 transcription. *Transgenic Res* *11*, 123-131.
- Nishida, T., Terashima, M., Fukami, K., and Yamada, Y. (2007). PIASy controls ubiquitination-dependent proteasomal degradation of Ets-1. *Biochem J* *405*, 481-488.
- Nomura, T., Tanikawa, J., Akimaru, H., Kanei-Ishii, C., Ichikawa-Iwata, E., Khan, M. M., Ito, H., and Ishii, S. (2004). Oncogenic activation of c-Myb correlates with a loss of negative regulation by TIF1beta and Ski. *J Biol Chem* *279*, 16715-16726.
- Norton, J. D., Deed, R. W., Craggs, G., and Sablitzky, F. (1998). Id helix-loop-helix proteins in cell growth and differentiation. *Trends Cell Biol* *8*, 58-65.
- Nosho, K., Yoshida, M., Yamamoto, H., Taniguchi, H., Adachi, Y., Mikami, M., Hinoda, Y., and Imai, K. (2005). Association of Ets-related transcriptional factor E1AF expression with overexpression of matrix metalloproteinases, COX-2 and iNOS in the early stage of colorectal carcinogenesis. *Carcinogenesis* *26*, 892-899.
- Nunn, M. F., Seeburg, P. H., Moscovici, C., and Duesberg, P. H. (1983). Tripartite structure of the avian erythroblastosis virus E26 transforming gene. *Nature* *306*, 391-395.
- Nye, J. A., Petersen, J. M., Gunther, C. V., Jonsen, M. D., and Graves, B. J. (1992). Interaction of murine ets-1 with GGA-binding sites establishes the ETS domain as a new DNA-binding motif. *Genes Dev* *6*, 975-990.
- O'Hagan, R. C., and Hassell, J. A. (1998). The PEA3 Ets transcription factor is a downstream target of the HER2/Neu receptor tyrosine kinase. *Oncogene* *16*, 301-310.
- O'Hagan, R. C., Tozer, R. G., Symons, M., McCormick, F., and Hassell, J. A. (1996). The activity of the Ets transcription factor PEA3 is regulated by two distinct MAPK cascades. *Oncogene* *13*, 1323-1333.
- Obrdlik, A., Kukalev, A., Louvet, E., Farrants, A. K., Caputo, L., and Percipalle, P. (2008). The histone acetyltransferase PCAF associates with actin and hnRNP U for RNA polymerase II transcription. *Mol Cell Biol* *28*, 6342-6357.
- Oettgen, P., Finger, E., Sun, Z., Akbarali, Y., Thamrongsak, U., Boltax, J., Grall, F., Dube, A., Weiss, A., Brown, L., *et al.* (2000). PDEF, a novel prostate epithelium-specific ets transcription factor, interacts with the androgen receptor and activates prostate-specific antigen gene expression. *J Biol Chem* *275*, 1216-1225.

Bibliographie

- Ohtani, N., Zebedee, Z., Huot, T. J., Stinson, J. A., Sugimoto, M., Ohashi, Y., Sharrocks, A. D., Peters, G., and Hara, E. (2001). Opposing effects of Ets and Id proteins on p16INK4a expression during cellular senescence. *Nature* *409*, 1067-1070.
- Oikawa, T. (2004). ETS transcription factors: Possible targets for cancer therapy. *Cancer Sci* *95*, 626-633.
- Oikawa, T., and Yamada, T. (2003). Molecular biology of the Ets family of transcription factors. *Gene* *303*, 11-34.
- Ouyang, W., Jacobson, N. G., Bhattacharya, D., Gorham, J. D., Fenoglio, D., Sha, W. C., Murphy, T. L., and Murphy, K. M. (1999). The Ets transcription factor ERM is Th1-specific and induced by IL-12 through a Stat4-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 3888-3893.
- Owen, H. R., Elser, M., Cheung, E., Gersbach, M., Kraus, W. L., and Hottiger, M. O. (2007). MYBBP1a is a novel repressor of NF-kappaB. *J Mol Biol* *366*, 725-736.
- Papadaki, C., Alexiou, M., Cecena, G., Verykokakis, M., Bilitou, A., Cross, J. C., Oshima, R. G., and Mavrothalassitis, G. (2007). Transcriptional repressor erf determines extraembryonic ectoderm differentiation. *Mol Cell Biol* *27*, 5201-5213.
- Papoutsopoulou, S., and Janknecht, R. (2000). Phosphorylation of ETS transcription factor ER81 in a complex with its coactivators CREB-binding protein and p300. *Mol Cell Biol* *20*, 7300-7310.
- Paratore, C., Brugnoli, G., Lee, H. Y., Suter, U., and Sommer, L. (2002). The role of the Ets domain transcription factor Erm in modulating differentiation of neural crest stem cells. *Dev Biol* *250*, 168-180.
- Parkinson, D. B., Langner, K., Namini, S. S., Jessen, K. R., and Mirsky, R. (2002). beta-Neuregulin and autocrine mediated survival of Schwann cells requires activity of Ets family transcription factors. *Mol Cell Neurosci* *20*, 154-167.
- Pastorcic, M., and Das, H. K. (2003). Ets transcription factors ER81 and Elk1 regulate the transcription of the human presenilin 1 gene promoter. *Brain Res Mol Brain Res* *113*, 57-66.
- Pastorcic, M., and Das, H. K. (2004). Alternative initiation of transcription of the human presenilin 1 gene in SH-SY5Y and SK-N-SH cells. The role of Ets factors in the regulation of presenilin 1. *Eur J Biochem* *271*, 4485-4494.
- Pastorcic, M., and Das, H. K. (2006). Analysis of transcriptional modulation of the presenilin 1 gene promoter by ZNF237, a candidate binding partner of the Ets transcription factor ERM. *Brain Res* *1128*, 21-32.
- Pastorcic, M., and Das, H. K. (2007). The C-terminal region of CHD3/ZFH interacts with the CID region of the Ets transcription factor ERM and represses transcription of the human presenilin 1 gene. *Febs J* *274*, 1434-1448.
- Paukku, K., Yang, J., and Silvennoinen, O. (2003). Tudor and nuclease-like domains containing protein p100 function as coactivators for signal transducer and activator of transcription 5. *Mol Endocrinol* *17*, 1805-1814.
- Perani, M., Antonson, P., Hamoudi, R., Ingram, C. J., Cooper, C. S., Garrett, M. D., and Goodwin, G. H. (2005). The proto-oncoprotein SYT interacts with SYT-interacting protein/co-activator activator (SIP/CoAA), a human nuclear receptor co-activator with similarity to EWS and TLS/FUS family of proteins. *J Biol Chem* *280*, 42863-42876.
- Perez, A., Barco, R., Fernandez, I., Price-Schiavi, S. A., and Carraway, K. L. (2003). PEA3 transactivates the Muc4/sialomucin complex promoter in mammary epithelial and tumor cells. *J Biol Chem* *278*, 36942-36952. Epub 32003 Jul 36910.
- Planaguma, J., Abal, M., Gil-Moreno, A., Diaz-Fuertes, M., Monge, M., Garcia, A., Baro, T., Xercavins, J., Reventos, J., and Alameda, F. (2005). Up-regulation of ERM/ETV5 correlates with the degree of myometrial infiltration in endometrioid endometrial carcinoma. *J Pathol* *207*, 422-429.
- Potthoff, M. J., and Olson, E. N. (2007). MEF2: a central regulator of diverse developmental programs. *Development* *134*, 4131-4140.
- Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M., and Seraphin, B. (2001). The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* *24*, 218-229.
- Qin, L., Liao, L., Redmond, A., Young, L., Yuan, Y., Chen, H., O'Malley, B. W., and Xu, J. (2008). The AIB1 oncogene promotes breast cancer metastasis by activation of PEA3-mediated matrix metalloproteinase 2 (MMP2) and MMP9 expression. *Mol Cell Biol* *28*, 5937-5950.
- Qin, L., Liu, Z., Chen, H., and Xu, J. (2009). The steroid receptor coactivator-1 regulates twist expression and promotes breast cancer metastasis. *Cancer Res* *69*, 3819-3827.

Bibliographie

- Rachez, C., Lemon, B. D., Suldan, Z., Bromleigh, V., Gamble, M., Naar, A. M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Freedman, L. P. (1999). Ligand-dependent transcription activation by nuclear receptors requires the DRIP complex. *Nature* *398*, 824-828.
- Raible, F., and Brand, M. (2001). Tight transcriptional control of the ETS domain factors *Erm* and *Pea3* by Fgf signaling during early zebrafish development. *Mech Dev* *107*, 105-117.
- Ristevski, S., O'Leary, D. A., Thornell, A. P., Owen, M. J., Kola, I., and Hertzog, P. J. (2004). The ETS transcription factor GABPalpha is essential for early embryogenesis. *Mol Cell Biol* *24*, 5844-5849.
- Roehl, H., and Nusslein-Volhard, C. (2001). Zebrafish *pea3* and *erm* are general targets of FGF8 signaling. *Curr Biol* *11*, 503-507.
- Rohila, J. S., Chen, M., Chen, S., Chen, J., Cerny, R. L., Dardick, C., Canlas, P., Fujii, H., Gribskov, M., Kanrar, S., *et al.* (2009). Protein-protein interactions of tandem affinity purified protein kinases from rice. *PLoS One* *4*, e6685.
- Roussigne, M., and Blader, P. (2006). Divergence in regulation of the PEA3 family of ETS transcription factors. *Gene Expr Patterns* *6*, 777-782.
- Ryu, S., Zhou, S., Ladurner, A. G., and Tjian, R. (1999). The transcriptional cofactor complex CRSP is required for activity of the enhancer-binding protein Sp1. *Nature* *397*, 446-450.
- Sato, S., Tomomori-Sato, C., Parmely, T. J., Florens, L., Zybilov, B., Swanson, S. K., Banks, C. A., Jin, J., Cai, Y., Washburn, M. P., *et al.* (2004). A set of consensus mammalian mediator subunits identified by multidimensional protein identification technology. *Mol Cell* *14*, 685-691.
- Schlesser, H. N., Simon, L., Hofmann, M. C., Murphy, K. M., Murphy, T., Hess, R. A., and Cooke, P. S. (2008). Effects of ETV5 (ets variant gene 5) on testis and body growth, time course of spermatogonial stem cell loss, and fertility in mice. *Biol Reprod* *78*, 483-489.
- Schneikert, J., Peterziel, H., Defosse, P. A., Klocker, H., Launoit, Y., and Cato, A. C. (1996). Androgen receptor-Ets protein interaction is a novel mechanism for steroid hormone-mediated down-modulation of matrix metalloproteinase expression. *J Biol Chem* *271*, 23907-23913.
- Schultz, D. C., Friedman, J. R., and Rauscher, F. J., 3rd (2001). Targeting histone deacetylase complexes via KRAB-zinc finger proteins: the PHD and bromodomains of KAP-1 form a cooperative unit that recruits a novel isoform of the Mi-2alpha subunit of NuRD. *Genes Dev* *15*, 428-443.
- Scott, E. W., Fisher, R. C., Olson, M. C., Kehrl, E. W., Simon, M. C., and Singh, H. (1997). PU.1 functions in a cell-autonomous manner to control the differentiation of multipotential lymphoid-myeloid progenitors. *Immunity* *6*, 437-447.
- Scott, E. W., Simon, M. C., Anastasi, J., and Singh, H. (1994). Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science* *265*, 1573-1577.
- Sedy, J., Tseng, S., Walro, J. M., Grim, M., and Kucera, J. (2006). ETS transcription factor ER81 is required for the Pacinian corpuscle development. *Dev Dyn* *235*, 1081-1089.
- Seth, A., and Watson, D. K. (2005). ETS transcription factors and their emerging roles in human cancer. *Eur J Cancer* *41*, 2462-2478.
- Sharma, D., and Fondell, J. D. (2002). Ordered recruitment of histone acetyltransferases and the TRAP/Mediator complex to thyroid hormone-responsive promoters in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 7934-7939.
- Sharrocks, A. D., Brown, A. L., Ling, Y., and Yates, P. R. (1997). The ETS-domain transcription factor family. *Int J Biochem Cell Biol* *29*, 1371-1387.
- Shav-Tal, Y., and Zipori, D. (2002). PSF and p54(nrb)/NonO--multi-functional nuclear proteins. *FEBS Lett* *531*, 109-114.
- Shepherd, T. G., Kockeritz, L., Szrajber, M. R., Muller, W. J., and Hassell, J. A. (2001). The *pea3* subfamily ets genes are required for HER2/Neu-mediated mammary oncogenesis. *Curr Biol* *11*, 1739-1748.
- Shimogawa, H., Kwon, Y., Mao, Q., Kawazoe, Y., Choi, Y., Asada, S., Kigoshi, H., and Uesugi, M. (2004). A wrench-shaped synthetic molecule that modulates a transcription factor-coactivator interaction. *J Am Chem Soc* *126*, 3461-3471.
- Shin, S., Bosc, D. G., Ingle, J. N., Spelsberg, T. C., and Janknecht, R. (2008). Rcl is a novel ETV1/ER81 target gene upregulated in breast tumors. *J Cell Biochem* *105*, 866-874.
- Shitashige, M., Hirohashi, S., and Yamada, T. (2008). Wnt signaling inside the nucleus. *Cancer Sci* *99*, 631-637.
- Shou, Z., Yamada, K., Inazu, T., Kawata, H., Hirano, S., Mizutani, T., Yazawa, T., Sekiguchi, T., Yoshino, M., Kajitani, T., *et al.* (2003). Genomic structure and analysis of transcriptional regulation of the mouse zinc-fingers and homeoboxes 1 (ZHX1) gene. *Gene* *302*, 83-94.

Bibliographie

- Sieweke, M. H., Tekotte, H., Jarosch, U., and Graf, T. (1998). Cooperative interaction of ets-1 with USF-1 required for HIV-1 enhancer activity in T cells. *Embo J* 17, 1728-1739.
- Simon, L., Ekman, G. C., Tyagi, G., Hess, R. A., Murphy, K. M., and Cooke, P. S. (2007). Common and distinct factors regulate expression of mRNA for ETV5 and GDNF, Sertoli cell proteins essential for spermatogonial stem cell maintenance. *Exp Cell Res* 313, 3090-3099.
- Singh, N., and Han, M. (1995). sur-2, a novel gene, functions late in the let-60 ras-mediated signaling pathway during *Caenorhabditis elegans* vulval induction. *Genes Dev* 9, 2251-2265.
- Sjoblom, T., Boureux, A., Ronnstrand, L., Heldin, C. H., Ghysdael, J., and Ostman, A. (1999). Characterization of the chronic myelomonocytic leukemia associated TEL-PDGFR fusion protein. *Oncogene* 18, 7055-7062.
- Slupsky, C. M., Gentile, L. N., and McIntosh, L. P. (1998). Assigning the NMR spectra of aromatic amino acids in proteins: analysis of two Ets pointed domains. *Biochem Cell Biol* 76, 379-390.
- Solheim, S. A., Torgersen, K. M., Tasken, K., and Berge, T. (2008). Regulation of FynT function by dual domain docking on PAG/Cbp. *J Biol Chem* 283, 2773-2783.
- Spraggon, L., Dudnakova, T., Slight, J., Lustig-Yariv, O., Cotterell, J., Hastie, N., and Miles, C. (2007). hnRNP-U directly interacts with WT1 and modulates WT1 transcriptional activation. *Oncogene* 26, 1484-1491.
- Spyropoulos, D. D., Pharr, P. N., Lavenburg, K. R., Jackers, P., Papas, T. S., Ogawa, M., and Watson, D. K. (2000). Hemorrhage, impaired hematopoiesis, and lethality in mouse embryos carrying a targeted disruption of the Fli1 transcription factor. *Mol Cell Biol* 20, 5643-5652.
- St Maurice, M., Reinhardt, L., Surinya, K. H., Attwood, P. V., Wallace, J. C., Cleland, W. W., and Rayment, I. (2007). Domain architecture of pyruvate carboxylase, a biotin-dependent multifunctional enzyme. *Science* 317, 1076-1079.
- Stevens, J. L., Cantin, G. T., Wang, G., Shevchenko, A., Shevchenko, A., and Berk, A. J. (2002). Transcription control by E1A and MAP kinase pathway via Sur2 mediator subunit. *Science* 296, 755-758.
- Stinson, J., Inoue, T., Yates, P., Clancy, A., Norton, J. D., and Sharrocks, A. D. (2003). Regulation of TCF ETS-domain transcription factors by helix-loop-helix motifs. *Nucleic Acids Res* 31, 4717-4728.
- Su, G. H., Chen, H. M., Muthusamy, N., Garrett-Sinha, L. A., Baunoch, D., Tenen, D. G., and Simon, M. C. (1997). Defective B cell receptor-mediated responses in mice lacking the Ets protein, Spi-B. *Embo J* 16, 7118-7129.
- Sui, Y., Yang, Z., Xiong, S., Zhang, L., Blanchard, K. L., Peiper, S. C., Dynan, W. S., Tuan, D., and Ko, L. (2007). Gene amplification and associated loss of 5' regulatory sequences of CoAA in human cancers. *Oncogene* 26, 822-835.
- Suzuki, M., Yamada, T., Kihara-Negishi, F., Sakurai, T., and Oikawa, T. (2003). Direct association between PU.1 and MeCP2 that recruits mSin3A-HDAC complex for PU.1-mediated transcriptional repression. *Oncogene* 22, 8688-8698.
- T'Sas, F., Brenner, C., Mauén, S., Putmans, P., Monte, D., Van Lint, C., Moser, M., Baert, J. L., and de Launoit, Y. (2005). Expression of the Ets transcription factor Erm is regulated through a conventional PKC signaling pathway in the Molt4 lymphoblastic cell line. *FEBS Lett* 579, 66-70.
- Taatjes, D. J., Naar, A. M., Andel, F., 3rd, Nogales, E., and Tjian, R. (2002). Structure, function, and activator-induced conformations of the CRSP coactivator. *Science* 295, 1058-1062.
- Takahashi, A., Higashino, F., Aoyagi, M., Yoshida, K., Itoh, M., Kobayashi, M., Totsuka, Y., Kohgo, T., and Shindoh, M. (2005). E1AF degradation by a ubiquitin-proteasome pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 327, 575-580.
- Takahashi, A., Higashino, F., Aoyagi, M., Yoshida, K., Itoh, M., Kyo, S., Ohno, T., Taira, T., Ariga, H., Nakajima, K., *et al.* (2003). EWS/ETS fusions activate telomerase in Ewing's tumors. *Cancer Res* 63, 8338-8344.
- Taylor, J. M., Dupont-Versteegden, E. E., Davies, J. D., Hassell, J. A., Houle, J. D., Gurley, C. M., and Peterson, C. A. (1997). A role for the ETS domain transcription factor PEA3 in myogenic differentiation. *Mol Cell Biol* 17, 5550-5558.
- Tomlins, S. A., Laxman, B., Dhanasekaran, S. M., Helgeson, B. E., Cao, X., Morris, D. S., Menon, A., Jing, X., Cao, Q., Han, B., *et al.* (2007). Distinct classes of chromosomal rearrangements create oncogenic ETS gene fusions in prostate cancer. *Nature* 448, 595-599.
- Tomlins, S. A., Mehra, R., Rhodes, D. R., Smith, L. R., Roulston, D., Helgeson, B. E., Cao, X., Wei, J. T., Rubin, M. A., Shah, R. B., and Chinnaiyan, A. M. (2006). TMPRSS2:ETV4 gene fusions define a third molecular subtype of prostate cancer. *Cancer Res* 66, 3396-3400.

Bibliographie

- Tomlins, S. A., Rhodes, D. R., Perner, S., Dhanasekaran, S. M., Mehra, R., Sun, X. W., Varambally, S., Cao, X., Tchinda, J., Kuefer, R., *et al.* (2005). Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science* *310*, 644-648.
- Trimble, M. S., Xin, J. H., Guy, C. T., Muller, W. J., and Hassell, J. A. (1993). PEA3 is overexpressed in mouse metastatic mammary adenocarcinomas. *Oncogene* *8*, 3037-3042.
- Tsuruma, R., Ohbayashi, N., Kamitani, S., Ikeda, O., Sato, N., Muromoto, R., Sekine, Y., Oritani, K., and Matsuda, T. (2008). Physical and functional interactions between STAT3 and KAP1. *Oncogene* *27*, 3054-3059.
- Uhlmann, T., Boeing, S., Lehmbacher, M., and Meisterernst, M. (2007). The VP16 activation domain establishes an active mediator lacking CDK8 in vivo. *J Biol Chem* *282*, 2163-2173.
- Upadhyay, S., Liu, C., Chatterjee, A., Hoque, M. O., Kim, M. S., Engles, J., Westra, W., Trink, B., Ratovitski, E., and Sidransky, D. (2006). LKB1/STK11 Suppresses Cyclooxygenase-2 Induction and Cellular Invasion through PEA3 in Lung Cancer. *Cancer Res* *66*, 7870-7879.
- Valdez, B. C., Perlaky, L., and Henning, D. (2002). Expression, cellular localization, and enzymatic activities of RNA helicase II/Gu(beta). *Exp Cell Res* *276*, 249-263.
- Van Dissel-Emiliani, F. M., De Boer-Brouwer, M., and De Rooij, D. G. (1996). Effect of fibroblast growth factor-2 on Sertoli cells and gonocytes in coculture during the perinatal period. *Endocrinology* *137*, 647-654.
- Verger, A., Perdomo, J., and Crossley, M. (2003). Modification with SUMO. A role in transcriptional regulation. *EMBO Rep* *4*, 137-142.
- Wang, G., Balamotis, M. A., Stevens, J. L., Yamaguchi, Y., Handa, H., and Berk, A. J. (2005). Mediator requirement for both recruitment and postrecruitment steps in transcription initiation. *Mol Cell* *17*, 683-694.
- Wang, L. C., Kuo, F., Fujiwara, Y., Gilliland, D. G., Golub, T. R., and Orkin, S. H. (1997). Yolk sac angiogenic defect and intra-embryonic apoptosis in mice lacking the Ets-related factor TEL. *Embo J* *16*, 4374-4383.
- Wang, W., Huang, L., Huang, Y., Yin, J. W., Berk, A. J., Friedman, J. M., and Wang, G. (2009). Mediator MED23 links insulin signaling to the adipogenesis transcription cascade. *Dev Cell* *16*, 764-771.
- Wasylyk, B., Wasylyk, C., Flores, P., Begue, A., Leprince, D., and Stehelin, D. (1990). The c-ets proto-oncogenes encode transcription factors that cooperate with c-Fos and c-Jun for transcriptional activation. *Nature* *346*, 191-193.
- Watson, D. K., McWilliams, M. J., Lapis, P., Lautenberger, J. A., Schweinfest, C. W., and Papas, T. S. (1988). Mammalian ets-1 and ets-2 genes encode highly conserved proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* *85*, 7862-7866.
- Watson, D. K., McWilliams, M. J., and Papas, T. S. (1987). Molecular structure of the avian and mammalian ets genes. *Prog Clin Biol Res* *246*, 115-130.
- Westermarck, J., Weiss, C., Saffrich, R., Kast, J., Musti, A. M., Wessely, M., Ansorge, W., Seraphin, B., Wilm, M., Valdez, B. C., and Bohmann, D. (2002). The DEXD/H-box RNA helicase RHII/Gu is a co-factor for c-Jun-activated transcription. *Embo J* *21*, 451-460.
- Wisdom, R., Johnson, R. S., and Moore, C. (1999). c-Jun regulates cell cycle progression and apoptosis by distinct mechanisms. *Embo J* *18*, 188-197.
- Wu, J., and Janknecht, R. (2002). Regulation of the ETS transcription factor ER81 by the 90-kDa ribosomal S6 kinase 1 and protein kinase A. *J Biol Chem* *277*, 42669-42679. Epub 42002 Sep 42663.
- Xin, J. H., Cowie, A., Lachance, P., and Hassell, J. A. (1992). Molecular cloning and characterization of PEA3, a new member of the Ets oncogene family that is differentially expressed in mouse embryonic cells. *Genes Dev* *6*, 481-496.
- Xing, X., Wang, S. C., Xia, W., Zou, Y., Shao, R., Kwong, K. Y., Yu, Z., Zhang, S., Miller, S., Huang, L., and Hung, M. C. (2000). The ets protein PEA3 suppresses HER-2/neu overexpression and inhibits tumorigenesis. *Nat Med* *6*, 189-195.
- Yamamoto, H., Flannery, M. L., Kupriyanov, S., Pearce, J., McKercher, S. R., Henkel, G. W., Maki, R. A., Werb, Z., and Oshima, R. G. (1998). Defective trophoblast function in mice with a targeted mutation of Ets2. *Genes Dev* *12*, 1315-1326.
- Yamamoto, S., Eletsy, A., Szyperski, T., Hay, J., and Ruyechan, W. T. (2009). Analysis of the varicella-zoster virus IE62 N-terminal acidic transactivating domain and its interaction with the human mediator complex. *J Virol* *83*, 6300-6305.
- Yang, F., DeBeaumont, R., Zhou, S., and Naar, A. M. (2004). The activator-recruited cofactor/Mediator coactivator subunit ARC92 is a functionally important target of the VP16 transcriptional activator. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 2339-2344.

Bibliographie

- Yang, L., Fox, S. A., Kirby, J. L., Troan, B. V., and Hinton, B. T. (2006). Putative regulation of expression of members of the Ets variant 4 transcription factor family and their downstream targets in the rat epididymis. *Biol Reprod* **74**, 714-720.
- Yang, M., Hay, J., and Ruyechan, W. T. (2008). The Varicella Zoster Virus IE62 Protein Utilizes the Human Mediator Complex in Promoter Activation. *J Virol*.
- Yang, X. J., Ogryzko, V. V., Nishikawa, J., Howard, B. H., and Nakatani, Y. (1996). A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature* **382**, 319-324.
- Yang, Z., Sui, Y., Xiong, S., Liour, S. S., Phillips, A. C., and Ko, L. (2007). Switched alternative splicing of oncogene CoAA during embryonal carcinoma stem cell differentiation. *Nucleic Acids Res* **35**, 1919-1932.
- Yates, P. R., Atherton, G. T., Deed, R. W., Norton, J. D., and Sharrocks, A. D. (1999). Id helix-loop-helix proteins inhibit nucleoprotein complex formation by the TCF ETS-domain transcription factors. *Embo J* **18**, 968-976.
- Yoneshima, H., Yamasaki, S., Voelker, C. C., Molnar, Z., Christophe, E., Audinat, E., Takemoto, M., Nishiwaki, M., Tsuji, S., Fujita, I., and Yamamoto, N. (2006). Er81 is expressed in a subpopulation of layer 5 neurons in rodent and primate neocortices. *Neuroscience* **137**, 401-412.
- Yoon, K. A., Chae, Y. M., and Cho, J. Y. (2009). FGF2 stimulates SDF-1 expression through the Erm transcription factor in Sertoli cells. *J Cell Physiol* **220**, 245-256.
- Zhang, Z., and Carmichael, G. G. (2001). The fate of dsRNA in the nucleus: a p54(nrb)-containing complex mediates the nuclear retention of promiscuously A-to-I edited RNAs. *Cell* **106**, 465-475.
- Zhang, Z., Verheyden, J. M., Hassell, J. A., and Sun, X. (2009). FGF-regulated Etv genes are essential for repressing Shh expression in mouse limb buds. *Dev Cell* **16**, 607-613.
- Zhou, J., Chehab, R., Tkalcevic, J., Naylor, M. J., Harris, J., Wilson, T. J., Tsao, S., Tellis, I., Zavarsek, S., Xu, D., *et al.* (2005). Elf5 is essential for early embryogenesis and mammary gland development during pregnancy and lactation. *Embo J* **24**, 635-644.
- Zhu, X., Jiang, J., Shen, H., Wang, H., Zong, H., Li, Z., Yang, Y., Niu, Z., Liu, W., Chen, X., *et al.* (2005). Elevated beta1,4-galactosyltransferase I in highly metastatic human lung cancer cells. Identification of E1AF as important transcription activator. *J Biol Chem* **280**, 12503-12516.

Annexes

Annexes

Les articles suivants sont présentés en annexe :

Revues

1. de Launoit Y, Baert JL, Chotteau-Lelievre A, Monte D, Coutte L, Mauen S, Firlej V, Degerny C, Verreman K. The Ets transcription factors of the PEA3 group: transcriptional regulators in metastasis. *Biochim Biophys Acta*. 2006 Aug;1766(1):79-87. Review.
2. de Launoit Y, Baert JL, Chotteau-Lelievre A, Monte D, Coutte L, Mauen S, Firlej V, Degerny C, Verreman K. [PEA3 family of transcription factors and the regulation of oncogenesis]. *Bull Cancer*. 2006 Oct 1;93(10):985-9. Review. French.

Article en collaboration

3. Baert JL, Monte D, Verreman K, Degerny C, Coutte L, de Launoit Y. The E3 Ubiquitin Ligase Complex Component COP1 regulates PEA3 Group Member Stability and Transcriptional Activity. *Oncogene (en revision)*

Review

The Ets transcription factors of the PEA3 group: Transcriptional regulators in metastasis

Yvan de Launoit ^{a,b,*}, Jean-Luc Baert ^a, Anne Chotteau-Lelievre ^a, Didier Monte ^a,
Laurent Coutte ^{a,c}, Sébastien Mauen ^b, Virginie Firlej ^a, Cindy Degerny ^a, Kathye Verreman ^a

^a UMR 8161, Institut de Biologie de Lille, CNRS/Université de Lille I/Université de Lille II/Institut Pasteur de Lille, BP 447, 1 rue Calmette, 59021 Lille Cedex, France

^b Laboratoire de Virologie Moléculaire, Faculté de Médecine, Université Libre de Bruxelles, CP 614, 808 route de Lennik, 1070 Brussels, Belgium

^c Laboratoire de Biologie Animale Bâtiment 470, Faculté des Sciences d'Orsay, Université de Paris Sud, 91405 Orsay, France

Received 12 January 2006; received in revised form 7 February 2006; accepted 7 February 2006

Available online 3 March 2006

Abstract

The PEA3 group is composed of three highly conserved Ets transcription factors: Erm, Er81, and Pea3. These proteins regulate transcription of multiple genes, and their transactivating potential is affected by post-translational modifications. Among their target genes are several matrix metalloproteases (MMPs), which are enzymes degrading the extracellular matrix during normal remodelling events and cancer metastasis. In fact, PEA3-group genes are often over-expressed in different types of cancers that also over-express these MMPs and display a disseminating phenotype. Experimental regulation of the synthesis of PEA3 group members influences the metastatic process. This suggests that these factors play a key role in metastasis.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Metastasis; Transcription factor; Ets; PEA3 group; MMP

Contents

1. Introduction	80
2. The PEA3 group	80
3. PEA3-dependent transcriptional activity is regulated by post-translational modifications	80
4. Role in normal embryonic and adult tissues	80
5. Role in the metastatic process	81
5.1. In the oral tract	81
5.2. In the lungs	82
5.3. In the gastrointestinal tract	82
5.4. In gynaecological tissues	82
6. The PEA3 group members and chromosomal rearrangement in cancer	83
Acknowledgements	84
References	84

* Corresponding author. UMR 8161, Institut de Biologie de Lille, CNRS/Université de Lille I/Université de Lille II/Institut Pasteur de Lille, BP 447, 1 rue Calmette, 59021 Lille Cedex, France. Tel.: +33 3 20 87 11 17; fax: +33 3 20 87 11 11.

E-mail address: yvan.delanoit@ibl.fr (Y. de Launoit).

1. Introduction

The *ets* genes encode a family of transcription factors of about 30 members. In most cases these are transcriptional activators, and in some rare cases, transcriptional repressors [1]. These transcription factors share a conserved 85-amino-acid motif, the ETS-domain, which is the signature of the family [1]. This domain enables the transcription factors to bind to a 9-nucleotide DNA sequence with the central consensus core 5'-GGAA/T-3': the "ETS Binding Site" (EBS) [2]. The sequences flanking this central motif determine the binding specificity for each Ets family member [3,4]. Phylogenetically, the members of this transcription factor family are classified in groups according to the sequence of the ETS-domain, the position of this domain in the protein, and the presence of other specific conserved functional domains. The 13 groups identified are: ETS, TEL, YAN, SPI, ERG, PEA3, ELF, DETS4, ELK, GABP, ER71, ERF, and ESE [5].

2. The PEA3 group

The PEA3 group is composed of three members: Erm (also called Etv5) [6–8], Er81 (also called Etv1) [9–11], and Pea3 (also called E1Af or Etv4) [12–14], which share the highly conserved ETS-domain and two conserved transactivating domains, one located at the amino-terminus (AD) and the other at the carboxy-terminus (Ct) [15]. The human and mouse *er81*, *erm*, and *pea3* genes are structured in 13–14 exons distributed over more than 15 kbp of genomic DNA [16–18]. In the human genome, *erm* is located on chromosome 3 at position 3q27–29 [7,17], *e1af* on chromosome 17 at position 17q21 [19], and *er81* on chromosome 7 at position 7q21 [10].

In most of the cases, the PEA3 group members are described as transcriptional activators [11,12,20] with two transcriptional domains (AD and Ct), which are able to synergize. Negative regulatory domains encompass the transactivating domains in Pea3 and Erm [20,21]. Recent data on Erm and Pea3 suggest that the Ct domain also plays a role in the stability of the protein [22,23].

As for the other Ets transcription factors, it is unlikely that these transcription factors alone regulate transcription of their target genes. They in fact interact with transcriptional partners. Thus, Erm associates with the basal transcription complex proteins TAF_{II}60, TBP and TAF_{II}40 [24]. Erm also interacts with the androgen receptor, which leads to the repression of Ets-mediated transactivation [25]. One of the AP1 complex proteins, c-Jun, also interacts physically with the Ct domain of Erm to synergistically enhance transcriptional activation [7]. Furthermore, Er81 [26], Pea3 [27] and Erm (unpublished) interact with the p300 transcriptional co-activator, an enzyme with histone acetyltransferase activity (HAT). Er81 also interacts with the p300 associated partner P/CAF [26]. More recently, the SUMO conjugating enzyme Ubc9 was also shown to interact with Er81 [28] and Erm [29]. Interestingly, Pea3 has recently been shown to interact with the USF-1 transcription factor to synergistically

regulate expression of the *bax* gene without directly binding to DNA [30].

3. PEA3-dependent transcriptional activity is regulated by post-translational modifications

Like many transcription factors, the PEA3 group members undergo post-translational modification that regulates their transactivation capacity. The most common modification found in the PEA3 group proteins is phosphorylation, as they are targets of the MAPK pathway including Ras, Raf-1, MEK, ERK-1, and ERK-2. Phosphorylation of specific serine and threonine residues generally increases the transactivation capacity of the PEA3 group member [31–34]. Moreover, Erm and Er81 are also phosphorylated through the PKA-mediated pathway [16,31,35,36].

Post-translational modifications at lysines also play crucial roles in the regulation of transcription, generally on histone proteins but also on transcription factors. For instance, activation of p300 through the Ras/MAPK pathway results in Er81 acetylation and this causes the transcriptional activity of this factor to increase [26]. Recently, Er81 and Erm have been shown to undergo another lysine modification; i.e. SUMO modification via the Ubc9 SUMO conjugating enzyme [28]; this modification leads to inhibition of Erm-dependent transactivation [29]. Erm and Pea3 are also conjugated to ubiquitin and degraded via the ubiquitin–proteasome pathway, which probably regulates the activity of these transcription factors [22,23] (see Fig. 1).

4. Role in normal embryonic and adult tissues

These transcription factors are expressed in multiple developing mouse organs derived from all three germ layers, such as lung, salivary glands, kidney, gut... Yet, when co-expressed in the same organ, they are generally present in different tissues. The general expression pattern for these three genes during branching morphogenesis is as follows: *erm* is expressed in the distal portion of epithelial buds, *pea3* in a more restricted region of the growing epithelium, and *er81* in the adjacent mesenchyme 1 [8,37]. This pattern is not restricted to branching morphogenesis but is also found during conversion of mesenchyme to epithelium (e.g., in developing kidneys) and during the development of the nervous system. In fact, motor and sensory neurons innervating the same muscle express the same PEA3 group member, indicating the requirement of a certain expression pattern for functional circuit formation [38,39].

In adult mouse tissues *erm*, and to a lesser extent *er81*, are almost ubiquitously expressed. High-level *erm* expression is observed in brain, colon, testis, and lung, while *er81* is expressed to a high level in brain, lung and heart [6,8]. As for mouse *pea3* mRNA, it shows a more restricted distribution than the two other members, being found mainly in the brain [8] and epididymis [12]. These expression profiles have been confirmed in human tissues [6,11]. In the male mouse, Erm is required for spermatogonial stem cell self-renewal [40] and Pea3 for ejaculation [41]. Altogether, these data suggest that expression

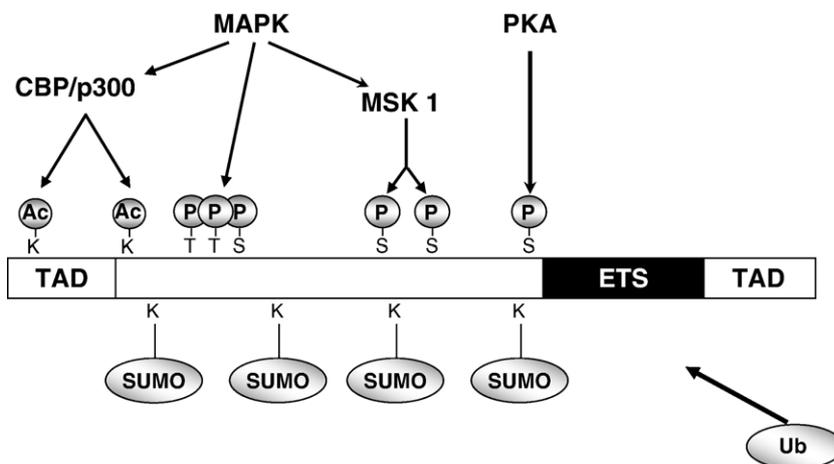


Fig. 1. Schematic representation of a “generic” PEA3 group prototype with its different functional domains and regulating pathways. The ETS-domain is responsible for DNA-binding. The two TAD regions are the transcriptional activation domains. Post-translational modifications up-regulating (above the protein) or down-regulating (below the protein) the transcriptional activity of the PEA3 group members on their target gene are also shown. Ac: acetyl group; P: phosphate group; SUMO: sumo peptide; Ub: ubiquitin. Except when indicated below, all the modification sites are conserved among the three PEA3 group members. So far, ubiquitination site(s) has (have) not been established, but Pea3 [22] and Erm [23] are ubiquitinated. Mapping of CBP/p300-dependent acetylation sites has been performed only for Er81 [26]. However, activation by these co-activators has been shown for Pea3 [27] and Erm (J.L. Baert, unpublished data). Note that the second acetylation site is not conserved in PEA3. Mapping of SUMO sites has been performed for only Erm [29]. However, SUMO modification has also been shown for Er81 [28]. The unique PKA-dependent phosphorylation site has been mapped to the edge of the ETS-domain of mammalian Erm and Er81 but it is absent from mammalian Pea3 [36,104]. The three mammalian PEA3 members are phosphorylated and activated by MAPK [31–33], but precise mapping of MAPK-dependent phosphorylation sites has been performed only for Er81 at position S₉₄, T₁₃₉, T₁₄₃ and S₁₄₆. Transcriptional activation of Er81 is enhanced also by a MAPK-stimulated protein kinase, MSK1 [104].

of the PEA3 group members is involved in multiple biological events.

5. Role in the metastatic process

As described above, the PEA3 group factors are expressed during remodelling events, cell differentiation and proliferation. It is thus of interest to know which genes they target. Many papers report their involvement in the transcriptional regulation of matrix metalloprotease enzymes (MMP). These latter are involved in degrading the extracellular matrix to permit tissue rearrangement, a common phenomenon in cancer metastasis. In reporter assay experiments, the PEA3 group members enhance transcription from different MMP promoters, such as the human stromelysin-1, the type I and IV collagenases [42] and matrilysin [43] promoters. In vivo, ectopic expression of Er81 in the normal mouse mammary gland induces up-regulation of the urokinase plasminogen activator gene [44]. They can also

positively regulate the promoters of the genes coding for vimentin [45], the intercellular adhesion molecule ICAM-1 [46], osteopontin [47] and cyclooxygenase-2 [48] genes. This ability to enhance such promoters suggests that they could play a role in tumorigenesis. In fact, PEA3-overexpressing cell lines display a high metastasis potential correlated with high expression of several MMPs [49–52], whereas *pea3* knock-down reduces MMP-1 and MMP-9 expression [53]. Below, we summarize current knowledge of the roles of the PEA3 group members in cancers of different origins (see Fig. 2). Table 1 summarizes the clinical or experimental studies (described below) demonstrating the correlation between PEA3 group member expression and metastasis.

5.1. In the oral tract

Pea3 is highly expressed in squamous carcinoma cell lines which are of highly invasive and express high levels of type I

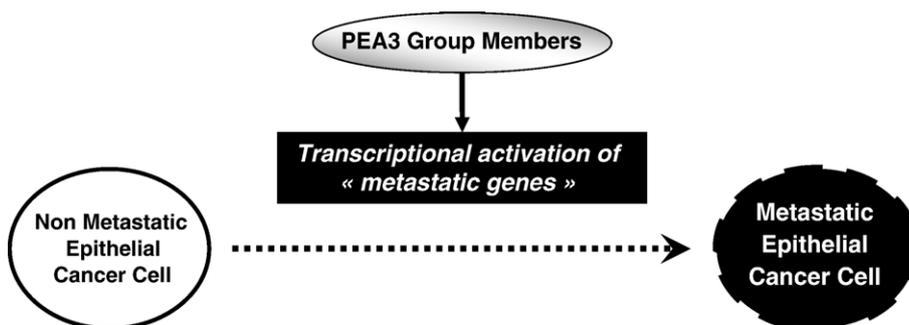


Fig. 2. Model for the roles of the PEA3 group members in turning on the metastatic phenotype of epithelial cancer cells.

Table 1
Correlation of PEA3 group member expression and metastasis or bad prognosis in human cancers

Tissue	PEA3 members	References	
		Cell lines	Clinical studies
Oral tract	Pea3	[51,53,54]	[49,51,55]
Lung (NSCLC)	Pea3	[56,60]	[56,60]
Stomach	Pea3	[61,62]	[61] ^a
Liver	Pea3		[63]
Colon	Pea3	[27,66]	[43,66–68]
Ovary	Pea3		[70,71]
Breast	Pea3/Ern	[50,86]	[71,79,80,90]
Endometrium	Ern		[91]

^a The expression of ER81 or ERM was not correlated with survival or the expression of MMPs analyzed in this clinical study (100 gastric cancers).

and IV collagenases (respectively MMP-1 and MMP-9) [49]. Moreover, cells transfected with *pea3* antisense exhibit decreased expression of these two MMPs [53]. This experiment is crucial as it demonstrates for the first time that down-regulation of endogenous *pea3* expression causes transcriptional regulation of a target gene. In these cells, Pea3-induced MMP expression is also stimulated by the hepatocyte growth factor (HGF) [54]. In in vivo tumors, *pea3* mRNA is detected by in situ hybridisation in the majority of the invasive squamous cell carcinoma specimens studied, and increased expression of *pea3* correlates with nodal metastasis [51]. It has also been recently demonstrated in these cells that exogenous Pea3 is able to up-regulate expression of *MT1-MMP*, a trans-membrane MMP that activates the proMMP-2, and thus indirectly activates MMP-2 [55]. For this experiment, and in general for each result presented in this review in which a specific PEA3 group member is exogenously over-expressed, we can hypothesise that the identified target genes are not only PEA3 target genes, but more general Ets target genes, since all 27 mammalian Ets family members possess a conserved ETS-domain.

5.2. In the lungs

In contrast to *pea3*, both *erm* and *er81* are highly expressed in the normal adult lung [6,8,11]. Interestingly, Pea3 is currently the only member of the PEA3 group to have been implicated in the lung cancer process. In non-small-cell lung cancers (NSCLC) which are characterized by cell invasiveness, *pea3* mRNA is found in the primary tumors and not in the surrounding normal tissues. Ectopic expression of *pea3* in NSCLC cells significantly increases in vitro cell motility and invasion [56].

Previous papers described the involvement of β 1,4-galactosyltransferase I (GalT I) in cellular processes such as cell migration [57]. Although little is known on the role of GalT I in metastasis, several studies have shown that its increased expression at the cell surface is specific to highly metastatic cell lines [58,59]. Recently, expression of *pea3* and *GalT I* has been found to correlate with a highly metastatic phenotype in lung cancer cells [60].

5.3. In the gastrointestinal tract

The PEA3 group members are also expressed. In the case of gastric cancer, the level of *pea3* mRNA correlates significantly with tumor invasiveness and recurrence, indicating a bad prognosis for patient survival [61]. In this study, moreover, a correlation was found in cancer tissues between *matrilysin* (MMP-7), a marker of invasiveness in gastric cancer [62], and the level of *pea3* mRNA. *MMP-7* and *pea3* co-localize at the “invasive front” and, when endogenous *pea3* expression is knocked-down, *MMP-7* expression is dramatically decreased, and cells are less invasive in vitro. In contrast, the expression of *er81* or *erm* was not correlated with survival or the expression of MMPs, thus suggesting that Pea3 is the specific PEA3 group member that activates the target *matrilysin* gene in gastric cancer.

In human hepatocellular carcinoma (HCC), the *interleukin IL-8*, which is a potent angiogenic factor, is constitutively induced by Pea3 in association with the transcription factor AP-1. Moreover, *pea3* and *IL-8* are both expressed in HCC, and not in the surrounding tissues, thus indicating a potential role of Pea3 in *IL-8*-induced hepatoma tumorigenesis [63].

Promoters of several *MMP* genes involved in human colorectal adenocarcinomas possess specific DNA binding sites for the PEA3 group members. This is the case of the genes coding for *meprin beta* [64] and *matrilysin* (for a review, see [65]); in the latter case, Pea3 co-operates with AP1. The β -*catenin* gene is also regulated by the PEA3 group members in mouse colon tumor cells, since both *pea3* and *erm* are co-expressed in these cells and they both, in synergy with β -*catenin*, up-regulate the *MMP-7* promoter, thus finally contributing to tumorigenesis [43]. In colorectal tumors, *pea3* expression also correlates significantly with invasion, metastasis and advanced tumor stages, and is co-expressed with the β -*catenin*, *MMP-1* and *MMP-7* genes; these two latter genes are down-regulated by *pea3* knock-down [66]. In this experiment, HT-29 colon cancer cells were transfected with antisense human *pea3* in order to specifically target the endogenous gene. Moreover, recent immunochemistry studies also demonstrate that *pea3* expression, in pre-malignant tissues such as colorectal adenomas, correlates with over-expression not only of *MMPs*, but also of *COX-2* and *iNos* genes coding for two factors involved in tumor angiogenesis [27,67,68]. Altogether, these data suggest that Pea3, in association with β -*catenin*, plays a role in colorectal tumor progression, by targeting specific key target genes.

5.4. In gynaecological tissues

These factors play important roles. The *er81* gene is weakly expressed in the human ovary and *erm* is not expressed in this organ. However, *erm* expression is found in human ovarian adenocarcinoma [6,11]. In the mouse ovary, only *erm* is expressed to low level [8]. In ovarian and endometrial cancer cell lines, exogenously expressed *er81* activates transcription of *Smad7*, which can participate in inhibition of the TGF- β signalling pathway with anti-proliferative effects [69]. Pea3 has

also been implicated in ovarian carcinoma, being expressed in the majority of carcinomas studied. Interestingly, intense *pea3* expression in the stroma is also detected in the vicinity of grade II and III tumors and it correlates with *MMP-2* expression within the carcinoma cells, thus, illustrating the dialogue between these two compartments. Expression of *pea3* also correlates with the expression of genes coding for MMP-1, EMMPRIN (an MMP inducer) and angiogenic factors such as bFGF, IL-8 and integrins [70,71].

The role of the PEA3 group members in normal and pathological mammary development has been extensively studied these last years. The corresponding genes are indeed expressed at different steps of mouse mammary gland development. During embryogenesis, they are highly expressed in the epithelial buds of the mammary gland [8], and after birth, *pea3* and *erm* mRNAs are detected throughout all stages of mammary gland development, whereas *er81* is present only in pubescent gland. During puberty, *pea3* and *erm* expression correlates with ductal elongation and branching [72]. Supporting this observation, normal murine mammary cells over-expressing the PEA3 group members show an increased capacity to form in vitro branching duct-like structures [72].

We have shown above that PEA3 group expression in cancers of the respiratory and gastrointestinal tracts correlates strongly with a bad prognosis for the patient. In mammary cancer, expression of the HER2/Neu growth factor receptor, whose expression correlates with bad prognosis, led to the suggestion that it might be co-expressed with the transcription factors of the PEA3 group. This relationship has been widely studied. The first experimental evidence was the over-expression of *pea3* in *neu*-induced mouse mammary primary adenocarcinomas, as well as the corresponding metastatic lesions [73]. The *er81* and *erm* genes are also expressed in such tumors [74]. In contrast, inhibition of the transcriptional activity of the PEA3 group members by expressing a dominant-negative form in these transgenic mice delays the onset of tumorigenesis and reduces tumor progression [75]. It should be noted here, however, that this dominant-negative form might act not only on PEA3 target genes, but also on Ets target genes, as this chimera consists of the ETS- and the Ct-domains of Pea3 fused to the *Drosophila* Engrailed repression domain. In human breast cell lines, all the three PEA3 group members are highly expressed, especially in estradiol receptor negative cells, which display an aggressive phenotype in nude mice [76]. Although over-expression of HER2/neu is observed only in 20–30% of all breast carcinomas [77], *pea3* expression was, in a series of 74 patients, observed in more than 90% of HER2/neu-positive breast carcinomas, and in less than 50% of the HER2/neu-negative ones [78]. Moreover, *pea3* and *neu* expression correlates positively with invasive breast tumors [78,79]. However, provocative data concerning *pea3* expression in human breast carcinomas show better overall survival when this factor is present [80]. This might be due in part of the ethnic origin of the patients (they were Japanese). Yet, in a French study performed on 130 patients, expression of this factor was characterized as a tumor aggressiveness marker and not as a prognostic factor for overall survival [79]. Whatever the case

may be, the molecular mechanism by which Pea3 regulates the *HER2/neu* gene operates at the transcriptional level, since the factor binds to the promoter [81] and, when exogenously expressed, enhances reporter gene expression from a plasmid containing this promoter [78]. Moreover, HER2/neu is able to enhance Pea3 transactivation through the ERK and SAPK/JNK pathways [78,82] and can thus lead to its own transactivation. Over-expressed Pea3 also enhances transcription of other genes involved in mammary metastasis; i.e., the *osteopontin* in rat mammary cell lines [47], and the *Muc4/sialomucin* complex genes in HC11 normal mouse mammary cells [83], *cyclooxygenase-2* gene in human breast epithelial cell lines 184B5 and 184B5/HER [84]. HER2/neu-induced activation also targets Er81 through the Ras–Raf–MAPK pathway, thus increasing the transcriptional activity of this transcription factor on different target genes such as *MMP-1*, the *Smad7* gene coding for the TGFbeta inhibitor and the telomerase reverse transcriptase gene *hTERT* [34,69,85]. Whatever the case may be, two provocative papers from the same group report that Pea3 can act on the *HER2/neu* promoter as a transcriptional repressor in specific mammary cancer cell lines [86,87]. These results seem to be restricted to the human mammary cell lines used in these experiments [86]; i.e., SK-BR-3 and MDA-MB-453 for HER-2/neu over-expressing cells and MDA-MB-435 for HER-2/neu low-expressing cells, whilst we have shown, for example, that in MCF-7 cells expressing low levels of *HER-2/neu*, the expression of the PEA3 group members induces HER-2/neu promoter activity (J.L. Baert; personal communication). Although the authors of this 6-year-old study proposed to increase Pea3 expression in HER-2/neu over-expressing tumor patients [86], we suggest first precisely checking for the Pea3-responsiveness of the tumor cells. Similar “contradictory” observations have been made on other systems. For example, normal human fibroblasts were found to undergo senescence in response to Ras or its downstream effectors, the two Ets proteins Ets-1 and Ets-2, but dermal fibroblasts from a patient carrying mutations in the *INK4a/ARF* tumor suppressor locus did not [88,89]. This highlights the importance of the genetic context of the tumor. In the case of mammary cell lines, other genetic alterations might explain the different results observed. Here again, *pea3* was exogenously over-expressed and could thus probably alter not only Pea3-dependent pathways, but probably also Ets transcription factor pathways. These are maybe less sensitive to Pea3, but they might be activated by high levels of this protein. Finally, recent studies have demonstrated that *erm* expression correlates with invasiveness and poor prognosis in breast cancer [90] and with invasiveness in endometrial carcinoma [91]. The functional role of this transcription factor in these cancers should be examined in more details.

6. The PEA3 group members and chromosomal rearrangement in cancer

To be exhaustive on the roles of the PEA3 group members in human cancer, we should mention here that in a very few cases, genes of these transcription factors are rearranged. For example Ewing’s sarcoma, which is an aggressive cancer predominantly

affecting children and young adults, results from a chromosomal translocation between an *ets* gene and the *ews* RNA-binding protein gene. Two members of the *ets* gene family are currently described to be fused with *ews*: *fli-1* in 85% of cases [92] and *erg* in 14% of cases [93]. However, *er81* [10], *pea3* [94,95], and *fev* [96] have also been found to form a fusion protein containing the amino-terminal transactivation domain of EWS and the ETS DNA-binding domain from the *ets* gene (for a review, see [97]). These chimeric Ews-Ets proteins display an increased potential to transactivate the promoters of Ets target genes as compared to the wild-type Ets proteins [98]. Moreover, due to the *ews* promoter, these chimeras also display ubiquitous high expression, thus suggesting that in Ewing's sarcoma, Ets-target genes could be up-regulated by the high amount of chimera. However, although Ews-Er81 is able in vitro to transactivate the *MMP-1* promoter in association with p300 and c-Jun [99], the opposite occurs in vivo. Ewing's sarcoma expressing *ews-pea3* does not express *MMP-1* or *MMP-3*, probably because the chimera has lost access to EBS [100]. Both Ews-Er81 and Ews-Pea3 can also increase the transcription of *hTERT*, a catalytic subunit of telomerase which activates telomerase and thus induces cell immortalization [101,102].

Finally, both *er81* (*etv1*) and *erg* have been identified as rearranged in prostate cancers, with fusion of the 5'-untranslated region of the *TMPRSS2* gene to *er81* or *erg* with outlier expression. In fact, 23 of the 29 prostate cancer samples studied were found to harbour rearrangements in *erg* or *er81*, and the androgen-responsive promoter elements of *TMPRSS2* mediate over-expression of Ets-family members in these cells. These very recent data have implications for the molecular diagnosis and treatment of prostate cancer [103].

In conclusion, the PEA3 group members are functional transcription factors of the Ets family, playing a role in human cancer. In particular, they regulate the expression of target genes involved in metastasis.

Acknowledgements

This work was carried out thanks to grants awarded by the "Centre National de la Recherche Scientifique" (France), the "Institut Pasteur de Lille", the "Association pour la Recherche contre le Cancer" (France), the "Ligue Nationale Contre le Cancer" (Comité Nord, France), «the Conseil Régional Nord/Pas-de-Calais» (France, the European Regional Developmental Fund, the « Université de Lille I » (France), the "Fonds National de la Recherche Scientifique" (FNRS, Belgium) and the "Action de Recherche Concertée (Communauté Française de Belgique)" (Belgium).

References

- [1] B.J. Graves, J.M. Petersen, Specificity within the ets family of transcription factors, *Adv. Cancer Res.* 75 (1998) 1–55.
- [2] A.D. Sharrocks, A.L. Brown, Y. Ling, P.R. Yates, The ETS-domain transcription factor family, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29 (1997) 1371–1387.
- [3] A.D. Sharrocks, The ETS-domain transcription factor family, *Nat. Rev., Mol. Cell Biol.* 2 (2001) 827–837.
- [4] T. Oikawa, T. Yamada, Molecular biology of the Ets family of transcription factors, *Gene* 303 (2003) 11–34.
- [5] V. Laudet, C. Hanni, D. Stehelin, M. Duterque-Coquillaud, Molecular phylogeny of the ETS gene family, *Oncogene* 18 (1999) 1351–1359.
- [6] D. Monte, J.L. Baert, P.A. Defossez, Y. de Launoit, D. Stehelin, Molecular cloning and characterization of human ERM, a new member of the Ets family closely related to mouse PEA3 and ER81 transcription factors, *Oncogene* 9 (1994) 1397–1406.
- [7] K. Nakae, K. Nakajima, J. Inazawa, T. Kitaoka, T. Hirano, ERM, a PEA3 subfamily of Ets transcription factors, can cooperate with c-Jun, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 23795–23800.
- [8] A. Chotteau-Lelievre, X. Desbiens, H. Pelczar, P.A. Defossez, Y. de Launoit, Differential expression patterns of the PEA3 group transcription factors through murine embryonic development, *Oncogene* 15 (1997) 937–952.
- [9] T.A. Brown, S.L. McKnight, Specificities of protein–protein and protein–DNA interaction of GABP alpha and two newly defined ets-related proteins, *Genes Dev.* 6 (1992) 2502–2512.
- [10] I.S. Jeon, J.N. Davis, B.S. Braun, J.E. Sublett, M.F. Roussel, C.T. Denny, D.N. Shapiro, A variant Ewing's sarcoma translocation (7;22) fuses the EWS gene to the ETS gene ETV1, *Oncogene* 10 (1995) 1229–1234.
- [11] D. Monte, L. Coutte, J.L. Baert, I. Angeli, D. Stehelin, Y. de Launoit, Molecular characterization of the ets-related human transcription factor ER81, *Oncogene* 11 (1995) 771–779.
- [12] J.H. Xin, A. Cowie, P. Lachance, J.A. Hassell, Molecular cloning and characterization of PEA3, a new member of the Ets oncogene family that is differentially expressed in mouse embryonic cells, *Genes Dev.* 6 (1992) 481–496.
- [13] F. Higashino, K. Yoshida, Y. Fujinaga, K. Kamio, K. Fujinaga, Isolation of a cDNA encoding the adenovirus E1A enhancer binding protein: a new human member of the ets oncogene family, *Nucleic Acids Res.* 21 (1993) 547–553.
- [14] L.S. Friedman, E.A. Ostermeyer, E.D. Lynch, C.I. Szabo, L.A. Anderson, P. Dowd, M.K. Lee, S.E. Rowell, J. Boyd, M.C. King, The search for BRCA1, *Cancer Res.* 54 (1994) 6374–6382.
- [15] Y. de Launoit, J.L. Baert, A. Chotteau, D. Monte, P.A. Defossez, L. Coutte, H. Pelczar, F. Leenders, Structure–function relationships of the PEA3 group of Ets-related transcription factors, *Biochem. Mol. Med.* 61 (1997) 127–135.
- [16] L. Coutte, D. Monte, K. Imai, L. Pouilly, F. Dewitte, M. Vidaud, J. Adamski, J.L. Baert, Y. de Launoit, Characterization of the human and mouse ETV1/ER81 transcription factor genes: role of the two alternatively spliced isoforms in the human, *Oncogene* 18 (1999) 6278–6286.
- [17] D. Monte, L. Coutte, F. Dewitte, P.A. Defossez, M. Le Coniat, D. Stehelin, R. Berger, Y. de Launoit, Genomic organization of the human ERM (ETV5) gene, a PEA3 group member of ETS transcription factors, *Genomics* 35 (1996) 236–240.
- [18] L. Coutte, D. Monte, J. Baert, Y. de Launoit, Genomic organization of the human *elaf* gene, a member of Ets transcription factors, *Gene* 240 (1999) 201–207.
- [19] C. Desmaze, F. Brizard, C. Turc-Carel, T. Melot, O. Delattre, G. Thomas, A. Aurias, Multiple chromosomal mechanisms generate an EWS/FLI1 or an EWS/ERG fusion gene in Ewing tumors, *Cancer Genet. Cytogenet.* 97 (1997) 12–19.
- [20] M.P. Laget, P.A. Defossez, O. Albagli, J.L. Baert, F. Dewitte, D. Stehelin, Y. de Launoit, Two functionally distinct domains responsible for transactivation by the Ets family member ERM, *Oncogene* 12 (1996) 1325–1336.
- [21] B.B. Bojovic, J.A. Hassell, The PEA3 Ets transcription factor comprises multiple domains that regulate transactivation and DNA binding, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 4509–4521.
- [22] A. Takahashi, F. Higashino, M. Aoyagi, K. Yoshida, M. Itoh, M. Kobayashi, Y. Totsuka, T. Kohgo, M. Shindoh, E1AF degradation by a ubiquitin-proteasome pathway, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 327 (2005) 575–580.
- [23] J.-L. Baert, C. Beaudoin, D. Monté, C. Degerny, S. Mauën, Y. de Launoit, ERM transcription factor is degraded by the 26S proteasome pathway regulating its transcription-enhancing activity. (submitted for publication).

- [24] P.A. Defossez, J.L. Baert, M. Monnot, Y. de Launoit, The ETS family member ERM contains an alpha-helical acidic activation domain that contacts TAFII60, *Nucleic Acids Res.* 25 (1997) 4455–4463.
- [25] J. Schneikert, H. Peterziel, P.A. Defossez, H. Klocker, Y. Launoit, A.C. Cato, Androgen receptor–Ets protein interaction is a novel mechanism for steroid hormone-mediated down-modulation of matrix metalloproteinase expression, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 23907–23913.
- [26] A. Goel, R. Janknecht, Acetylation-mediated transcriptional activation of the ETS protein ER81 by p300, P/CAF, and HER2/Neu, *Mol. Cell. Biol.* 23 (2003) 6243–6254.
- [27] Y. Liu, G.L. Borchert, J.M. Phang, Polyoma enhancer activator 3, an ets transcription factor, mediates the induction of cyclooxygenase-2 by nitric oxide in colorectal cancer cells, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 18694–18700.
- [28] C.B. Gocke, H. Yu, J. Kang, Systematic identification and analysis of mammalian small ubiquitin-like modifier substrates, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 5004–5012.
- [29] C. Degerny, D. Monte, C. Beaudoin, E. Jaffray, L. Portois, R.T. Hay, Y. de Launoit, J.L. Baert, SUMO modification of the Ets-related transcription factor ERM inhibits its transcriptional activity, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 24330–24338.
- [30] V. Firlje, B. Bocquet, X. Desbiens, Y. de Launoit, A. Chotteau-Lelievre, Pea3 transcription factor cooperates with USF-1 in regulation of the murine bax transcription without binding to an Ets-binding site, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 887–898.
- [31] R. Janknecht, D. Monte, J.L. Baert, Y. de Launoit, The ETS-related transcription factor ERM is a nuclear target of signaling cascades involving MAPK and PKA, *Oncogene* 13 (1996) 1745–1754.
- [32] R. Janknecht, Analysis of the ERK-stimulated ETS transcription factor ER81, *Mol. Cell. Biol.* 16 (1996) 1550–1556.
- [33] R.C. O'Hagan, R.G. Tozer, M. Symons, F. McCormick, J.A. Hassell, The activity of the Ets transcription factor PEA3 is regulated by two distinct MAPK cascades, *Oncogene* 13 (1996) 1323–1333.
- [34] D.G. Bosc, B.S. Goueli, R. Janknecht, HER2/Neu-mediated activation of the ETS transcription factor ER81 and its target gene MMP-1, *Oncogene* 20 (2001) 6215–6224.
- [35] L.A. Brown, A. Amores, T.F. Schilling, T. Jowett, J.L. Baert, Y. de Launoit, A.D. Sharrocks, Molecular characterization of the zebrafish PEA3 ETS-domain transcription factor, *Oncogene* 17 (1998) 93–104.
- [36] J.L. Baert, C. Beaudoin, L. Coutte, Y. de Launoit, ERM transactivation is up-regulated by the repression of dNA binding after the PKA phosphorylation of a consensus site at the edge of the ETS domain, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 1002–1012.
- [37] A. Chotteau-Lelievre, P. Dolle, V. Peronne, L. Coutte, Y. de Launoit, X. Desbiens, Expression patterns of the Ets transcription factors from the PEA3 group during early stages of mouse development, *Mech. Dev.* 108 (2001) 191–195.
- [38] J.H. Lin, T. Saito, D.J. Anderson, C. Lance-Jones, T.M. Jessell, S. Arber, Functionally related motor neuron pool and muscle sensory afferent subtypes defined by coordinate ETS gene expression, *Cell* 95 (1998) 393–407.
- [39] S. Arber, D.R. Ladle, J.H. Lin, E. Frank, T.M. Jessell, ETS gene Er81 controls the formation of functional connections between group Ia sensory afferents and motor neurons, *Cell* 101 (2000) 485–498.
- [40] C. Chen, W. Ouyang, V. Grigura, Q. Zhou, K. Carnes, H. Lim, G.Q. Zhao, S. Arber, N. Kurpios, T.L. Murphy, A.M. Cheng, J.A. Hassell, V. Chandrashekar, M.C. Hofmann, R.A. Hess, K.M. Murphy, ERM is required for transcriptional control of the spermatogonial stem cell niche, *Nature* 436 (2005) 1030–1034.
- [41] M.A. Laing, S. Coonrod, B.T. Hinton, J.W. Downie, R. Tozer, M.A. Rudnicki, J.A. Hassell, Male sexual dysfunction in mice bearing targeted mutant alleles of the PEA3 ets gene, *Mol. Cell. Biol.* 20 (2000) 9337–9345.
- [42] F. Higashino, K. Yoshida, T. Noumi, M. Seiki, K. Fujinaga, Ets-related protein E1A-F can activate three different matrix metalloproteinase gene promoters, *Oncogene* 10 (1995) 1461–1463.
- [43] H.C. Crawford, B. Fingleton, M.D. Gustavson, N. Kurpios, R.A. Wagenaar, J.A. Hassell, L.M. Matrisian, The PEA3 subfamily of Ets transcription factors synergizes with beta-catenin-LEF-1 to activate matrilysin transcription in intestinal tumors, *Mol. Cell. Biol.* 21 (2001) 1370–1383.
- [44] S. Netzer, F. Leenders, P. Dumont, J.L. Baert, Y. de Launoit, Ectopic expression of the ets transcription factor ER81 in transgenic mouse mammary gland enhances both urokinase plasminogen activator and stromelysin-1 transcription, *Transgenic Res.* 11 (2002) 123–131.
- [45] J.H. Chen, C. Vercamer, Z. Li, D. Paulin, B. Vandebunder, D. Stehelin, PEA3 transactivates vimentin promoter in mammary epithelial and tumor cells, *Oncogene* 13 (1996) 1667–1675.
- [46] Y. de Launoit, M. Audette, H. Pelczar, S. Plaza, J.L. Baert, The transcription of the intercellular adhesion molecule-1 is regulated by Ets transcription factors, *Oncogene* 16 (1998) 2065–2073.
- [47] M. El-Tanani, A. Platt-Higgins, P.S. Rudland, F.C. Campbell, Ets gene PEA3 cooperates with beta-catenin-Lef-1 and c-Jun in regulation of osteopontin transcription, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 20794–20806.
- [48] L.R. Howe, H.C. Crawford, K. Subbaramaiah, J.A. Hassell, A.J. Dannenberg, A.M. Brown, PEA3 is up-regulated in response to Wnt1 and activates the expression of cyclooxygenase-2, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 20108–20115.
- [49] M. Shindoh, F. Higashino, M. Kaya, M. Yasuda, K. Funaoka, M. Hanzawa, K. Hida, T. Kohgo, A. Amemiya, K. Yoshida, K. Fujinaga, Correlated expression of matrix metalloproteinases and ets family transcription factor E1A-F in invasive oral squamous-cell-carcinoma-derived cell lines, *Am. J. Pathol.* 148 (1996) 693–700.
- [50] M. Kaya, K. Yoshida, F. Higashino, T. Mitaka, S. Ishii, K. Fujinaga, A single ets-related transcription factor, E1AF, confers invasive phenotype on human cancer cells, *Oncogene* 12 (1996) 221–227.
- [51] K. Hida, M. Shindoh, K. Yoshida, A. Kudoh, K. Furaoka, T. Kohgo, K. Fujinaga, Y. Totsuka, Expression of E1AF, an ets-family transcription factor, is correlated with the invasive phenotype of oral squamous cell carcinoma, *Oral Oncol.* 33 (1997) 426–430.
- [52] H. Habelhah, F. Okada, M. Kobayashi, K. Nakai, S. Choi, J. Hamada, T. Moriuchi, M. Kaya, K. Yoshida, K. Fujinaga, M. Hosokawa, Increased E1AF expression in mouse fibrosarcoma promotes metastasis through induction of MT1-MMP expression, *Oncogene* 18 (1999) 1771–1776.
- [53] K. Hida, M. Shindoh, M. Yasuda, M. Hanzawa, K. Funaoka, T. Kohgo, A. Amemiya, Y. Totsuka, K. Yoshida, K. Fujinaga, Antisense E1AF transfection restrains oral cancer invasion by reducing matrix metalloproteinase activities, *Am. J. Pathol.* 150 (1997) 2125–2132.
- [54] M. Hanzawa, M. Shindoh, F. Higashino, M. Yasuda, N. Inoue, K. Hida, M. Ono, T. Kohgo, M. Nakamura, K. Notani, H. Fukuda, Y. Totsuka, K. Yoshida, K. Fujinaga, Hepatocyte growth factor upregulates E1AF that induces oral squamous cell carcinoma cell invasion by activating matrix metalloproteinase genes, *Carcinogenesis* 21 (2000) 1079–1085.
- [55] Y. Izumiya, Y. Ohno, F. Higashino, K. Yoshida, K. Taguchi, S. Todo, T. Kohgo, Y. Totsuka, M. Shindoh, E1AF expression is closely correlated with malignant phenotype of tongue squamous cell carcinoma through activation of MT1-MMP gene promoters, *Oncol. Rep.* 13 (2005) 715–720.
- [56] H. Hiroumi, H. Dosaka-Akita, K. Yoshida, M. Shindoh, T. Ohbuchi, K. Fujinaga, M. Nishimura, Expression of E1AF/PEA3, an Ets-related transcription factor in human non-small-cell lung cancers: its relevance in cell motility and invasion, *Int. J. Cancer* 93 (2001) 786–791.
- [57] P.A. Appeddu, B.D. Shur, Molecular analysis of cell surface beta-1,4-galactosyltransferase function during cell migration, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91 (1994) 2095–2099.
- [58] M.B. Penno, A. Passaniti, R. Fridman, G.W. Hart, C. Jordan, S. Kumar, A.F. Scott, In vitro galactosylation of a 110-kDa glycoprotein by an endogenous cell surface galactosyltransferase correlates with the invasiveness of adrenal carcinoma cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86 (1989) 6057–6061.
- [59] A. Passaniti, G.W. Hart, Metastasis-associated murine melanoma cell surface galactosyltransferase: characterization of enzyme activity and identification of the major surface substrates, *Cancer Res.* 50 (1990) 7261–7271.
- [60] X. Zhu, J. Jiang, H. Shen, H. Wang, H. Zong, Z. Li, Y. Yang, Z. Niu, W. Liu, X. Chen, Y. Hu, J. Gu, Elevated beta1,4-galactosyltransferase I in

- highly metastatic human lung cancer cells. Identification of E1AF as important transcription activator, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 12503–12516.
- [61] H. Yamamoto, S. Horiuchi, Y. Adachi, H. Taniguchi, K. Noshio, Y. Min, K. Imai, Expression of ets-related transcriptional factor E1AF is associated with tumor progression and over-expression of matrilysin in human gastric cancer, *Carcinogenesis* 25 (2004) 325–332.
- [62] X.P. Liu, S. Kawauchi, A. Oga, K. Tsushimi, M. Tsushimi, T. Furuya, K. Sasaki, Prognostic significance of matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) expression at the invasive front in gastric carcinoma, *Jpn. J. Cancer Res.* 93 (2002) 291–295.
- [63] A. Iguchi, I. Kitajima, M. Yamakuchi, S. Ueno, T. Aikou, T. Kubo, K. Matsushima, N. Mukaida, I. Maruyama, PEA3 and AP-1 are required for constitutive IL-8 gene expression in hepatoma cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279 (2000) 166–171.
- [64] G.L. Matters, J.S. Bond, Expression and regulation of the meprin beta gene in human cancer cells, *Mol. Carcinog.* 25 (1999) 169–178.
- [65] C.L. Wilson, L.M. Matrisian, Matrilysin: an epithelial matrix metalloproteinase with potentially novel functions, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 28 (1996) 123–136.
- [66] S. Horiuchi, H. Yamamoto, Y. Min, Y. Adachi, F. Itoh, K. Imai, Association of ets-related transcriptional factor E1AF expression with tumour progression and overexpression of MMP-1 and matrilysin in human colorectal cancer, *J. Pathol.* 200 (2003) 568–576.
- [67] W.M. Boedefeld II, R. Soong, H. Weiss, R.B. Diasio, M.M. Urist, K.I. Bland, M.J. Heslin, E1A-F is overexpressed early in human colorectal neoplasia and associated with cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-7, *Mol. Carcinog.* 43 (2005) 13–17.
- [68] K. Noshio, M. Yoshida, H. Yamamoto, H. Taniguchi, Y. Adachi, M. Mikami, Y. Hinoda, K. Imai, Association of Ets-related transcriptional factor E1AF expression with overexpression of matrix metalloproteinases, COX-2 and iNOS in the early stage of colorectal carcinogenesis, *Carcinogenesis* 26 (2005) 892–899.
- [69] S.C. Dowdy, A. Mariani, R. Janknecht, HER2/Neu- and TAK1-mediated up-regulation of the transforming growth factor beta inhibitor Smad7 via the ETS protein ER81, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 44377–44384.
- [70] B. Davidson, I. Goldberg, W.H. Gotlieb, J. Kopolovic, G. Ben-Baruch, R. Reich, PEA3 is the second Ets family transcription factor involved in tumor progression in ovarian carcinoma, *Clin. Cancer Res.* 9 (2003) 1412–1419.
- [71] B. Davidson, I. Goldberg, L. Tell, S. Vigdorshik, M. Baekelandt, A. Berner, G.B. Kristensen, R. Reich, J. Kopolovic, The clinical role of the PEA3 transcription factor in ovarian and breast carcinoma in effusions, *Clin. Exp. Metastasis* 21 (2004) 191–199.
- [72] A. Chotteau-Lelievre, R. Montesano, J. Soriano, P. Soulie, X. Desbiens, Y. de Launoit, PEA3 transcription factors are expressed in tissues undergoing branching morphogenesis and promote formation of duct-like structures by mammary epithelial cells in vitro, *Dev. Biol.* 259 (2003) 241–257.
- [73] M.S. Trimble, J.H. Xin, C.T. Guy, W.J. Muller, J.A. Hassell, PEA3 is overexpressed in mouse metastatic mammary adenocarcinomas, *Oncogene* 8 (1993) 3037–3042.
- [74] C.K. Galang, W.J. Muller, G. Foos, R.G. Oshima, C.A. Hauser, Changes in the expression of many Ets family transcription factors and of potential target genes in normal mammary tissue and tumors, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 11281–11292.
- [75] T.G. Shepherd, L. Kockeritz, M.R. Szrajber, W.J. Muller, J.A. Hassell, The pea3 subfamily ets genes are required for HER2/Neu-mediated mammary oncogenesis, *Curr. Biol.* 11 (2001) 1739–1748.
- [76] J.L. Baert, D. Monte, E.A. Musgrove, O. Albagli, R.L. Sutherland, Y. de Launoit, Expression of the PEA3 group of ETS-related transcription factors in human breast-cancer cells, *Int. J. Cancer* 70 (1997) 590–597.
- [77] T.P. Singleton, J.G. Strickler, Clinical and pathologic significance of the c-erbB-2 (HER-2/neu) oncogene, *Pathol. Annu.* 27 (Pt. 1) (1992) 165–190.
- [78] C.C. Benz, R.C. O'Hagan, B. Richter, G.K. Scott, C.H. Chang, X. Xiong, K. Chew, B.M. Ljung, S. Edgerton, A. Thor, J.A. Hassell, HER2/Neu and the Ets transcription activator PEA3 are coordinately upregulated in human breast cancer, *Oncogene* 15 (1997) 1513–1525.
- [79] I. Bieche, S. Tozlu, I. Girault, P. Onody, K. Driouch, M. Vidaud, R. Lidereau, Expression of PEA3/E1AF/ETV4, an Ets-related transcription factor, in breast tumors: positive links to MMP2, NRG1 and CGB expression, *Carcinogenesis* 25 (2004) 405–411.
- [80] J. Kinoshita, K. Kitamura, S. Tanaka, K. Sugimachi, M. Ishida, H. Saeki, Clinical significance of PEA3 in human breast cancer, *Surgery* 131 (2002) S222–S225.
- [81] G.K. Scott, J.C. Daniel, X. Xiong, R.A. Maki, D. Kabat, C.C. Benz, Binding of an ETS-related protein within the DNase I hypersensitive site of the HER2/neu promoter in human breast cancer cells, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 19848–19858.
- [82] R.C. O'Hagan, J.A. Hassell, The PEA3 Ets transcription factor is a downstream target of the HER2/Neu receptor tyrosine kinase, *Oncogene* 16 (1998) 301–310.
- [83] A. Perez, R. Barco, I. Fernandez, S.A. Price-Schiavi, K.L. Carraway, PEA3 transactivates the Muc4/sialomucin complex promoter in mammary epithelial and tumor cells, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 36942–36952.
- [84] K. Subbaramaiah, L. Norton, W. Gerald, A.J. Dannenberg, Cyclooxygenase-2 is overexpressed in HER-2/neu-positive breast cancer: evidence for involvement of AP-1 and PEA3, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 18649–18657.
- [85] B.S. Goueli, R. Janknecht, Upregulation of the catalytic telomerase subunit by the transcription factor ER81 and oncogenic HER2/Neu, Ras, or Raf, *Mol. Cell. Biol.* 24 (2004) 25–35.
- [86] X. Xing, S.C. Wang, W. Xia, Y. Zou, R. Shao, K.Y. Kwong, Z. Yu, S. Zhang, S. Miller, L. Huang, M.C. Hung, The ets protein PEA3 suppresses HER-2/neu overexpression and inhibits tumorigenesis, *Nat. Med.* 6 (2000) 189–195.
- [87] M.C. Hung, S.C. Wang, Suppressing HER2/neu-mediated cell transformation by transcriptional repressors, *Breast Dis* 11 (2000) 133–144.
- [88] N. Ohtani, Z. Zebedee, T.J. Huot, J.A. Stinson, M. Sugimoto, Y. Ohashi, A.D. Sharrocks, G. Peters, E. Hara, Opposing effects of Ets and Id proteins on p16INK4a expression during cellular senescence, *Nature* 409 (2001) 1067–1070.
- [89] T.J. Huot, J. Rowe, M. Harland, S. Drayton, S. Brookes, C. Gooptu, P. Purkis, M. Fried, V. Bataille, E. Hara, J. Newton-Bishop, G. Peters, Biallelic mutations in p16(INK4a) confer resistance to Ras- and Ets-induced senescence in human diploid fibroblasts, *Mol. Cell. Biol.* 22 (2002) 8135–8143.
- [90] A. Chotteau-Lelievre, F. Revillion, V. Lhotellier, L. Hornez, X. Desbiens, V. Cabaret, Y. de Launoit, J.P. Peyrat, Prognostic value of ERM gene expression in human primary breast cancers, *Clin. Cancer Res.* 10 (2004) 7297–7303.
- [91] J. Planaguma, M. Abal, A. Gil-Moreno, M. Diaz-Fuertes, M. Monge, A. Garcia, T. Baro, J. Xercavins, J. Reventos, F. Alameda, Up-regulation of ERM/ETV5 correlates with the degree of myometrial infiltration in endometrioid endometrial carcinoma, *J. Pathol.* 207 (2005) 422–429.
- [92] O. Delattre, J. Zucman, B. Plougastel, C. Desmazes, T. Melot, M. Peter, H. Kovar, I. Joubert, P. de Jong, G. Rouleau, et al., Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours, *Nature* 359 (1992) 162–165.
- [93] P.H. Sorensen, S.L. Lessnick, D. Lopez-Terrada, X.F. Liu, T.J. Triche, C.T. Denny, A second Ewing's sarcoma translocation, t(21;22), fuses the EWS gene to another ETS-family transcription factor, ERG *Nat. Genet.* 6 (1994) 146–151.
- [94] F. Urano, A. Umezawa, W. Hong, H. Kikuchi, J. Hata, A novel chimera gene between EWS and E1A-F, encoding the adenovirus E1A enhancer-binding protein, in extraosseous Ewing's sarcoma, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 219 (1996) 608–612.
- [95] Y. Kaneko, K. Yoshida, M. Handa, Y. Toyoda, H. Nishihira, Y. Tanaka, Y. Sasaki, S. Ishida, F. Higashino, K. Fujinaga, Fusion of an ETS-family gene, E1AF, to EWS by t(17;22)(q12;q12) chromosome translocation in an undifferentiated sarcoma of infancy, *Genes Chromosomes Cancer* 15 (1996) 115–121.

- [96] M. Peter, J. Couturier, H. Pacquement, J. Michon, G. Thomas, H. Magdelenat, O. Delattre, A new member of the ETS family fused to EWS in Ewing tumors, *Oncogene* 14 (1997) 1159–1164.
- [97] A. Arvand, C.T. Denny, Biology of EWS/ETS fusions in Ewing's family tumors, *Oncogene* 20 (2001) 5747–5754.
- [98] R.A. Bailly, R. Bosselut, J. Zucman, F. Cormier, O. Delattre, M. Roussel, G. Thomas, J. Ghysdael, DNA-binding and transcriptional activation properties of the EWS-FLI-1 fusion protein resulting from the t(11;22) translocation in Ewing sarcoma, *Mol. Cell. Biol.* 14 (1994) 3230–3241.
- [99] B. Fuchs, C.Y. Inwards, R. Janknecht, Upregulation of the matrix metalloproteinase-1 gene by the Ewing's sarcoma associated EWS-ER81 and EWS-Fli-1 oncoproteins, c-Jun and p300, *FEBS Lett.* 553 (2003) 104–108.
- [100] H. Yabe, M. Fukuma, F. Urano, K. Yoshida, S. Kato, Y. Toyama, J. Hata, A. Umezawa, Lack of matrix metalloproteinase (MMP)-1 and -3 expression in Ewing sarcoma may be due to loss of accessibility of the MMP regulatory element to the specific fusion protein in vivo, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293 (2002) 61–71.
- [101] B. Fuchs, C. Inwards, S.P. Scully, R. Janknecht, hTERT Is highly expressed in Ewing's sarcoma and activated by EWS-ETS oncoproteins, *Clin. Orthop. Relat. Res.* (2004) 64–68.
- [102] M. Shindoh, F. Higashino, T. Kohgo, E1AF, an ets-oncogene family transcription factor, *Cancer Lett.* 216 (2004) 1–8.
- [103] S.A. Tomlins, D.R. Rhodes, S. Perner, S.M. Dhanasekaran, R. Mehra, X.W. Sun, S. Varambally, X. Cao, J. Tchinda, R. Kuefer, C. Lee, J.E. Montie, R.B. Shah, K.J. Pienta, M.A. Rubin, A.M. Chinnaiyan, Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer, *Science* 310 (2005) 644–648.
- [104] J. Wu, R. Janknecht, Regulation of the ETS transcription factor ER81 by the 90-kDa ribosomal S6 kinase 1 and protein kinase A, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 42669–42679.

Les facteurs de transcription du groupe PEA3 : régulateurs transcriptionnels dans le processus de cancérisation

PEA3 family of transcription factors and the regulation of oncogenesis

Yvan DE LAUNOIT^{1,2}
Jean-Luc BAERT¹
Anne CHOTTEAU-LELIEVRE¹
Didier MONTE¹
Laurent COUTTE^{1,3}
Sébastien MAUEN²
Virginie FIRLEJ¹
Cindy DEGERNY¹
Kathy VERREMAN¹

¹ UMR 8161, Institut de biologie de Lille, CNRS, Université de Lille I, Université de Lille II, Institut Pasteur de Lille, BP447, 1 rue Calmette, 59021 Lille Cedex

² Laboratoire de virologie moléculaire, Faculté de Médecine, Université Libre de Bruxelles, CP 614, 808 route de Lennik, 1070 Brussels, Belgium

<yvan.delaunoi@ibl.fr>

³ Laboratoire de biologie animale, Bâtiment 470, Faculté des Sciences d'Orsay, Université de Paris Sud, 91405 Orsay

Résumé. Erm, Er81 et Pea3 sont les trois membres du groupe PEA3 qui fait partie de la grande famille des facteurs de transcription Ets. Ces facteurs régulent la transcription des nombreux gènes, dont plusieurs codant des métalloprotéases de la matrice (MMP), qui sont des enzymes contribuant à la dégradation de la matrice extracellulaire, entre autres, lors de la métastase. De fait, les gènes du groupe PEA3 sont souvent surexprimés dans différents types de cancers humains qui surexpriment également ces MMP et présentent un phénotype de dissémination. Par ailleurs, dans des modèles expérimentaux, la régulation ectopique de l'expression des membres du groupe PEA3 influence le processus métastatique, confirmant ainsi son rôle important dans ce processus. ▲

Mots clés : métastase, facteurs de transcription, Ets, PEA3

Abstract. Erm, Er81, and Pea3 are the three members of the PEA3 group which belong to the Ets transcription factors family. These proteins regulate transcription of multiple target genes, such as those encoding several matrix metalloproteinases (MMP), which are enzymes degrading the extracellular matrix during cancer metastasis. In fact, PEA3-group genes are often overexpressed in different types of human cancers that also over-express these MMP and display a disseminating phenotype. In experimental models, regulation of PEA3 group member expression has been shown to influence the metastatic process, thus suggesting that these factors play a key role in metastasis. ▲

Key words: metastasis, transcription factor, Ets, PEA3

Article reçu le 20 mars 2006,
accepté le 10 juin 2006

Les gènes ets codent une famille des facteurs de transcription d'environ 30 membres. Dans la plupart des cas, ce sont des activateurs transcriptionnels et, dans quelques rares cas, ils agissent comme répresseurs transcriptionnels. Ces facteurs partagent un motif conservé de 85 résidus, le domaine ETS, qui est la signature de la famille et qui est responsable de la liaison à l'ADN sur un site consensus appelé EBS (*Ets-binding site*) [1-3]. Les membres de cette famille sont classés en différents groupes suivant la conservation des différents domaines, principalement au niveau de la séquence du domaine ETS. Les 13 groupes ainsi identifiés sont les suivants : ETS, TEL, YAN, SPI, ERG, PEA3, ELF, DETS4, ELG, GABP, ER71, ERF, et ESE [4].

Le groupe PEA3 se compose de trois membres : Erm/Etv5, Er81/Etv1 et Pea3/E1Af/Etv4, qui partagent, outre le domaine

ETS fortement conservé, deux domaines *trans*-activateurs [5]. Chez l'homme et la souris, les gènes *pea3*, *er81* et *erm* sont répartis sur 13 à 14 exons distribués sur plus 15 kpb d'ADN génomique. Dans le génome humain, *erm* est situé sur le chromosome 3 à la position 3q27-29, *e1af* sur le chromosome 17 à la position 17q21, et *er81* sur le chromosome 7 à la position 7q21. Dans la plupart des cas, les membres du groupe PEA3 sont décrits comme activateurs transcriptionnels [6].

Comme beaucoup de facteurs de transcription, ils subissent des modifications post-traductionnelles qui régulent leur capacité de transactivation. La modification la plus commune retrouvée est la phosphorylation. En effet, ces protéines sont des cibles de la voie des MAPK et de la PKA. Les modifications post-traductionnelles sur les résidus lysines : acétylation, sumoylation et ubiquitinylation, jouent également des rôles cruciaux dans la régulation de la transcription [5].

Chez la souris, ces facteurs sont exprimés dans de nombreux tissus et organes, notamment dans les organes se mettant en place par morphogenèse de branchement comme le poumon, le rein, la glande salivaire. La morphogenèse de branchement correspond à un compartiment épithélial progressant dans un compartiment mésenchymateux en formant une arborescence. Le modèle général d'expression de ces trois gènes lors de la morphogenèse de branchement est le suivant : *erm* est exprimé dans les parties distales des bourgeons épithéliaux, *pea3* dans une région plus restreinte de l'épithélium en croissance, et *er81* dans le mésenchyme adjacent [7-9]. Ce modèle n'est pas limité à la morphogenèse de branchement mais est également retrouvé lors de la conversion du mésenchyme en épithélium (par exemple dans le développement du rein) et pendant le développement du système nerveux.

Rôles dans le processus métastatique

Les métalloprotéases matricielles (MMP) constituent une famille de protéases impliquées dans la dégradation protéolytique de nombreuses protéines de la matrice extracellulaire, mais aussi de protéines non matricielles. Elles jouent un rôle important dans plusieurs étapes de la progression des cellules cancéreuses et leur caractère invasif. De même, les molécules d'adhérence interviennent dans l'architecture de la matrice extracellulaire et facilitent la croissance tumorale, l'invasion et la métastase. Les facteurs du groupe PEA3 ont la capacité d'activer la transcription de gènes codant certaines MMP ou des molécules d'adhérence [10]. Ainsi par exemple, des lignées cellulaires surexprimant ces facteurs présentent un potentiel hautement métastatique qui est souvent corrélé à la forte expression de plusieurs MMP [11-14], tandis que l'inhibition de l'expression de *pea3* réduit l'expression de MMP1 et de MMP9 [15]. Le *tableau 1* résume certaines études cliniques ou expérimentales démontrant la corrélation entre l'expression de membres du groupe PEA3 et celle de molécules facilitant la dérive tumorale.

Dans le tractus oral, *pea3* est fortement exprimé dans des lignées de carcinomes squameux qui présentent un haut potentiel métastatique et expriment des niveaux élevés de MMP1 et de MMP9 [11]. De plus, lorsque dans ces mêmes cellules l'expression de *pea3* est inhibée, l'expression de ces deux MMP est diminuée [15]. Cette expérience est cruciale car elle démontre pour la première fois que la sous-expression de *pea3* endogène induit la régulation transcriptionnelle d'un de ses gènes cibles. Dans ces cellules, l'expres-

sion des MMP induite par *Pea3* est également stimulée par le facteur de croissance des hépatocytes (HGF) [16]. Dans les tumeurs humaines, l'ARNm de *pea3* est détecté par l'hybridation *in situ* dans la majorité des spécimens de cellules de carcinome squameux envahissant, et la plus forte expression de *pea3* est corrélée à la métastase ganglionnaire [13].

Dans les poumons, seul *Pea3* est impliqué dans le processus de cancérisation. Ainsi, dans les cancers de poumon non à petites cellules (NSCLC) qui sont caractérisés par une forte invasion, l'ARNm de *pea3* est retrouvé dans les tumeurs primaires et non dans les tissus normaux environnants. L'expression ectopique de *pea3* dans les cellules de NSCLC augmente *in vitro* la motilité et l'invasion cellulaires [17]. Récemment, le marqueur de métastase 1,4-galactosyltransférase (*GalTI*) a été montré co-exprimé avec *pea3* dans les cellules de cancer de poumon qui présentent un phénotype hautement métastatique [18].

Dans le cancer gastrique, le niveau de l'ARNm de *pea3* et celui de la *matrilysine* (MMP7) sont corrélés à l'invasion tumorale, indiquant un mauvais pronostic pour la survie des patients [19]. Aussi, *MMP7* et *pea3* sont colocalisés au niveau du « front d'invasion » et, quand l'expression de *pea3* endogène est inhibée, l'expression de *MMP7* est nettement diminuée, et les cellules sont moins invasives *in vitro*.

Dans le carcinome hépatocellulaire (HCC), l'interleukine IL8, qui est un facteur angiogénique efficace, est induite par *Pea3* en association avec le facteur de transcription AP1. D'ailleurs, *pea3* et IL8 sont tous les deux exprimés dans les HCC, et non dans les tissus environnants, indiquant ainsi un rôle potentiel de *Pea3* dans la tumorigenèse des hépatocytes induite par l'IL8 [20].

Dans les tumeurs colorectales, plus particulièrement les adénomes prémalins, l'expression de *pea3* est corrélée à la surexpression, non seulement de MMP, mais également des gènes CO2 et iNos codant deux facteurs impliqués dans l'angiogénèse tumorale [21-23].

Dans les adénocarcinomes ovariens, l'expression d'*erm* a été observée [24]. *Pea3* est également impliqué dans les carcinomes ovariens où une forte expression a été observée dans le stroma à proximité des tumeurs de types II et III qui expriment la MMP2 dans les cellules de carcinomes adjacents, illustrant ainsi le dialogue entre ces deux compartiments. L'expression de *pea3* est également corrélée à l'expression des gènes codant la MMP1, l'EMMPRIN (un inducteur de MMP) et des facteurs angiogéniques tels que le bFGF, l'IL8 et certaines intégrines [25, 26].

Tableau 1. Expression des membres du groupe PEA3 dans les cancers humains

Tissu	Membre du groupe PEA3	Références	
		Lignées cellulaires	Etudes cliniques
Tractus oral	<i>Pea3</i>	13, 15, 16	11, 13
Poumon (NSCLC)	<i>Pea3</i>	17, 18	18, 17
Estomac	<i>Pea3</i>	19	19 ^a
Foie	<i>Pea3</i>		20
Côlon	<i>Pea3</i>	21	22, 23
Ovaire	<i>Pea3</i>		25, 26
Sein	<i>Pea3/Erm</i>	12, 42	26, 33, 34, 43
Endomètre	<i>Erm</i>		43

^a Dans cette étude, l'expression d'*er81* et de *erm* n'est corrélée ni à la survie des patients ni à l'expression des MMP (100 cancers gastriques).

Dans le développement de la glande mammaire, le rôle de ces facteurs a fait l'objet ces dernières années de nombreux travaux. Ainsi, chez la souris, les gènes correspondants sont en effet exprimés à différents stades du développement de la glande mammaire [7] et ils y jouent un rôle dans la formation des structures embranchées [27, 28]. Dans les tumeurs mammaires, la première évidence de leur rôle potentiel a été obtenue chez la souris. En effet, *pea3* est surexprimé dans les adénocarcinomes induits par l'oncogène récepteur tyrosine kinase *HER2/neu*, ainsi que dans les métastases [29], phénomène qui a été ensuite décrit pour les gènes *er81* et *erm* [30]. Dans des lignées humaines de cellules de cancer du sein, les trois membres du groupe PEA3 sont fortement exprimés, dans les cellules n'exprimant pas le récepteur aux œstrogènes ; ces cellules présentant d'ailleurs un phénotype agressif lorsqu'elles sont implantées chez des souris immunodéficientes [31]. Parallèlement, ces facteurs sont exprimés dans les cellules qui surexpriment *HER2/neu*. Ainsi, sur une série de 74 patientes ayant un cancer du sein, l'expression de *pea3* est présente dans plus de 90 % de cancers qui expriment *HER2/neu* et dans seulement 50 % de n'expriment pas ce gène [32]. D'ailleurs, l'expression de *pea3* et de *Her2/neu* est corrélée dans les tumeurs invasives [32, 33]. Cependant, des données provocatrices au sujet de l'expression de *pea3* dans des cancers du sein montrent une survie plus favorable quand ce facteur est présent [34]. Cela pourrait être dû, en partie, à l'origine ethnique des patientes. En effet, cette étude a été réalisée chez une population des patientes japonaises. Aussi, dans une étude réalisée en France sur 130 patientes, l'expression de ce facteur a été caractérisée comme marqueur d'agressivité tumorale [33]. Le mécanisme moléculaire par lequel Pea3 régule le gène *HER2/neu* se situe au niveau transcriptionnel. En effet, Pea3 se lie au promoteur d'*HER2/neu* [35] et active un gène rapporteur dirigé par son promoteur [32]. La surexpression de Pea3 augmente également la transcription d'autres gènes qui joueraient aussi un rôle dans la métastase mammaire, tels que *l'ostéopontine* dans les lignes mammaires de cellules de rat [36], les gènes du complexe *Muc4/sialomucine* dans les cellules mammaires normales murines HC11 [37], le gène de la *cyclooxygenase 2* dans les cellules épithéliales mammaires humaines 184B5 et 184B5/HER [38]. L'activation dépendante d'*HER2/neu* cible également *Er81* par la voie Ras-RAF-MAPK, en augmentant l'activité transcriptionnelle de ce facteur sur différents gènes cibles, tels que la *MMP1*, le gène *Smad7* codant l'inhibiteur du TGF β et le gène *hTERT* codant la transcriptase inverse de la télomérase [39-41]. Néanmoins, une étude provocatrice rapporte que Pea3 peut agir sur le promoteur d'*HER2/neu* comme répresseur transcriptionnel dans des lignées mammaires spécifiques de cellules de cancer [42], mais ces résultats semblent être limités aux lignées de cellules testées. Enfin, en ce qui concerne *erm*, il a été démontré que son expression est corrélée à l'invasion et au mauvais pronostic dans le cancer de sein [43] ainsi que dans le carcinome endométrial [44]. Le rôle fonctionnel de ce facteur de transcription dans ces cancers devrait être maintenant examiné plus en détail.

Réarrangements chromosomiques des membres du groupe PEA3 dans certains cancers

Pour être complet sur les rôles des membres du groupe PEA3 dans les cancers humains, mentionnons aussi que, dans

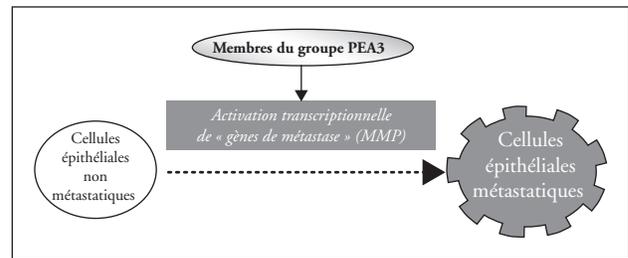


Figure 1. Les membres du groupe PEA3 activent le phénotype métastatique des cellules épithéliales cancéreuses en régulant certains gènes cibles, tels que les MMP.

quelques rares cas de sarcomes d'Ewing chez l'enfant, ces gènes ont été associés à des réarrangements chromosomiques [45, 46] qui conduisent à des protéines chimériques disposant d'un potentiel de transactivation accru vis-à-vis des gènes cibles de la famille Ets.

Enfin, très récemment, *er81* (*etv1*) a été montré, avec un autre membre de la famille Ets, *erg*, comme étant réarrangé dans des cancers prostatiques. Dans ce cas, il s'agit de la fusion d'une part de la région 5' non traduite du gène *TMPRSS2* à d'autre part le gène *er81* ou *erg*. Ainsi, sur 23 des 29 échantillons étudiés, l'expression des gènes *er81* et *erg* est régulée comme celle du gène *TMPRSS2* qui est lui-même sous la dépendance des androgènes. Ces résultats pourraient donc avoir des implications sur le diagnostic et le traitement moléculaires du cancer de la prostate [47].

En conclusion, les membres du groupe PEA3 sont des facteurs de transcription de la famille Ets exerçant un rôle dans divers cancers humains. En particulier, ils régulent l'expression de gènes cibles impliqués dans la métastase, tels que par exemple certaines MMP dans les cancers mammaires (figure 1). ▼

Remerciements. Ce travail fut réalisé grâce aux subventions accordées par le Centre national de la recherche scientifique (France), l'Institut Pasteur de Lille, l'Association pour la recherche contre le cancer (ARC, France), la Ligue nationale contre le cancer (comité Nord, France), le Conseil régional Nord/Pas-de-Calais (France), le Fonds européen de développements régionaux (Feder), le programme Interreg Intergènes, l'Université de Lille 1 (France), l'Université de Lille 2 (France), le Fonds national de la recherche scientifique (FNRS, Belgique) et l'Action de recherche concertée (Communauté française de Belgique, Belgique).

RÉFÉRENCES

- Graves BJ, Petersen JM. Specificity within the ets family of transcription factors. *Adv Cancer Res* 1998 ; 75 : 1-55.
- Sharrocks AD. The ETS-domain transcription factor family. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001 ; 2 : 827-37.
- Lelievre E, Lionneton F, Soncin F. Role des facteurs de transcription ETS dans le contrôle de la spécificité d'expression endothéliale et l'angiogenèse. *Bull Cancer* 2001 ; 88 : 137-42.
- Laudet V, Hanni C, Stehelin D, Duterque-Coquillaud M. Molecular phylogeny of the ETS gene family. *Oncogene* 1999 ; 18 : 1351-9.
- de Launoit Y, Baert JL, Chotteau-Lelievre A, Monte D, Coutte L, Mauen S, et al. The Ets transcription factors of the PEA3 group : transcriptional regulators in metastasis. *BBA Reviews on cancer* 2006 ; in press.

6. de Launoit Y, Chotteau-Lelievre A, Beaudoin C, Coutte L, Netzer S, Brenner C, *et al.* The PEA3 group of ETS-related transcription factors. Role in breast cancer metastasis. *Adv Exp Med Biol* 2000 ; 480 : 107-16.
7. Chotteau-Lelievre A, Desbiens X, Pelczar H, Defossez PA, de Launoit Y. Differential expression patterns of the PEA3 group transcription factors through murine embryonic development. *Oncogene* 1997 ; 15 : 937-52.
8. Chotteau-Lelievre A, Dolle P, Peronne V, Coutte L, de Launoit Y, Desbiens X. Expression patterns of the Ets transcription factors from the PEA3 group during early stages of mouse development. *Mech Dev* 2001 ; 108 : 191-5.
9. Liu Y, Jiang H, Crawford HC, Hogan BL. Role for ETS domain transcription factors Pea3/Erm in mouse lung development. *Dev Biol* 2003 ; 261 : 10-24.
10. Remy L, Bellaton C, Pourreyron C, Anderson W, Pereira A, Dumortier J, *et al.* Integrins et metalloproteinases : une collaboration efficace dans le processus invasif. *Bull Cancer* 1999 ; 86 : 154-8.
11. Shindoh M, Higashino F, Kaya M, Yasuda M, Funaoka K, Hanzawa M, *et al.* Correlated expression of matrix metalloproteinases and ets family transcription factor E1A-F in invasive oral squamous-cell-carcinoma-derived cell lines. *Am J Pathol* 1996 ; 148 : 693-700.
12. Kaya M, Yoshida K, Higashino F, Mitaka T, Ishii S, Fujinaga K. A single ets-related transcription factor, E1AF, confers invasive phenotype on human cancer cells. *Oncogene* 1996 ; 12 : 221-7.
13. Hida K, Shindoh M, Yoshida K, Kudoh A, Furaoka K, Kohgo T, *et al.* Expression of E1AF, an ets-family transcription factor, is correlated with the invasive phenotype of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 1997 ; 33 : 426-30.
14. Habelhah H, Okada F, Kobayashi M, Nakai K, Choi S, Hamada J, *et al.* Increased E1AF expression in mouse fibrosarcoma promotes metastasis through induction of MT1-MMP expression. *Oncogene* 1999 ; 18 : 1771-6.
15. Hida K, Shindoh M, Yasuda M, Hanzawa M, Funaoka K, Kohgo T, *et al.* Antisense E1AF transfection restrains oral cancer invasion by reducing matrix metalloproteinase activities. *Am J Pathol* 1997 ; 150 : 2125-32.
16. Hanzawa M, Shindoh M, Higashino F, Yasuda M, Inoue N, Hida K, *et al.* Hepatocyte growth factor upregulates E1AF that induces oral squamous cell carcinoma cell invasion by activating matrix metalloproteinase genes. *Carcinogenesis* 2000 ; 21 : 1079-85.
17. Hiroumi H, Dosaka-Akita H, Yoshida K, Shindoh M, Ohbuchi T, Fujinaga K, *et al.* Expression of E1AF/PEA3, an Ets-related transcription factor in human non-small-cell lung cancers : its relevance in cell motility and invasion. *Int J Cancer* 2001 ; 93 : 786-91.
18. Zhu X, Jiang J, Shen H, Wang H, Zong H, Li Z, *et al.* Elevated beta1,4-galactosyltransferase I in highly metastatic human lung cancer cells. Identification of E1AF as important transcription activator. *J Biol Chem* 2005 ; 280 : 12503-16.
19. Yamamoto H, Horiuchi S, Adachi Y, Taniguchi H, Noshio K, Min Y, *et al.* Expression of ets-related transcriptional factor E1AF is associated with tumor progression and over-expression of matrilysin in human gastric cancer. *Carcinogenesis* 2004 ; 25 : 325-32.
20. Iguchi A, Kitajima I, Yamakuchi M, Ueno S, Aikou T, Kubo T, *et al.* PEA3 and AP-1 are required for constitutive IL-8 gene expression in hepatoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000 ; 279 : 166-71.
21. Liu Y, Borchert GL, Phang JM. Polyoma enhancer activator 3, an ets transcription factor, mediates the induction of cyclooxygenase-2 by nitric oxide in colorectal cancer cells. *J Biol Chem* 2004 ; 279 : 18694-700.
22. Boedefeld 2nd WM, Soong R, Weiss H, Diasio RB, Urist MM, Bland KI, *et al.* E1A-F is overexpressed early in human colorectal neoplasia and associated with cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-7. *Mol Carcinog* 2005 ; 43 : 13-7.
23. Noshio K, Yoshida M, Yamamoto H, Taniguchi H, Adachi Y, Mikami M, *et al.* Association of Ets-related transcriptional factor E1AF expression with overexpression of matrix metalloproteinases, COX-2 and iNOS in the early stage of colorectal carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2005 ; 26 : 892-9.
24. Monte D, Baert JL, Defossez PA, de Launoit Y, Stehelin D. Molecular cloning and characterization of human ERM, a new member of the Ets family closely related to mouse PEA3 and ER81 transcription factors. *Oncogene* 1994 ; 9 : 1397-406.
25. Davidson B, Goldberg I, Gotlieb WH, Kopolovic J, Ben-Baruch G, Reich R. PEA3 is the second Ets family transcription factor involved in tumor progression in ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003 ; 9 : 1412-9.
26. Davidson B, Goldberg I, Tell L, Vigdorichik S, Baekelandt M, Berner A, *et al.* The clinical role of the PEA3 transcription factor in ovarian and breast carcinoma in effusions. *Clin Exp Metastasis* 2004 ; 21 : 191-9.
27. Chotteau-Lelievre A, Montesano R, Soriano J, Soulie P, Desbiens X, de Launoit Y. PEA3 transcription factors are expressed in tissues undergoing branching morphogenesis and promote formation of duct-like structures by mammary epithelial cells in vitro. *Dev Biol* 2003 ; 259 : 241-57.
28. Kurpios NA, Sabolic NA, Shepherd TG, Fidalgo GM, Hassell JA. Function of PEA3 Ets transcription factors in mammary gland development and oncogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2003 ; 8 : 177-90.
29. Trimble MS, Xin JH, Guy CT, Muller WJ, Hassell JA. PEA3 is overexpressed in mouse metastatic mammary adenocarcinomas. *Oncogene* 1993 ; 8 : 3037-42.
30. Galang CK, Muller WJ, Foos G, Oshima RG, Hauser CA. Changes in the expression of many Ets family transcription factors and of potential target genes in normal mammary tissue and tumors. *J Biol Chem* 2004 ; 279 : 11281-92.
31. Baert JL, Monte D, Musgrove EA, Albagli O, Sutherland RL, de Launoit Y. Expression of the PEA3 group of ETS-related transcription factors in human breast-cancer cells. *Int J Cancer* 1997 ; 70 : 590-7.
32. Benz CC, O'Hagan RC, Richter B, Scott GK, Chang CH, Xiong X, *et al.* HER2/Neu and the Ets transcription activator PEA3 are coordinately upregulated in human breast cancer. *Oncogene* 1997 ; 15 : 1513-25.
33. Bieche I, Tozlu S, Girault I, Onody P, Driouch K, Vidaud M, *et al.* Expression of PEA3/E1AF/ETV4, an Ets-related transcription factor, in breast tumors : positive links to MMP2, NRG1 and CGB expression. *Carcinogenesis* 2004 ; 25 : 405-11.
34. Kinoshita J, Kitamura K, Tanaka S, Sugimachi K, Ishida M, Saeki H. Clinical significance of PEA3 in human breast cancer. *Surgery* 2002 ; 131 : S222-S225.
35. Scott GK, Daniel JC, Xiong X, Maki RA, Kabat D, Benz CC. Binding of an ETS-related protein within the DNase I hypersensitive site of the HER2/neu promoter in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 1994 ; 269 : 19848-58.
36. El-Tanani M, Platt-Higgins A, Rudland PS, Campbell FC. Ets gene PEA3 cooperates with beta-catenin-Lef-1 and c-Jun in regulation of osteopontin transcription. *J Biol Chem* 2004 ; 279 : 20794-806.
37. Perez A, Barco R, Fernandez I, Price-Schiavi SA, Carraway KL. PEA3 transactivates the Muc4/sialomucin complex promoter in mammary epithelial and tumor cells. *J Biol Chem* 2003 ; 278 : 36942-52.
38. Subbaramaiah K, Norton L, Gerald W, Dannenberg AJ. Cyclooxygenase-2 is overexpressed in HER-2/neu-positive breast cancer : evidence for involvement of AP-1 and PEA3. *J Biol Chem* 2002 ; 277 : 18649-57.
39. Bosc DG, Goueli BS, Janknecht R. HER2/Neu-mediated activation of the ETS transcription factor ER81 and its target gene MMP-1. *Oncogene* 2001 ; 20 : 6215-24.

40. Janknecht R. Cell type-specific inhibition of the ETS transcription factor ER81 by mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2. *J Biol Chem* 2001 ; 276 : 41856-61.
41. Goueli BS, Janknecht R. Upregulation of the Catalytic Telomerase Subunit by the Transcription Factor ER81 and Oncogenic HER2/Neu, Ras, or Raf. *Mol Cell Biol* 2004 ; 24 : 25-35.
42. Xing X, Wang SC, Xia W, Zou Y, Shao R, Kwong KY, *et al.* The ets protein PEA3 suppresses HER-2/neu overexpression and inhibits tumorigenesis. *Nat Med* 2000 ; 6 : 189-95.
43. Chotteau-Lelievre A, Revillion F, Lhotellier V, Hornez L, Desbiens X, Cabaret V, *et al.* Prognostic value of ERM gene expression in human primary breast cancers. *Clin Cancer Res* 2004 ; 10 : 7297-303.
44. Planaguma J, Abal M, Gil-Moreno A, Diaz-Fuertes M, Monge M, Garcia A, *et al.* Up-regulation of ERM/ETV5 correlates with the degree of myometrial infiltration in endometrioid endometrial carcinoma. *J Pathol* 2005 ; 207(4) : 422-9.
45. Jeon IS, Davis JN, Braun BS, Sublett JE, Roussel MF, Denny CT, *et al.* A variant Ewing's sarcoma translocation (7 ; 22) fuses the EWS gene to the ETS gene ETV1. *Oncogene* 1995 ; 10 : 1229-34.
46. Kaneko Y, Yoshida K, Handa M, Toyoda Y, Nishihira H, Tanaka Y, *et al.* Fusion of an ETS-family gene, EIAF, to EWS by t (17 ; 22) (q12 ; q12) chromosome translocation in an undifferentiated sarcoma of infancy. *Genes Chromosomes Cancer* 1996 ; 15 : 115-21.
47. Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun XW, *et al.* Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science* 2005 ; 310 : 644-8.

ÉPREUVES

**The E3 Ubiquitin Ligase Complex Component COP1 regulates PEA3
Group Member Stability and Transcriptional Activity**

**Jean-Luc BAERT^{1,*}, Didier MONTE¹, Kathye VERREMAN¹, Cindy DEGERNY¹,
Laurent COUTTE^{1,2} and Yvan de LAUNOIT^{1,*}**

1. UMR 8161, Institut de Biologie de Lille, CNRS / Université de Lille I / Université de Lille II, Institut Pasteur de Lille, IFR 142, BP 447, 1 rue Calmette, 59021 Lille Cedex, France.

2. Laboratoire de Biologie Animale Bâtiment 470, Faculté des Sciences d'Orsay, Université de Paris Sud, 91405 Orsay, France.

Running Title: Regulation of PEA3 group stability and activity by COP1

Keywords: ETS, ERM, transcription factor, Ub-modification, COP1, DET1

* To whom all correspondence should be addressed: Yvan de LAUNOIT or Jean-Luc BAERT

Phone: +33 320 87 11 17 - Fax: +33 320 87 11 11

E-mail: yvan.delaunoy@ibl.fr – jean-luc.baert@ibl.fr

Abstract

In the present study, we report that the PEA3 group members interact with the mammalian RING E3 ubiquitin ligase *constitutive photomorphogenetic 1* (COP1) which mediates ubiquitylation and subsequent proteasome degradation of the p53 and c-Jun transcription factors. This interaction is mediated by the central region of COP1 including the coiled-coil domain and two COP1 interacting consensus motifs localized in the well conserved N-terminal transactivation domain of the PEA3 group members. At the transcriptional level, COP1 reduces the transcriptional activity of ERM and the two other PEA3 group proteins on Ets-responsive reporter genes; this effect being dependent on the RING domain of COP1 and the two COP1 interacting motifs of ERM. Reduced transcriptional activity was however not related to COP1-induced changes in ERM stability. In fact, increased ubiquitylation and subsequent proteasome-mediated degradation of ERM is achieved only when COP1 is expressed with DET1, a key COP1 partner within the ubiquitylation complex. Conversely, we show that the depletion of COP1 or DET1 by siRNA in U2OS cells stabilizes endogenous ERM whereas only COP1 knockdown enhances expression of *ICAM-1*, a gene regulated by this transcription factor. These results indicate that COP1 is a complex regulator of ERM and the two other PEA3 group members.

Introduction

The PEA3 group is composed of three highly conserved Ets transcription factors: ERM, ETV1/ER81, and PEA3 which are often over-expressed in different types of cancers. Experimental regulation of PEA3 group member expression influences the invasive process, suggesting these factors play a key role in metastasis (de Launoit et al., 2006). To regulate their target genes, these transcription factors are subjected to multiple post-translational modifications such as phosphorylation and acetylation (de Launoit et al., 2006). Recently, it has been shown that they can also be post-translationally covalently linked to polypeptides such as ubiquitin (Ub) (Baert et al., 2007; Takahashi et al., 2005) and SUMO (Degerny et al., 2005; Gocke et al., 2005). We thus have shown that SUMO modification of ERM negatively regulates its transcriptional activity without affecting DNA-binding or subcellular localisation (Degerny et al., 2005).

Both Ub and SUMO conjugation pathways comprise three enzymatic activities (Gill, 2005): E1 enzyme allowing activation of Ub or SUMO, E2 enzyme responsible for their conjugation, and ultimately E3 ligase enzymes that favour conjugation by selecting the substrate and increasing the stability of the E2-target protein complex (Di-Bacco and Gill, 2006). Different E3 ligases for Ub have been currently identified and most use either a HECT (homologous to E6-associated protein C terminus) or a RING (really interesting new gene) domain to catalyze polyubiquitylation. The *constitutive photomorphogenetic 1* (COP1) protein which contains a RING finger, a coiled-coil domain and seven WD repeats, functions in higher plants as a E3 ubiquitin ligase that targets transcription factors for ubiquitylation and degradation during the process of photomorphogenesis (Yi and Deng, 2005). In mammals, COP1 mediates ubiquitylation and degradation of three transcription factors: p53, c-Jun (Yi and Deng, 2005) and FoxO1 (Kato et al., 2008). In fact, over-expression of COP1 counteracts p53 activation and subsequent cell-cycle arrest induced by MLF1, an upstream

activator of p53 (Dornan et al., 2004). In the case of c-Jun ubiquitylation, COP1 functions rather as an adaptor protein recruiting the transcription factor to an E3 complex composed by the DET1, DDB1, cullin4A and Roc1 proteins. In this model, COP1 interacts directly with DET1 (Wertz et al., 2004).

Here, we report that COP1 interacts with the PEA3 group members. We have identified functional COP1 binding motifs within the ERM acidic transactivation domain highly conserved among the three PEA3 group members. COP1 decreases the transcriptional ability of the PEA3 group members and, as shown for ERM, without affecting ubiquitylation and stability of the transcription factor. Increased ubiquitylation, proteasome-mediated degradation and further decrease in transcriptional activity occur only in the presence of both COP1 and DET1. Furthermore, we found that COP1 or DET1 knockdown stabilizes endogenous ERM. However, only depletion of COP1 enhances expression of *ICAM-1*, a gene regulated by this transcription factor.

Results

ERM and the PEA3 group members interact with COP1 through two in-tandem conserved motifs. ERM is subjected to ubiquitin modification (Baert et al., 2007), and possesses in its sequence two consensus binding motifs (D/ED/EXXXVPD/E) for the E3 ubiquitin ligase COP1 (Yi and Deng, 2005). To test whether this transcription factor can interact with COP1, we first expressed ERM as a GST-fusion protein and tested the ability of GST-ERM to bind to COP1. Flag-COP1 produced in transfected cells (Fig. 1A, lane 1) was found to bind to GST-ERM (lane 3) but failed to bind to GST alone (lane 2). To confirm this interaction, co-immunoprecipitation experiments were then carried out using cell lysates prepared from COS-7 cells expressing exogenous flag-COP1 and ERM. As shown in figure 1B, the anti-ERM immunoprecipitate contained flag-COP1, while, as control, COP1 was not

detected in the anti-ERM immunoprecipitate of cells expressing flag-COP1 or ERM alone. The reciprocal co-immunoprecipitation experiment using the flag antibody gave similar results (Fig. 1C). This study was extended to the two other PEA3 group members, i.e. ETV1 and PEA3. As shown in Figure 1D, ETV1 and PEA3 co-immunoprecipitated with flag-tagged COP1 as observed for ERM. These results clearly identified COP1 as a binding partner for the PEA3 group members. Finally, to investigate the ERM-COP1 interaction *in vivo*, we used Human osteosarcoma U2OS cells, which express ERM as well as COP1 (Wertz et al., 2004). As shown in Fig. 1E, endogenous COP1 was co-precipitated with ERM but was not observed with the use of preimmune serum in place of ERM serum. This finding is consistent with an *in vivo* interaction between ERM and COP1 and confirms the results obtained with over-expressed proteins.

COP1 possesses three well-characterized domains, i.e. the N-terminal RING domain, the coiled-coil central domain and the WD40 domain (Fig. 2A). To map the domain responsible for the interaction with ERM, co-immunoprecipitation experiments were performed with deletion mutants of COP1. ERM was co-expressed with the flag-tagged full-length COP1 (1-731) or mutants lacking either the WD40 and the coiled-coil domains (R, 1-214) or the WD40 domain alone (Rcc, 1-344, Fig. 2A). Among the three proteins, only the full-length COP1 protein was significantly co-immunoprecipitated with ERM (Fig. 2A, compare lanes 1 to 4), thus suggesting that the WD40 domain is probably necessary for the interaction with ERM. We therefore also co-expressed ERM with this COP1 domain extended (ccWD, 208-731) or not (WD, 401-731) with the coiled-coil domain. Surprisingly, WD was unable to mediate interaction with ERM (Fig. 2A, lane 6). In contrast, anti-ERM antibody efficiently co-precipitated ccWD (lane 5) indicating that only COP1 protein containing the coiled-coil domain extended to AA 400 efficiently associates with ERM. To further examine the role of the coiled-coil domain in the ERM-COP1 interaction, we also

tested the COP1 spliced variant COP1 Δ 24 which lacks part of the coiled-coil protein interaction domain (AA 277-296, Wertz et al., 2004). Only a very weak binding to ERM was observed in co-immunoprecipitation experiments as compared to wild-type COP1 (Fig. 2B). Thus, altogether, these data indicate that the coiled-coil region of COP1 contributes to ERM binding.

We next investigated which domain(s) of ERM is (are) responsible for this interaction. As indicated above, ERM contains two consensus COP1 binding motifs, one upstream of the ETS DNA-binding domain (at position 341) and the other at position 70 within the N-terminal acidic transactivation domain (Fig. 2C, upper panel). To determine whether these consensus motifs are functional for ERM-COP1 interaction, we performed co-immunoprecipitation experiments with deletion mutants of ERM co-expressed in cells with flag-tagged COP1 (Fig. 2C, lower panel). Western blot experiments performed with anti-ERM antibody on immunoprecipitated flag-tagged protein complexes revealed that C-terminal deletion of ERM did not affect the COP1-ERM interaction, even when the second consensus binding motif was removed (ERM₁₋₂₂₆). In contrast, the deletion of the N-terminal domain, which removed the first site (ERM₈₇₋₅₁₀), abolished the interaction with COP1 (Fig. 2C, lower panel). This suggests that the first consensus site at position 70 of ERM is a functional COP1 interacting site. In order to confirm its functionality, the conserved VP residues were mutated into AA residues (ERM M1, Fig. 2D). We thus performed co-immunoprecipitation experiments and showed that mutation of this site decreased ERM-COP1 interaction as compared to wild-type ERM. Since such mutation was found to abolish the interaction of c-Jun with COP1, this result suggested that the N-terminal part of ERM probably contained a second interaction site. Examination of the ERM sequence revealed the presence of a VPD sequence at position 63 which, in contrast to the optimal consensus site at position 70, was not preceded by a stretch of acidic residues. We thus performed mutation of

this site (VP → AA; ERM M2) and showed that it also decreased the interaction with COP1. However, when both sites were mutated (ERM M1/2), interaction with COP1 was totally abolished (Fig. 2D). This clearly indicates that the N-terminal part of ERM contains two functional COP1 interacting sites.

The two functional COP1 interacting sites mapped above are conserved in the two other PEA3 group members (de Launoit et al., 2000). Interestingly, in Humans, alternative splicing of the *er81/etv1* gene leads to the absence of exon 5 (54 bp) which encodes the C-terminus of the transcriptional acidic domain and results in a truncated protein called ER81 whereas the full-length protein is called ETV1 (Coutte et al., 1999). In ER81 protein, both functional COP1 interacting sites are absent (Fig. 2E). To test whether this naturally existing ER81 protein displays different functional properties compared to its non-spliced counterpart ETV1 protein, we performed co-immunoprecipitation experiments as in Figures 1 and 2. Our data indicated that ETV1 and ERM interacted with COP1. In contrast, ER81 was not found to be associated with immunoprecipitated COP1 under the same conditions (Fig. 2E). In conclusion, this result confirms that COP1 binding involves interaction with the C-terminus of the transcriptional acidic domain of PEA3 group members.

COP1 decreased PEA3 group member-induced transcriptional activity. To investigate the effect of COP1 on ERM induced-transcriptional activity, we performed a luciferase reporter gene assay by using ERM and the ICAM-1 luciferase reporter plasmid previously identified as PEA3 group-responsive (de Launoit et al., 1998). As shown in Figure 3A, COP1 had no important effect on the basal ICAM-1 reporter transcription in RK13 cells. However, increasing amounts of COP1 expression vector decreased ERM-induced transcription on this promoter. This effect was not due to decreased ERM levels since increasing amounts of COP1 did not influence the amount of ERM protein in the transfected cells (Fig. 3A, insert).

We also examined the effect of COP1 on the activity of ERM mutants. Although mutations of the first (M1) or the second (M2) COP1 binding motif reduced the COP1-induced decrease of ERM transactivation (-55% for M1 and -75% for M2 vs -85% for the wild-type), the double mutation (M1/2) totally abolished this effect (Fig. 3B) indicating that decreased ERM activity resulted from direct interaction with COP1. Finally, we also tested the effect of COP1 on the transcription of ICAM-1 induced by the other PEA3 group members. Both PEA3- and ETV1-induced transcriptional activities were decreased by COP1, whereas transactivation induced by ER81 was not affected (Fig. 3C, upper panel). This latter activity was however relatively low. Thus, we also performed experiments on c-fes, another Ets-reporter plasmid (de Launoit et al., 1998). As observed with ICAM-1, only ER81 activity was not significantly affected by COP1 on this promoter (Fig. 3E, lower panel). Collectively, these results indicate that COP1 strongly decreases PEA3 group member-dependent transcription through the COP1 interacting motifs.

The effect of different COP1 mutants on ERM activity was also investigated. We found that the COP1 spliced variant COP1 Δ 24 was unable to significantly decrease ERM-induced transcription of the ICAM-1 promoter. Similar results were also obtained with ccWD which, in contrast to COP1 Δ 24, efficiently interacts with ERM, thus suggesting the role of the N-terminal RING domain in the COP1-mediated inhibition of ERM activity (Fig. 3D). To further investigate this role, we also tested a COP1 RING mutant devoid of ubiquitination activity (Bianchi et al., 2003). Interestingly, the RING mutant did not affect ERM transactivation activity, although its expression was similar to wild-type COP1 (Fig. 3D) and still bound to ERM in co-immunoprecipitation assay (see Fig. 5C).

COP1 cooperates with DET1 to regulate ubiquitylation and protein level of the PEA3 group members. It has been recently demonstrated *in vivo* that ERM is subjected to

ubiquitylation followed by degradation (Baert et al., 2007). We thus tested whether the expression of COP1 induced a variation of the ubiquitylation level of ERM. For this purpose, we transiently co-transfected COS-7 cells with vectors encoding ERM and His₆-tagged ubiquitin (Ub); the cells being treated with the proteasome inhibitor ALLN to block degradation of the Ub-modified proteins. Ub-modified proteins were then isolated on nickel agarose (Ni²⁺) and analyzed by Western blotting with anti-ERM antibody. A major ERM species was observed at about 85 kDa in the Ni²⁺-bound protein fraction as a result of Ub overproduction (Fig. 4A). As previously described, it corresponds to a monoubiquitylated form of ERM (Baert et al., 2007). Higher molecular mass species, characteristic of polyubiquitylation (Baert et al., 2007), were also observed (Fig. 4A, compare lanes 1 and 2). In the presence of COP1, a slight increase in monoubiquitylation of ERM was observed, but polyubiquitylation was not enhanced (compare lanes 2 and 3). It thus appears that this Ub ligase did not enhance polyubiquitylation of ERM which agrees with the fact that COP1 did not significantly affect the ERM level in transfected cells (Fig. 3A).

It has been reported that the COP1-interacting protein DET1 promotes ubiquitylation and degradation of c-Jun by assembling a multisubunit Ub ligase containing DDB1, CUL4A, ROC1 on the COP-1/c-Jun complex (Wertz et al., 2004). We thus tested whether expression of DET1 favors ERM ubiquitylation. Using the same approach as above, we showed that the ubiquitylation level of ERM was similar in the presence of COP1 or DET1 alone. However, it was dramatically increased when COP1 and DET1 were co-expressed (Fig. 4B, compare lanes 1 and 2 in one hand with lane 3 in the other hand). In contrast, the ubiquitylation level of ERM mutated on the COP1 interacting sites (ERM M1/2) was almost similar in the presence of COP1, DET1 or both proteins (Fig. 4B, compare lanes 4, 5 and 6).

As co-expression of COP1 and DET1 dramatically increased ERM ubiquitylation, we tested the ERM protein level in the presence of both proteins. As shown in Figure 5A, expression of COP1 or DET1 alone did not change the ERM level. In contrast, when COP1 and DET1 were co-expressed, ERM level dramatically decreased (ERM Wt) whereas it was poorly affected when the COP1 interacting sites were mutated (ERM M1/2) or deleted (ERM Δ Nt). Similarly, when the assay was performed with ccWD or the COP1 RING mutant instead of wild-type COP1, no important changes in ERM level were detected (Fig. 5B). To determine whether the different effects of wild-type COP1 and the two COP1 mutants on ERM levels were related to difference in their capacity to recruit DET1 in ERM complexes, we performed co-immunoprecipitation experiments in transfected cells expressing ERM and DET1 with or without COP1. By co-expressing ERM and Myc-DET1, we were not able to co-immunoprecipitate DET1 with ERM (Fig. 5C, lane 2) suggesting that COP1 is probably the link between ERM and DET1. Accordingly, when COP1 was co-expressed, DET1, as COP1, was associated with ERM (lane 3). However, co-transfection of ccWD or the COP1 RING mutant with ERM and DET1 resulted in the disappearance of DET1 from the ERM complexes (compare lane 3 and 4-5) indicating that in contrast to the wild type protein, these COP1 mutants are unable to recruit DET1 to ERM.

To assess whether ERM stability was affected by COP1/DET1, we examined ERM level in transfected cells treated with the protein synthesis inhibitor cycloheximide in the absence or presence of overexpressed COP1 and DET1. As expected, we observed that COP1/DET1 significantly decreased the half-life of wild type ERM while that of ERM M1/2 was apparently unaffected under the same conditions (Fig. 5D). Transfected cells expressing ERM alone or ERM with both COP1 and DET1 were also treated or not with the proteasome inhibitor ALLN. Clearly, ALLN blocked COP1/DET1-induced ERM degradation (Fig. 5E, left panel). This indicated that expression of COP1 and DET1 results in the downregulation

of ERM at the protein level through a proteasome-mediated pathway. Similar results were obtained for ETV1 (Fig. 5E, middle panel) and PEA3 (not shown). In contrast ER81 level was similar in the absence or presence of COP1/DET1 (Fig. 5E, right panel), which agrees with the fact that ER81 lacks the COP1 interacting motifs. At the transcriptional level, DET1 alone or associated with the ccWD COP1 mutant never affected ERM transcriptional activity on the ICAM-1 promoter. However in combination with COP1, a further decrease in ERM activity was observed as compared to COP1 alone (Fig. 5F). This decrease of about 70% was significantly reduced when the cells were treated with the proteasome inhibitor ALLN (Fig. 5G) suggesting that this effect is probably due to the decreased ERM level observed only in the presence of both COP1 and DET1.

To confirm the functional role of COP1 and DET1 on endogenous ERM, we used siRNA to knockdown their expression. Experiments were performed in U2OS cells and, as shown in figure 6A, COP1 siRNA caused a significant decrease in COP1 mRNA whereas it had no effect on DET1 mRNA. Similarly, DET1 mRNA was the only one reduced upon expression of DET1 siRNA, indicating the specificity of the two siRNA used. Concerning ERM which was hardly detected in these cells, depletion of COP1 by siRNA resulted in a large increase of its protein level, as revealed by Western blot. Similar results were obtained in response to DET1 depletion (Fig. 6A), indicating that COP1 or DET1 knockdown both resulted in ERM stabilization. In these cells, COP1 siRNA also induced an increase in the basal activity of the transfected ICAM-1 reporter plasmid (Fig. 6B). This effect was however not found on the ICAM-1 reporter plasmid mutated on the Ets-binding sites (de Launoit et al., 1998), indicating that it is mediated by an Ets transcription factor. However, in the same assay, DET1 siRNA did not significantly change the activity of the ICAM-1 reporter plasmids used. Finally, to determine whether COP1 knockdown could also affect the expression of the endogenous *ICAM-1* gene, U2OS cells transfected with COP1 or DET1

siRNA have been tested for *ICAM-1* expression by quantitative RT-PCR. As compared with the control cells, up regulated expression of *ICAM-1* was observed in COP1 siRNA treated cells, this expression being only poorly affected in response to DET1 knockdown (Fig. 6C). These results thus strongly suggest that most of the observed ICAM-1 activation resulted from COP1 depletion rather than from increased ERM level in the cells.

Discussion

So far, three COP1 substrates have been identified among mammalian transcription factors: c-Jun, the mammalian homologue of the plant bZIP transcription factor HY5, p53 and FoxO1 (Yi and Deng, 2005; Kato et al., 2008). In the present study, we establish that ERM is a substrate for this ligase and that the coiled-coil region of COP1 is required for efficient binding to ERM. COP1 interacts through its WD40 repeats with HY5 and other transcription factors in plant and c-Jun, JunD and FoxO1 in mammals (Yi and Deng, 2005; Kato et al., 2008). However, the coiled-coil domain has not been implicated in these interactions. For c-jun, an additional binding site has nevertheless been described in this region (Bianchi et al., 2003) but, in contrast to ERM, deletion of this domain does not significantly alter the interaction of COP1 with c-jun (Wertz et al., 2004; Bianchi et al., 2003). In fact, the coiled-coil domain of atCOP1 and huCOP1 has been involved in COP1 homodimerization (Yi and Deng, 2005). Interestingly, the N-terminal TAD of ERM was found to contain two functional COP1 interacting motifs with the core sequence VPD/E shared by plant bZIP family COP1 substrates (Holm et al., 2001). It remains to determine whether the presence of two interacting sites might be related to the reported capacity of COP1 to dimerize. Indeed, two COP1 binding sites might favor and stabilize the interaction of ERM with a COP1 homodimer.

The transcriptional activity of the three PEA3 group transcription factors was similarly reduced by COP1 expression. As shown for ERM, this inhibition requires the presence of functional COP1 binding sites but is unrelated to increased ubiquitylation, change in ERM protein levels or COP1-induced change in ERM localization as judged from the results of immunofluorescence studies (data not shown). These data are in good agreement with those obtained on c-Jun transcriptional activity which is down-regulated in the presence of COP1 on AP1-responsive promoters (Bianchi et al., 2003). We also found that activity of the ERM N-terminal TAD fused to Gal4 DBD is dramatically decreased in the presence of COP1, suggesting that the COP1-induced effect is independent of the ETS DNA-binding domain (data not shown). Concerning COP1, its ability to decrease ERM-mediated transactivation clearly depends on the presence of an intact RING domain since its deletion or its mutation leading to an E3 ligase defective COP1 mutant abrogates COP1 suppressive activity on transcription without marked change in ERM binding. It is thus unlikely that COP1, via its RING domain, affects the capacity of the TAD to interact with components necessary for transcriptional activation. A possibility is that, in a context of over-expression, COP1 acts as a transcriptional co-repressor. Such mechanism would be reminiscent of that described for some SUMO E3 ligases of the PIAS family which can exert SUMO ligase-independent functions in transcriptional regulation (Sharrocks, 2006). Moreover, since the RING finger has been implicated in mediating the interaction of atCOP1 with other proteins (Yi and Deng, 2005), it might be that this COP1 domain could recruit proteins involved in transcriptional repression. However that may be, the COP1 E3 ligase activity is probably necessary to mediate the COP1 effect and since the RING of huCOP1 has ubiquitylating activity toward COP1 itself (Bianchi et al., 2003), this raises the possibility that ubiquitylation of COP1 may be involved in the transcriptional repression process.

huCOP1 has an intrinsic E3 Ub ligase activity which is sufficient for the ubiquitylation and subsequent degradation of p53 (Dornan et al., 2004). In contrast, as described for c-Jun (Bianchi et al., 2003), this ligase activity does not promote polyubiquitylation of the PEA3 group members. Concerning c-Jun, it has been suggested that COP1 acts by recruiting a multisubunit E3 complex containing DET1, DDB1, Cul4A and Roc1, through direct interaction with DET1 (Wertz et al., 2004). Accordingly, we show here that, in contrast to the expression of COP1, co-expression of COP1 and DET1 promotes ubiquitylation and proteasome-mediated degradation of ERM. This enhanced degradation observed for the three PEA group members requires the presence of the COP1 binding motifs and is counteracted by the down regulation of COP1 or DET1 through siRNA, as shown for endogenous ERM in U2OS cells. Since DET1 is not recognized by ERM, it is likely that COP1 and DET1 form a heterodimer serving as a bridge to link the COP1 interacting substrate to an Ub ligase complex in a DET1-dependent manner. It can however not be excluded that the binding of DET1 to COP1 might enhance the intrinsic activity of COP1 and promote ubiquitylation of COP1-bound ERM.

We show that in addition to increased ERM levels, knocking down COP1 but not DET1 in U2OS cells results in a significant up regulation of endogenous *ICAM-1* gene. This finding and those obtained on the ICAM-1 promoter are consistent with a model whereby COP1 may target ERM to negatively regulate its transcriptional activity in a physiologic context. We thus suggest that the balance between COP1 and DET1 may determine the level of transcriptional activity of ERM and its intracellular concentration. This model can be extended to the two other PEA3 group members ETV1 and PEA3 but not to ER81, a spliced variant of ETV1 lacking a short region containing the COP1 binding sites (Coutte et al., 1999). Indeed, as expected, neither ER81-induced transactivation, nor ER81 protein stability

was significantly affected by COP1 or COP1-DET1. The regulation by COP1 is thus the first functional difference observed between the two isoforms of the product of the *etv1* gene.

The mechanisms by which the Ets transcription factors are regulated by ubiquitylation are currently not described. However, it has recently been shown that the rapid turnover in S phase of the short-lived Ets protein MEF is dependent on the phosphorylation of its C-terminal domain and on the Skp1/Cul1/F-box (SCF) E3 ubiquitin ligase complex, which targets MEF for ubiquitylation and degradation (Liu et al., 2006). The PEA3 group members are also phosphorylated and it would be interesting to determine whether such modification modulates the association of these transcription factors with COP1. Moreover, in the absence of DET1-mediated degradation, COP1 binding could also inhibit activating modifications such as phosphorylation or acetylation (de Launoit et al., 2006) or positively affect sumoylation which inhibits PEA3 group member activity (Degerny et al., 2005). Further studies are now required to elucidate how COP1 regulates ERM transcriptional activity and turnover.

Materials and Methods

Portion of the Materials and Methods is presented as Supplementary information, including plasmid constructs and RT-PCR

Cell cultures and transfections. RK13, COS-7 and U2OS cells were cultured in DMEM supplemented with 10% FCS (Gibco BRL). 1.5×10^5 cells/well were plated in 12-well plates, and the next day transfections were performed using the PEI Exgen 500 procedure (Euromedex, France) with 250 ng total DNA per well, including 25-100 ng reporter plasmid, 10 ng pSG5 or 25 ng pGAP expression vector, and 10 ng β -galactosidase expression vector. Activity was determined as previously described (Degerny et al., 2005). For protein stability

and co-immunoprecipitation experiments, cells were transfected in 6-well plates with 300 ng of PEA3 group expression plasmid and, when indicated, with 200 ng of COP1 and/or DET1 plasmids. SMART pools (Dharmacon) were used to knockdown COP1 and DET1 in the cells. SiRNA were transfected with Interferin (Polyplus-transfection) according manufacturer protocol.

Immunoprecipitation and Western blot analyses. Transfected cells were lysed in co-immunoprecipitation buffer (50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 125 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 0.5% Triton X100). Proteins were immunoprecipitated overnight with the anti-FLAG M2 affinity gel (Sigma) at 4°C or with anti-ERM antibody (anti-ERM₃₅₅₋₅₁₀) followed by incubation with protein A-Sepharose beads for 1 h at 4°C. Immunoblot analyzes were performed with the rabbit anti-ERM₁₂₋₂₂₆ (Baert et al., 1997), anti-flag (Sigma), anti-myc (Invitrogen), anti-ETV1, anti-Gal4, or anti-Actin antibody (Santa Cruz Biotechnology). Co-immunoprecipitation in U2OS cells was performed as described above with anti-ERM antibody. Detection of immunoblotted target bands was performed with anti-ERM₁₂₋₂₂₆ and anti-COP1 (Bethyl) antibody.

RT-PCR. RNA was isolated from control, COP1- and DET1-downregulated U2OS cells using TRI Reagent (Molecular Research Center, Inc) and cDNA was synthesized using High Archive cDNA kit (Applied Biosystems). Quantitative PCR was performed using the brilliant SYBRgreen qPCR master mix (Stratagene) on a MX3005P instrument as described by the provider.

Identification of His-Ub-ERM conjugates. COS-7 cells were transfected with 250 ng/well (6-well plates) of ERM expression plasmid and, when indicated, with 700 ng plasmid coding for His-tagged-Ub and 150 ng of flag-COP1 and Myc-DET1 constructs. After treatment with 50 μM ALLN for 6 h, the cells were lysed in denaturing buffer containing 6M guanidium-HCl. His₆-Ub conjugates were purified by Metal-Chelate Affinity Chromatography as

described previously (Baert et al., 2007). The proteins were subjected to immunoblotting as described above.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

This work was carried out thanks to grants awarded by the « Ligue Nationale Contre le Cancer » (Comité Nord, France), the « Conseil Régional Nord/Pas-de-Calais » (France) and the European Regional Development Fund (Intergenes program). We thank E. Bianchi and VM Dixit for kind gifts of plasmids.

References

- Baert JL, Beaudoin C, Monté D, Degerny C, Mauen S, de Launoit Y. (2007). The 26S proteasome system degrades the ERM transcription factor and regulates its transcription-enhancing activity. *Oncogene* **26**: 415-424.
- Baert JL, Monte D, Musgrove EA, Albagli O, Sutherland RL, de Launoit Y. (1997). Expression of the PEA3 group of ETS-related transcription factors in human breast-cancer cells. *Int J Cancer* **70**: 590-597.
- Bianchi E, Denti S, Catena R, Rossetti G, Polo S, Gasparian S et al. (2003). Characterization of human constitutive photomorphogenesis protein 1, a RING finger ubiquitin ligase that interacts with Jun transcription factors and modulates their transcriptional activity. *J. Biol. Chem.* **278**: 19682-91690.

Coutte L, Monte D, Imai K, Pouilly L, Dewitte F, Vidaud M et al. (1999). Characterization of the human and mouse ETV1/ER81 transcription factor genes: role of the two alternatively spliced isoforms in the human. *Oncogene* **18**: 6278-6286.

de Launoit Y, Audette M, Pelczar H, Plaza S, Baert JL. (1998). The transcription of the intercellular adhesion molecule-1 is regulated by Ets transcription factors. *Oncogene* **16**: 2065-2073.

de Launoit Y, Baert JL, Chotteau Lelièvre A, Monte D, Coutte L, Mauen S. et al. (2006). The Ets Transcription Factors of the PEA3 Group : Transcriptional Regulators in Metastasis *Biochim. Biophys. Acta* **1766**: 79-87.

de Launoit Y, Chotteau-Lelievre A, Beaudoin C, Coutte L, Netzer S, Brenner C et al. (2000). The PEA3 group of ETS-related transcription factors. Role in breast cancer metastasis. *Adv. Exp. Med. Biol.* **480**: 107-16.

Defosse PA., Baert JL, Monnot M, de Launoit Y. (1997). The ETS family member ERM contains an alpha-helical acidic activation domain that contacts TAFII60. *Nucleic Acids Res.* **25**:4455-4463.

Degerny C, Monté D, Beaudoin C, Jaffray E, Portois L, Hay RT et al. (2005). SUMO modification of the Ets-related Transcription Factor ERM inhibits its transcriptional activity. *J. Biol. Chem.* **280**: 24330-24338.

Di-Bacco A, Gill G. (2006). SUMO-specific proteases and the cell cycle. An essential role for SENP5 in cell proliferation. *Cell cycle* **5**: 2310-2313.

Dornan D, Wertz I, Shimizu H, Arnott D, Frantz GD, Dowd P. et al. (2004). The ubiquitin ligase COP1 is a critical negative regulator of p53. *Nature* **429**: 86-92.

Gill G. (2005). Something about SUMO inhibits transcription. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **15**: 536-541.

- Gocke CB, Yu H, Kang J. (2005). Systematic identification and analysis of mammalian small ubiquitin-like modifier substrates. *J. Biol. Chem.* **280**: 5004-5012.
- Holm M, Hardtke CS, Gaudet R, Deng XW. (2001). Identification of a structural motif that confers specific interaction with the WD40 repeat domain of Arabidopsis COP1. *EMBO J.* **20**: 118-127.
- Kato S, Ding J, Pisek E, Jhala US, Du K. (2008). COP1 functions as a FoxO1 ubiquitin E3 ligase to regulate FoxO1-mediated gene expression. *J. Biol. Chem.* **283**: 35464-35473.
- Liu Y, Hedvat CV, Mao S, Zhu XH, Yao J, Nguyen H et al. (2006). The ETS protein MEF is regulated by phosphorylation-dependent proteolysis via the protein-ubiquitin ligase SCFSkp2. *Mol. Cell. Biol.* **26**: 3114-3123.
- Sharrocks AD. (2006). PIAS proteins and transcriptional regulation-more than just SUMO E3 ligases? *Genes Dev.* **20**: 754-758.
- Takahashi A, Higashino F, Aoyagi M, Yoshida K, Itoh M, Kobayashi M et al. (2005). E1AF degradation by a ubiquitin-proteasome pathway. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **327**: 575-580.
- Wertz IE, O'Rourke KM, Zhang Z, Dornan D, Arnott D, Deshaies RJ, Dixit VM. (2004). Human De-etiolated-1 regulates c-Jun by assembling a CUL4A ubiquitin ligase. *Science* **303**: 1371-1374.
- Yi C, Deng XW. (2005). COP1 - from plant photomorphogenesis to mammalian tumorigenesis. *Trends Cell. Biol.* **15**: 618-625.

Figure Legends

Figure 1. ERM and the two other PEA3 group members interact with COP1. **(A)** ERM interacts with COP1 *in vitro*. Cellular extract of COS-7 cells transfected with flag-COP1 (lane 1) was incubated with GST (lane 2) or GST-ERM (lane 3) and COP1 was detected by anti-flag immunoblotting. * denotes a nonspecific band. 5% of cellular extract involved in affinity reaction is used as Input **(B-C)** ERM interacts with COP1 in transfected cells. COS-7 cells were transfected with flag-COP1, ERM or both, immunoprecipitated with anti-ERM antibody (B) or anti-flag antibody (C) and immunoblotted as indicated. **(D)** The three PEA3 group members interact with COP1. COS-7 cells were transfected with ERM, ETV1 or PEA3 with or without flag-COP1, immunoprecipitated with anti-flag antibody and immunoblotted as indicated. Anti-ERM antibody cross-reacts with ETV1 and PEA3 (3). **(E)** Co-immunoprecipitation of ERM and COP1 from U2OS cells. Immunoprecipitation was performed with anti-ERM antibody or preimmune serum (Pre) and proteins were immunoblotted as indicated using antibodies specific for ERM and COP1.

Figure 2. Mapping of the interacting motifs in ERM and COP1 **(A)** Schematic representation of COP1 and the deletion mutants used in co-immunoprecipitation experiments. R: RING finger domain, cc: coiled-coil domain, WD: WD40 domain. COS-7 cells were transfected with flag-ERM and either flag-COP1, flag-RING, flag-RINGcc, flag-WD40 or flag-ccWD40 (ccWD) and the cellular extracts were immunoprecipitated with anti-ERM antibody (IP ERM) and immunoblotted with anti-flag (IB Flag) and anti-ERM (IB ERM) antibody. Aliquots of the same extracts were analyzed by immunoblotting with the same antibodies to detect exogenous proteins (INPUT). * denotes a nonspecific band. **(B)** COS-7 cells were transfected with flag-ERM and either flag-COP1 or flag-COP1 Δ 24, a splice variant lacking part of the coiled-coil domain, and the cellular extracts were immunoprecipitated with anti-ERM antibody (IP ERM) and immunoblotted with anti-flag (IB Flag) and anti-ERM (IB

ERM) antibody. Aliquots of the same extracts were analyzed by immunoblotting with the same antibodies to detect exogenous proteins (INPUT). **(C)** COS-7 cells were transfected with flag-COP1 and either full-length ERM or the deletion mutants illustrated in the upper panel (1 and 2 indicate the location of the two consensus COP1 interacting motifs). The cellular extracts were immunoprecipitated with anti-flag antibody and immunoblotted as indicated. **(D)** COS-7 cells were transfected with flag-COP1 and flag-ERM either wild-type (Wt) or mutated (M) as illustrated in the upper panel. The cellular extracts were immunoprecipitated with anti-ERM antibody (IP ERM) or not (INPUT) and immunoblotted as indicated. * denotes a nonspecific band. **(E)** COS-7 cells were transfected with flag-COP1 and either ERM, ETV1 or ER81, an ETV1 isoform spliced as illustrated in the upper panel. The cellular extracts were immunoprecipitated with anti-flag antibody (IP flag) or not (INPUT) and immunoblotted as indicated. Anti-ETV1 antibody cross-reacts with ERM.

Figure 3. COP1 regulates ERM transcriptional function. **(A)** RK13 cells were transfected with ERM and an increasing quantity of COP1 together with ICAM-1-Luc reporter. Insert: ERM was transfected with or without COP1 in RK13 cells and the protein levels were assessed by immunoblotting as indicated. **(B)** RK13 cells were transfected with the ICAM-1-Luc reporter, ERM either wild-type or mutated on the COP1 interacting motifs as described in figure 2D or empty vector (-) and COP1 as indicated. **(C)** RK13 cells were transfected with either ICAM-1-Luc reporter or c-fes-Luc reporter, ERM, PEA3, ETV1, ER81 or empty vector (-) and COP1 as indicated. **(D)** RK13 cells were transfected with the ICAM-1-Luc reporter, ERM and either flag-COP1, flag-ccWD40, flag-COP1 Δ 24 or flag-COP1Rmut expressing COP1 which carries two Cys to Ala substitutions in the RING domain. The protein levels were assessed by immunoblotting as indicated.

Figure 4. COP1 mediates augmented ubiquitylation of ERM only in the presence of DET1. **(A)** COS-7 cells were transfected with ERM, His-tagged ubiquitin (His-Ub) and flag-COP1 in the indicated combinations. ALLN-treated cells were lysed, ubiquitin-modified proteins were purified by Nickel affinity chromatography (Ni^{2+} purification) and ubiquitin-modified ERM was detected by immunoblotting using anti-ERM antibody. The expression of ERM and COP1 in cell lysate was detected by immunoblotting as indicated. The arrow indicates the position of the monoubiquitylated form of ERM. * denotes a nonspecific band. **(B)** COS-7 cells were transfected with ERM wild-type or M1/2 mutant and His-tagged ubiquitin together with flag-COP1 and/or Myc-DET1. ALLN-treated cells were lysed and cell lysates and purified ubiquitin-modified proteins were analyzed by immunoblotting as indicated.

Figure 5. In the presence of DET1, COP1 destabilizes ERM and further inhibits its activity. **(A)** wild-type ERM, ERM M1/2 mutant or the deletion mutant ERM₈₇₋₅₁₀ (ERM ΔNt) were expressed in COS-7 cells with flag-COP1 and/or Myc-DET1 as indicated. ERM, COP1 and DET1 and endogenous actin were detected by immunoblotting with the specific antibodies. Expression levels of COP1, DET1 and actin were determined in the cells cotransfected with wild-type ERM and were similar in the cells cotransfected with the mutated forms of the protein. **(B)** ERM was expressed with Myc-DET1 and either flag-COP1, flag-ccWD40 or flag-COP1Rmut (Rm) as indicated and proteins were analyzed as in (A). **(C)** ERM, Myc-DET1 and either flag-COP1, flag-ccWD40 or flag-COP1Rmut (Rm) were expressed as indicated. The proteins in the cell lysates (INPUT) and immunoprecipitated with anti-ERM antibody (IP ERM) were analyzed by immunoblotting as in (A). **(D)** RK13 cells were transfected with ERM either wild-type or mutated on the two COP1 interacting motifs (M1/2) in the absence (control) and presence of COP1 and DET1 and 20h later were treated with cycloheximide (CHX) for the indicated times. The expression of ERM and actin was

analyzed by immunoblotting. (E) ERM was expressed in cells either alone or with COP1 and DET1. 6h before cell lysis, transfected cells were treated with the proteasome inhibitor ALLN or not (-). ERM and actin were detected by immunoblotting with their respective specific antibodies. The same experiments were also performed with ETV1 and ER81 in place of ERM. (F) RK13 cells were transfected with the ICAM-1-Luc reporter together with ERM, DET1 and either COP1 or the C-terminal COP1 deletion mutant ccWD in the indicated combinations. (G) RK13 cells were transfected with the ICAM-Luc reporter together with ERM-COP1 and ERM-COP1-DET1. 18h before cell lysis, transfected cells were treated with the proteasome inhibitor ALLN (10 to 40 μ M) or not (-).

Figure 6. Consequences of endogenous COP1 and DET1 knockdown in U2OS cells. (A) U2OS cells were transfected with control siRNA (ctrl) or siRNA directed against COP1 (siCOP) or DET1 (siDET). COP1 and DET1 mRNA expression was determined by quantitative RT-PCRs and was set as 1 in control cells. ERM and actin levels were determined by immunoblot analysis using specific antibodies as indicated. (B) U2OS cells were transfected as above with the ICAM-1-Luc reporter either wild-type (ICAM wt) or mutated on the ETS binding sites (ICAM mut). (C) COP1 siRNA (siCOP), DET1 siRNA (siDET) and control (ctrl) U2OS cells described in (A) were used to determine the relative mRNA expression levels of *ICAM-1* assessed by quantitative RT-PCR. Results are expressed as ratios of mRNA levels of *ICAM-1* to *GAPDH* (endogenous control standard) (*, $p < 0.01$; ANOVA, n=4).

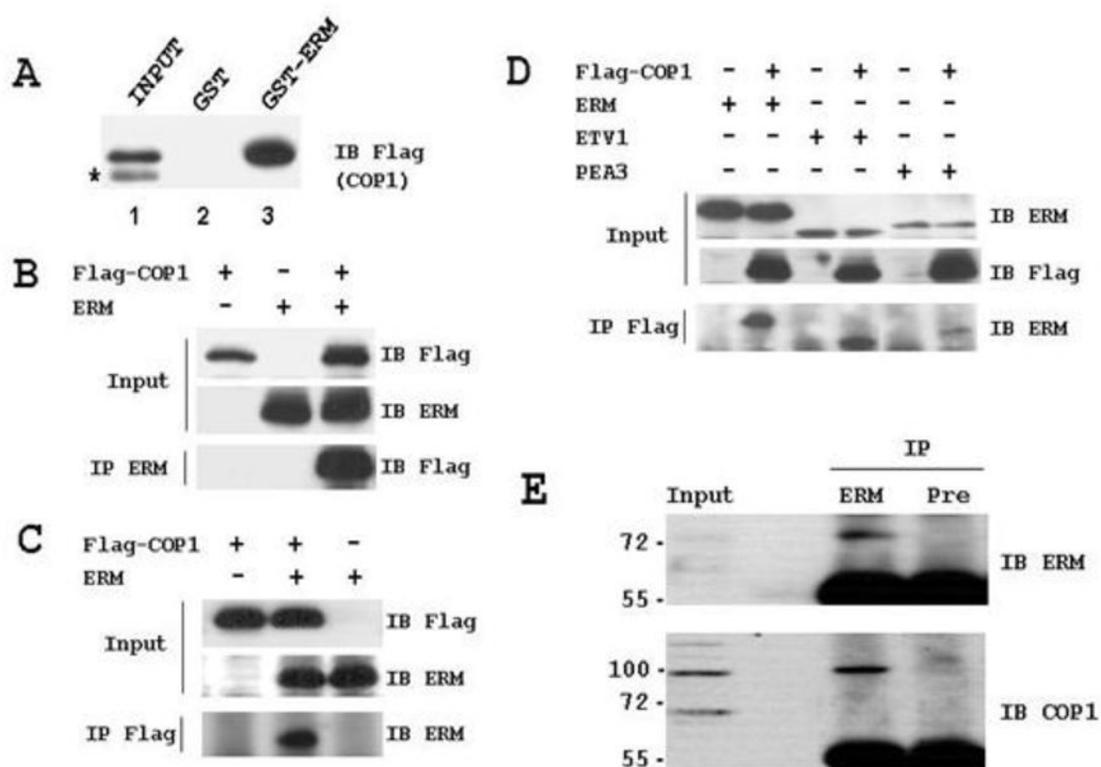


Figure 1

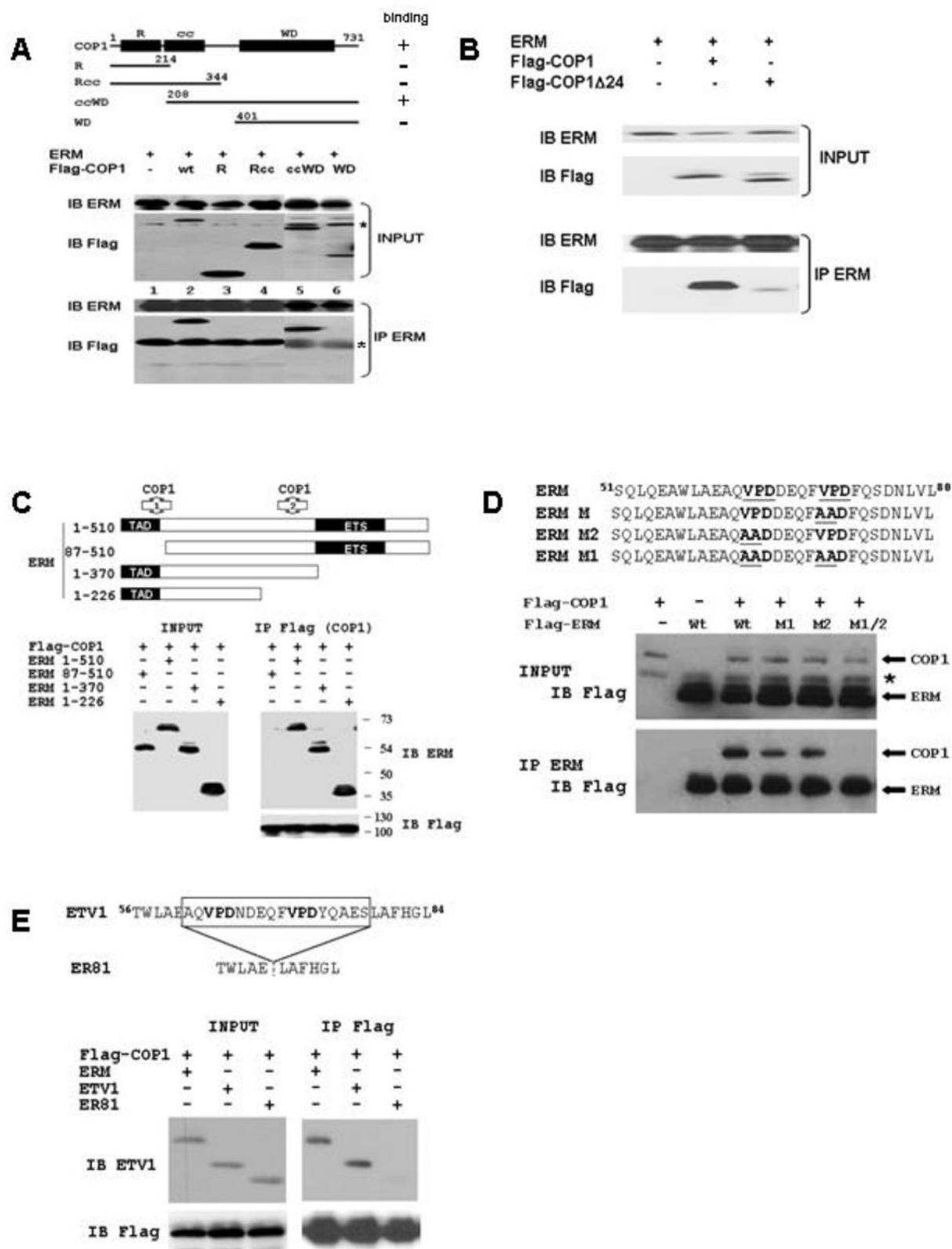


Figure 2

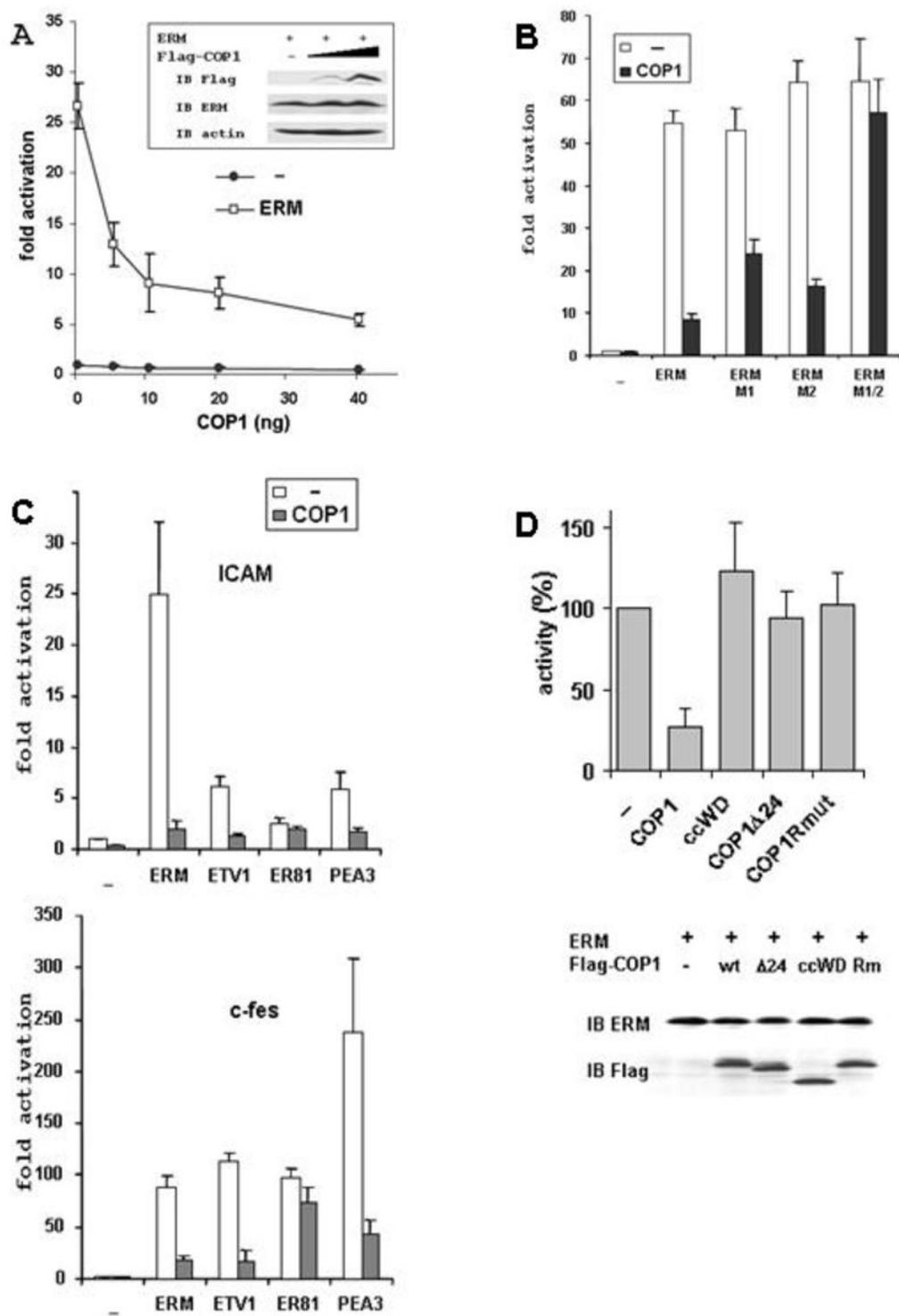


Figure 3

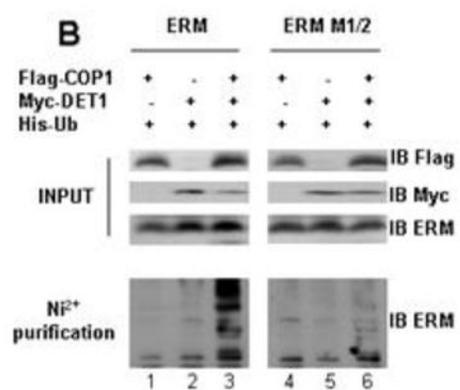
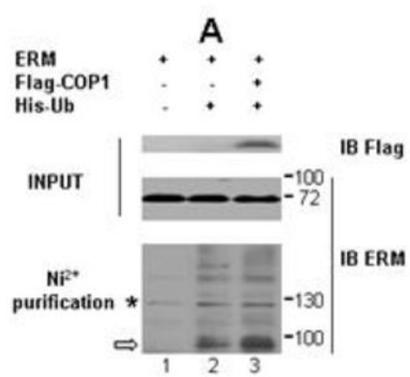


Figure 4

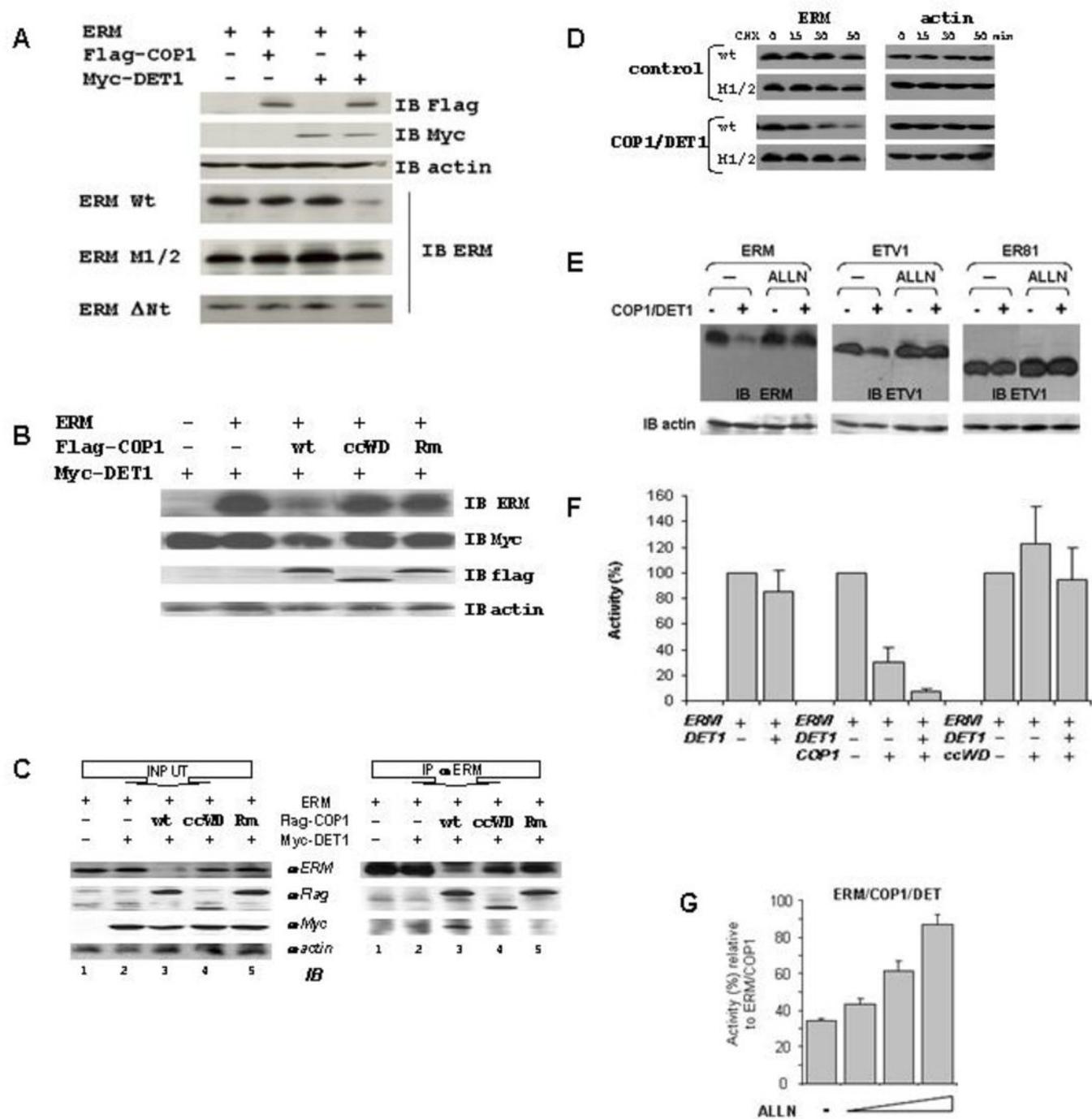


Figure 5

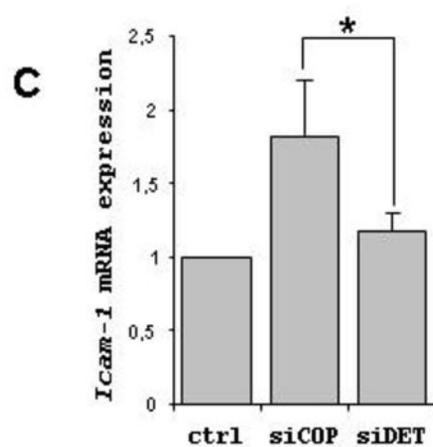
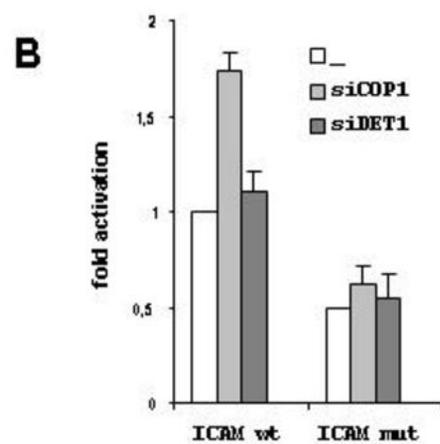
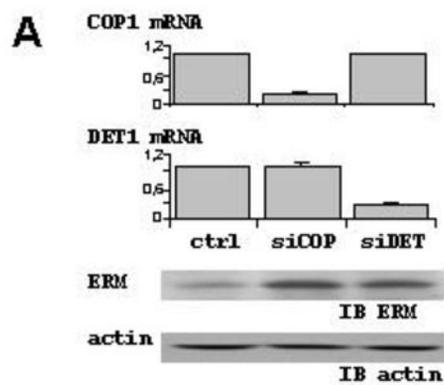


Figure 6