

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE
LILLE

50 376
1995
153

THÈSE

présentée pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

par

Serge PLAZA

ÉTUDE DE LA RÉGULATION TRANSCRIPTIONNELLE
DU GÈNE *PAX-QNR/PAX6*, UN GÈNE ESSENTIEL POUR
LA FORMATION DES YEUX



Soutenance le 26 avril 1995 devant la commission d'examen

Président : Pr Jean-Pierre BOHIN
Rapporteurs : Dr Jacqueline DESCHAMPS
Dr Jean-Marie BLANCHARD
Examineurs : Pr Xavier DESBIENS
Dr Simon SAULE

SCD LILLE 1



D 030 301567 4

REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier Dominique Stéhelin et Jean Rommelaere d'avoir cru en mes capacités et de m'avoir encouragé lorsque j'ai pris la décision de reprendre mes études pour entamer une carrière de chercheur.

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé dans le laboratoire de Différenciation Cellulaire et Moléculaire dirigé par Simon Saule. Je le remercie sincèrement non seulement de m'avoir accueilli dans son groupe, mais aussi et surtout pour la confiance qu'il m'a accordée et les conseils qu'il m'a prodigués au cours de ce travail.

Je remercie Madame Jacqueline Deschamps ainsi que Messieurs Jean-Pierre Bohin, Jean-Marie Blanchard et Xavier Desbiens d'avoir accepté de juger ce travail.

Ce mémoire relate le travail d'un groupe, je voudrais donc remercier les membres du laboratoire avec qui j'ai eu plaisir à travailler. Je remercie particulièrement Christine Dozier, sans l'aide de qui cette étude n'aurait pu être réalisée, Manuella Bailly pour ses compétences en mutagenèse dirigée, Nathalie Turque la "pro" de l'hybridation *in situ*, Catherine Carrière complice des protéines Pax-QNR et Marie-Claire Langlois. Enfin, je remercie Marc Aumercier pour son soutien et encouragements ainsi que pour ses corrections minutieuses de ce manuscrit.

Merci à tous les membres de l'URA 1160 qui ont pu m'apporter à un moment ou un autre leur aide, notamment à Nicole Devassine et Marie-Christine Bouchez pour leurs aides et conseils gentiment prodigués aux membres de l'EP 56, à Daniel Lazarecki pour son travail remarquable dans la réalisation des photographies, Agnès Bègue pour son aide dans les clonages et phages récalcitrants, Christian Lagrou qui m'a initié aux secrets de la préparation des QEC, et Thierry Dupressoir pour sa disponibilité pour résoudre les problèmes d'informatique.

Je remercie également Françoise Bonet pour son aide plus que précieuse dans la dactylographie de ce mémoire. J'ai d'ailleurs découvert que les ordinateurs pouvaient permettre de gagner du temps plutôt que d'en perdre !

L'accomplissement de ce travail n'aurait pas été possible sans l'aide financière accordée par le Ministère de la Recherche et de l'enseignement.

LISTE DES PUBLICATIONS

- 1 - Plaza S., A. Boullard, D. Pelé, J. Cornélis, J. Rommelaere, P. Giacomoni and M. Prunieras. Unscheduled DNA synthesis : a quantitative indicator of residual immunodetectable pyrimidine dimers in human fibroblasts after ultraviolet-B irradiation. 1991.
Photochemistry and Photobiology, 53 : 217-227.
- 2 - Koering C., T. Dupressoir, S. Plaza, D. Stéhelin and J. Rommelaere. Induced production of the conditionally cytotoxic Herpes Simplex virus *thymidine kinase* by means of parvoviral regulatory circuit. 1994.
Human Gene Therapy, 5 : 457-463.
- 3 - Z. Gu, S. Plaza, M. Perros, C. Cziepluch, J. Rommelaere and J.J. Cornelis. NF-Y controls transcription of the minute virus of mice P4 promoter through interaction with an unusual binding site. 1995.
J.Virol., 69 : 239-246
- 4 - Duterque-Coquillaud M., C. Niel, S. Plaza and D. Stéhelin. New Human erg isoforms generated by alternative splicing are transcriptional activators. 1993.
Oncogene, 8 : 1865-1873.
- 5 - Ansieau S., S. Plaza, E. Ferreira, C. Dozier and D. Stéhelin. Identification and analysis of the c-mil promoter : possible involvement of Sp1 and Ets related proteins in its regulation. 1993.
Genomics, 18 : 537-545.
- 6 - Garrido C., S. Plaza, D. Gospodarowicz and S. Saule. Fos protein family is involved in bFGF-induced growth inhibition of tumorigenic neuroretina cells. 1993.
Oncogene, 8 : 2713-2719.
- 7 - Carrière C., S. Plaza, P. Martin, B. Quatannens, D. Stéhelin and S. Saule. Characterization of Pax-QNR proteins expressed in the neuroretina. 1993.
Molecular and Cellular Biology, 13 : 7257-7266.
- 8 - Plaza S., C. Dozier and S. Saule. Quail Pax-6 (Pax-QNR) encodes a transcription factor able to bind and transactivate its own promoter. 1993.
Cell Growth and Differentiation, 4 : 1041-1050.
- 9 - Turque N., S. Plaza, F. Radvanyi, C. Carrière and S. Saule. Pax-QNR/Pax-6 a paired box- and homeobox- containing gene expressed in neurons is also expressed in pancreatic endocrine cells. 1994.
Molecular Endocrinology, 8 : 929-938.
- 10 - S.Plaza, D. Grévin, K. Mac Leod, D.Stéhelin and S. Saule. Pax-QNR/Pax-6, a paired box- and homeobox- containing protein, recognizes ets-binding sites and can alter the transactivating properties of ets transcription factors. 1994
Gene expression, 4 : 43-52.
- 11 - S.Plaza, N. Turque, C. Dozier, M. Bailly and S. Saule. C-Myb acts as transcriptional activator of the quail *Pax-6 (Pax-QNR)* promoter through two different mechanisms. 1995
Oncogene, 10 : 329-340.
- 12 - S.Plaza, C.Dozier, M.C.Langlois and S.Saule. Identification and characterization of a neuroretina- specific enhancer element in the quail *Pax-6 (Pax-QNR)* gene. 1995
Molecular and Cellular Biology, 2 : 892-903.
- 13 - S. Plaza, C. Dozier, N. Turque et S. Saule. The quail *Pax-6 (Pax-QNR)* mRNAs are expressed from two promoters used differentially during retina development and neuronal differentiation. 1995
Molecular and Cellular Biology (sous presse)

SOMMAIRE

Abréviations	8
Présentation du mémoire	10
 INTRODUCTION	 11
I/ LA TRANSCRIPTION DES GÈNES : UN PROCESSUS COMPLEXE	12
1 La transcription de base et les facteurs généraux de transcription	12
1.1 les promoteurs à boîte TATA.....	13
1.2 Les promoteurs sans boîte TATA	17
 2 La régulation de la transcription	 18
2.1 Les facteurs de transcription spécifiques	18
2.1.1 différentes familles regroupées par homologie structurale du domaine de reconnaissance à l'ADN	19
- le motif Hélice-Coude-Hélice (HTH)	19
- le doigt de zinc	24
- le domaine basique associé à la crémaillère à leucines	26
- le domaine basique-Hélice-Boucle-Hélice.....	28
2.1.2 Les domaines d'activation de la transcription.....	28
- le domaine acide.....	28
- le domaine riche en glutamine	30
- le domaine riche en proline	30
- le domaine riche en sérine-thréonine	30
2.1.3 Les domaines de répression transcriptionnelle	31
2.2 Les co-facteurs	31
2.2.1 Mise en évidence des TAFs comme co-activateurs	31
2.2.2 Les autres co-activateurs	32
2.3 Les mécanismes d'action des activateurs transcriptionnels.....	34
 3 La régulation des facteurs de transcription spécifiques	 37
3.1 Les modifications post-traductionnelles	39
3.1.1 Le statut d'oxydo-réduction	39
3.1.2 La phosphorylation/déphosphorylation	40
3.1.3 La dégradation	42
3.1.4 La compartimentation.....	42
3.1.5 Le repliement intramoléculaire	44
3.2 La présence d'inhibiteurs	44

4 Différents éléments rendent compte de la spécificité d'expression des gènes	47
4.1 Le positionnement nucléosomal	47
4.1.1 Le nucléosome, structure de répression	47
4.1.2 Le nucléosome, structure d'activation	50
4.2 Les séquences de reconnaissance à l'ADN	51
4.2.1 Compétition pour la fixation	53
4.2.2 Sélectivité pour les séquences de fixation	53
4.2.3 L'espace des sites de fixation dicte la réponse transcriptionnelle	55
4.2.4 Coopérativité et synergie	58
4.3 L'expression des facteurs de transcription spécifiques	63
4.4 Interactions entre les facteurs de transcription	64
4.4.1 Dimérisation entre facteurs de transcription apparentés	64
4.4.2 Dimérisation entre facteurs de transcription non apparentés	72
4.5 Les répresseurs	74
 II/ LES GÈNES <i>PAX</i> / LE GÈNE <i>PAX6</i>	77
1 Structure	77
2 Fonction	79
3 Des gènes de développement	83
 III/ LA NEURORÉTINE	87
1 Structure	87
2 Développement	89
3 Modèle biologique	91
 IV/ PRÉSENTATION DES RÉSULTATS ANTÉRIEURS	92
1 Isolement du gène <i>Pax6</i> de caille (<i>Pax-QNR</i>)	92
2 Les produits du gène <i>Pax-QNR</i>	93
3 Expression	96
 RÉSULTATS	97
 Article 1 : Le gène <i>Pax-QNR</i> code un facteur de transcription capable de fixer et transactiver son promoteur.	98
 Article 2 : C-Myb agit comme activateur transcriptionnel du gène <i>Pax-QNR</i> par l'intermédiaire de deux mécanismes d'activation différents.	113

Article 3 : Identification et caractérisation d'un activateur du gène <i>Pax-QNR</i> , spécifique de la neurorétine	129
Article 4 : Les ARNm du gène <i>Pax-QNR</i> sont initiés à partir de deux promoteurs et sont différemment exprimés au cours du développement de la neurorétine et de la différenciation neuronale.	144
DISCUSSION	180
RÉFÉRENCES	192

LISTE DES ILLUSTRATIONS

FIG.1 :	Formation du complexe d'initiation de la transcription .	13
FIG.2 :	Le domaine homéo.	20
FIG.3 :	Le domaine POU.	23
FIG.4 :	Le doigt de zinc de type C4.	25
FIG.5 :	La crémaillère à leucines associée à un domaine basique.	27
FIG. 6 :	Le domaine Hélice-Boucle-Hélice.	29
FIG. 7 :	Organisation du complexe TFIID chez la Drosophile.	33
FIG. 8 :	L'activation de la transcription	36
FIG. 9 :	Les co-activateurs et l'activation de la transcription.	38
FIG. 10 :	Régulation des facteurs de transcription par phosphorylation.	41
FIG. 11 :	La voie de dégradation de l'ubiquitine.	43
FIG. 12 :	Activateur et répresseur à partir du même gène.	45
FIG. 13 :	Activateur et répresseur à partir du même gène.	46
FIG. 14 :	Le nucléosome et le promoteur du virus MMTV.	49
FIG. 15 :	Rôle du nucléosome dans l'activation de la transcription.	52
FIG. 16 :	Compétition pour la fixation.	54
FIG. 17 :	Importance des séquences adjacentes au site de fixation E Box pour la régulation transcriptionnelle	56
FIG. 18 :	Importance de l'espacement des hémi-sites de fixation pour la régulation transcriptionnelle par les récepteurs nucléaires.	57
FIG. 19 :	Importance de l'espacement des hémi-sites de fixation pour la reconnaissance à l'ADN de différents hétérodimères et récepteurs nucléaires	59
FIG. 20 :	Importance de l'espacement entre sites de reconnaissance POU _s et POU _{hd} pour la reconnaissance à l'ADN de différentes classes de protéines POU.	60
FIG. 21 :	Coopération entre facteurs de transcription pour la réponse transcriptionnelle.	62
FIG. 22 :	Dimérisation entre protéines bHLH.	67
FIG. 23 :	Dimérisation entre protéines à doigt de zinc et réponse transcriptionnelle.	69
FIG. 24 :	Interaction entre protéines à homéodomaines et la réponse transcriptionnelle qui en résulte.	71
FIG. 25 :	Un exemple d'interaction entre facteurs de transcription non apparentés.	73
FIG. 26 :	Activation et répression transcriptionnelle	76
FIG. 27 :	Structure des gènes <i>Pax</i> .	78
FIG. 28 :	Domaine paired de Pax6 et reconnaissance à l'ADN.	81
FIG. 29 :	Les mutations dans le gène <i>Pax6</i> .	85
FIG. 30 :	Les mutations associées à l'Aniridie.	86
FIG. 31 :	Organisation de la neurorétine.	88
FIG. 32 :	Structure et expression du gène <i>Pax6</i> de caille.	94
FIG. 33 :	Modèle de régulation du gène <i>Pax6</i> .	187

ABRÉVIATIONS

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
AMV	Avian Myeloblastosis Virus (virus de la leucémie myéloblastique aviaire)
AN	Aniridia
Antp	Antennapedia
AP1	Activator Protein 1 (protéine activatrice 1)
AP2	Activator Protein 2 (protéine activatrice 2)
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
ATF	AMPCyclique Transcription Factor (facteur de transcription de la voie AMPc)
ATP	Adénosine TriPhosphate
Bcd	Bicoïd
C/EBP	CAAT/Element Binding Protein (protéine se liant à l'élément CAAT)
CAT	Chloramphénicol Acétyl Transférase
CRE	Cyclic AMP Responsive Element (élément de réponse à l'AMP cyclique)
CREB	Cyclic AMP Responsive Element Binding protein (protéine se liant à l'élément de réponse à l'AMP cyclique)
CREM	cAMP-Responsive Element Modulator
CTD	CarboxyTerminal Domain (domaine carboxy-terminal [de l'ARN polymérase II])
DNase	DésoxyriboNucléase
En	Engrailed
exd	extradenticle
Ey	Eyeless
Ftz	Fushi-tarazu
GH	Growth Hormone (hormone de croissance)
GR	Glucocorticoid Receptor (récepteur des glucocorticoïdes)
Gsb et Gsbn	Gooseberry et Gooseberry neuro
HIV	Human Immunodeficiency Virus (virus de l'immunodéficience humaine)
HNF1	Hepatocyte Nuclear Factor 1 (facteur nucléaire 1 des hépatocytes)
HNF4	Hepatocyte Nuclear Factor 4 (facteur nucléaire 4 des hépatocytes)
Hox	Homeobox
HRE	Hormone Responsive Element (élément de réponse à l'hormone)
HTH	Helix-Turn-Helix (hélice-coude-hélice)
HTLV1	Human T-cell Leukemia Virus type 1/Human T lymphotropic Virus type 1 (virus de la leucémie humaine à cellules T, type 1/virus T lymphotrope humain, type 1)

IBP	Inr Binding Protein (protéine fixant des séquences InR)
I κ B	Inhibiteur du facteur NF κ B
Inr	Initiateur
kbp	kilobasepair (mille paires de base)
kDa	kilodalton
HLH	Helix-Loop-Helix (hélice-boucle-hélice)
LTR	Long Terminal Repeat (longue répétition terminale)
MCK	Muscle Creatine Kinase (créatine kinase spécifique du muscle)
MMTV	Mouse Mammary Tumor Virus (virus de la tumeur mammaire de souris)
MRE	Myb Responsive Element (élément de réponse aux protéines Myb)
N-CAM	Neural-Cell Adhesion Molecule (molécule d'adhésion cellulaire neurale)
NF1	Nuclear Factor 1 (facteur nucléaire 1)
NF κ B	Nuclear Factor κ chain B enhancer (facteur nucléaire de l'activateur B des chaînes légères κ des immunoglobulines)
NTF-1	Nuclear Transcription Factor 1 (facteur de transcription nucléaire 1)
Poxm et Poxn	Pox meso et Pox neuro
Prd	Paired
QEC	Quail Embryo Cells (cellules embryonnaires de caille)
QNR	Quail neuroretina (neurorétine de caille)
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RNase	RiboNucléase
RPE	Retinal Pigment Epithelium (rétine pigmentaire)
RSV	Rous Sarcoma Virus (virus du sarcome de Rous)
S	Svedberg
Sey	Small eye
Sp	Spotch
SRF	Serum Response Factor (facteur de réponse au sérum)
TAF	TBP Associated Factor (facteur associé à TBP)
TBP	TATA box Binding Protein (protéine se liant à la boîte TATA)
TF II	Transcription Factor II (Facteur de transcription associé à l'ARN polymérase II)
TK	Thymidine Kinase
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate
TRE	TPA-Responsive Element (élément de réponse au TPA)
TSH β	Thyroid Stimulating Hormone β (hormone β de stimulation de la thyroïde)
Ubx	Ultrabithorax
Un	Undulated
USA	Upstream Stimulatory Activity
USF	Upstream Stimulatory Factor
Zip	Leucine Zipper (crémaillère à leucines)

PRÉSENTATION DU MÉMOIRE

Depuis plusieurs décennies, les travaux menés de front sur deux axes différents, à savoir l'étude des processus de cancérisation et celle du développement, ont abouti à des conclusions similaires quant au fonctionnement cellulaire. La cellule est en effet soumise à des stimulations externes par l'intermédiaire de facteurs diffusibles (tels que les facteurs de croissance) qui vont l'induire soit à se diviser, soit à se différencier. Ces stimuli vont se propager par l'intermédiaire de récepteurs (membranaires ou nucléaires), d'une cascade de protéines kinase cytoplasmiques et de facteurs de transcription, pour aboutir à l'activation et à la répression de certains gènes. L'identification de ces gènes ainsi que des facteurs contrôlant leur expression est donc un objectif essentiel.

Dans le but d'isoler des gènes impliqués dans le développement de la neurorétine, un criblage différentiel a été réalisé dans le laboratoire. Il a permis d'isoler, entre autres, un gène présentant des homologies de structure avec les gènes de développement et qui s'est avéré être l'équivalent aviaire du gène *Pax6* de souris. Ce gène est essentiel pour la formation des yeux puisque des mutations dans ce gène, létales à l'état homozygote, se manifestent entre autres par une absence totale des yeux, ceci à la fois chez la souris et chez l'homme. Ce gène est exprimé essentiellement dans le tissu nerveux et peut donc être défini comme étant "tissu-spécifique".

Un moyen évident de contrôler l'expression d'un gène est de réguler avec précision sa transcription. L'expression du gène *Pax6* pourrait être le résultat, du moins en partie, d'une régulation transcriptionnelle tissulaire (ou cellulaire) spécifique. Avant de présenter les résultats qui ont pu être obtenus à ce sujet, j'ai tenté de décrire, dans l'introduction de ce mémoire, les différents facteurs qui contrôlent la transcription des gènes, ainsi que leur mode d'action et leur mécanisme de régulation. J'ai également essayé d'aborder, à l'aide d'exemples connus, les différents paramètres déterminant la spécificité tissulaire. Enfin, j'ai récapitulé les connaissances actuelles concernant les gènes *Pax* et plus particulièrement le gène *Pax6*, et j'ai décrit brièvement le système biologique utilisé dans notre étude.

INTRODUCTION

I/ LA TRANSCRIPTION DES GÈNES : UN PROCESSUS COMPLEXE

Chez les eucaryotes, la transcription est assurée par trois ARN polymérases différentes. L'ARN polymérase I est responsable de la synthèse des ARN ribosomiaux 18S, 28S, et 5.8S, l'ARN polymérase III dirige la synthèse des ARN de transfert et de l'ARN ribosomal 5S ainsi que certains autres petits ARN. L'ARN polymérase II est impliquée dans la synthèse de certains petits ARN nucléaires ainsi que dans la synthèse des ARN messagers (ARNm) qui seront traduits en protéines.

L'ARNm est initié dans une région appelée promoteur qui oriente le démarrage de la transcription. Les promoteurs peuvent être séparés en deux groupes basés sur leurs homologies de séquence. Le premier groupe possède une séquence TATAA appelée boîte TATA située à environ -25 nucléotides en amont du site d'initiation, flanquée ou non d'une séquence CCAAT située à environ 70 nucléotides en amont du site d'initiation ainsi que d'une séquence appelée Inr (Initiateur) centrée sur le site d'initiation et de consensus $PyPyA_{+1}N^T/APyPy$ (+1 désigne le site d'initiation) (Javahery *et al.* 1994). Le deuxième groupe est constitué par des promoteurs dépourvus de boîte TATA mais possédant néanmoins une séquence Inr et pour la plupart une région riche en bases GC en amont de cette séquence.

La transcription d'un gène requiert le recrutement d'un grand nombre de protéines: des protéines responsables de la transcription de base, appelées facteurs généraux de transcription, et des protéines capables de moduler (stimuler ou inhiber) la transcription de base, appelées facteurs de transcription spécifiques. Les facteurs de transcription spécifiques, qui peuvent se fixer sur des séquences d'ADN situées à des centaines ou des milliers de paires de base en amont ou en aval du promoteur, sont responsables de la spécificité d'expression du gène considéré.

1/ LA TRANSCRIPTION DE BASE ET LES FACTEURS GÉNÉRAUX DE TRANSCRIPTION

La transcription basale d'un gène par l'ARN polymérase II nécessite l'assemblage sur le promoteur d'un complexe constitué de nombreux facteurs protéiques. Des progrès considérables ont été réalisés dans l'identification et la purification de ces facteurs ainsi que dans le clonage

des gènes qui les codent. Il est maintenant possible de reconstituer la transcription de base avec des facteurs purifiés ou recombinants. Comme certains facteurs diffèrent par leur nature ou l'ordre d'entrée dans le complexe d'initiation, selon le type de promoteurs, nous distinguerons la transcription de base des promoteurs à boîte TATA de celle des promoteurs sans boîte TATA.

1.1 Les promoteurs à boîte TATA

Les premières reconstitutions d'initiation de la transcription *in vitro* ont été réalisées en utilisant des sous-fractions purifiées d'extraits nucléaires de cellules Hela. Ces fractions nécessaires à la formation du complexe d'initiation ont été notées TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF, TFIIH et constituent pour la plupart des complexes multi-protéiques.

Un modèle d'initiation de la transcription a émergé (FIGURE 1) (revues de Conaway et Conaway 1993 ; Hernandez 1993 ; Zawel et Reinberg 1993 ; Buratowski 1994). Un complexe initial, appelé "complexe engagé" car non dissociable par un excès de matrice ADN, est formé par la fixation de la sous fraction purifiée D (TFIID) sur l'ADN. Ce complexe agit comme site accepteur de TFIIA et TFIIB, qui permettent alors le recrutement de l'ARN polymérase II et de TFIIF. Le complexe résultant de l'association de ces facteurs est appelé complexe de pré-initiation. S'ensuit alors l'association de TFIIE et TFIIH pour former un complexe d'initiation. Une fois le complexe d'initiation assemblé, une étape dépendante de la présence d'ATP est nécessaire au démarrage de la transcription.

- formation du complexe de pré-initiation (Figure 1)

La première étape consiste dans la fixation de la fraction TFIID sur la boîte TATA de l'ADN. TFIID est un complexe multi-protéique de 750 kDa constitué d'une protéine de 38 kDa appelée TBP (pour TATA-Binding Protein) qui se fixe sur la boîte TATA, et de plusieurs facteurs étroitement associés à TBP appelés TAFs (pour TBP-associated-factors) (revue d' Hernandez 1993). Les TAFs ne sont en général pas nécessaires pour la transcription de base, qui peut être reconstituée *in vitro* en utilisant la protéine TBP purifiée (Pugh et Tjian 1990) (le rôle de ces facteurs sera discuté ultérieurement). TBP est une protéine très conservée au cours de

PROMOTEURS

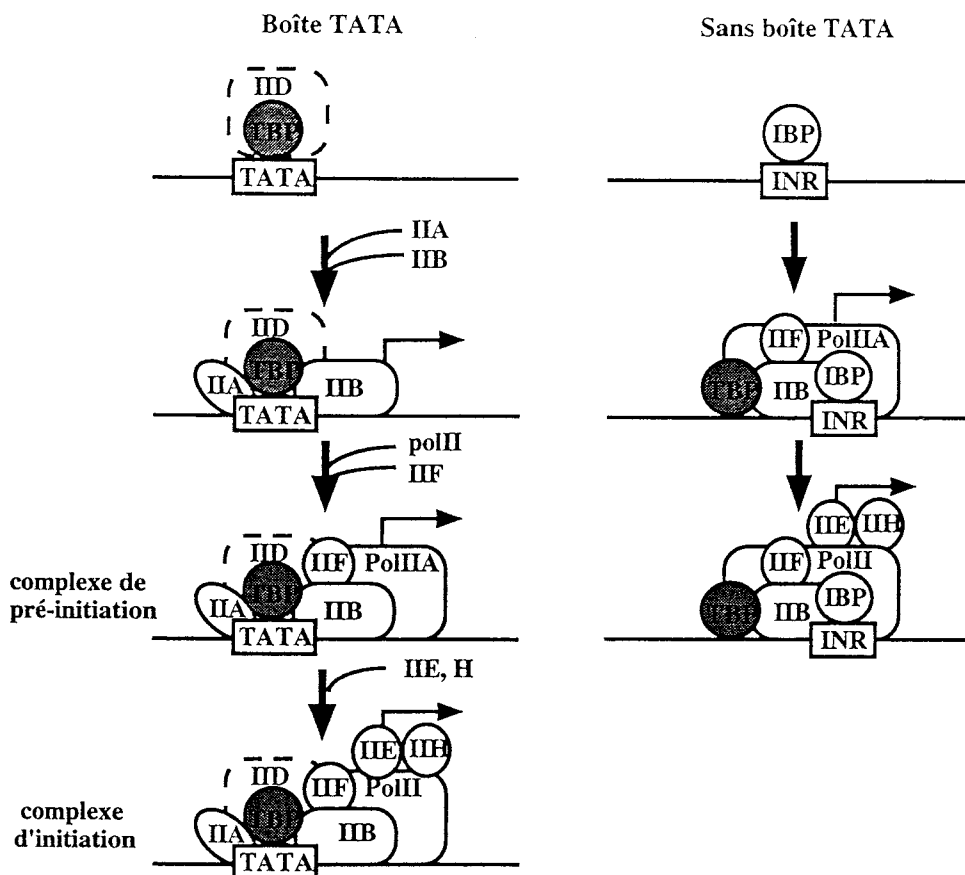


FIGURE 1 : Formation du complexe d'initiation de la transcription (d'après Hernandez *et al.* 1993). NB : Seule la protéine TBP contenue dans le complexe TFIID est représentée sur le schéma.

l'évolution. Sa structure tridimensionnelle définie par cristallographie ressemble à une selle de cheval avec la face interne interagissant avec le petit sillon de l'ADN laissant la face externe accessible pour contacter d'autres protéines (revue d'Hernandez 1993).

La fixation de TFIID peut-être stabilisée par TFIIA qui interagit avec TBP indépendamment de l'ADN (par l'intermédiaire de trois résidus Lysine présentes sur la face convexe de TBP) et induit ainsi des changements conformationnels de TBP modulant sa capacité de fixation avec les séquences promotrices. (Buratowski et Zhou 1992 ; Lee *et al.* 1992). Le rôle de TFIIA n'est pas complètement compris. Il est requis dans les systèmes de transcription *in vitro* reconstitués avec TFIID, mais pas pour les systèmes reconstitués avec TBP (Maldonado *et al.* 1990 ; Sumimoto *et al.* 1990 ; Cortes *et al.* 1992). Il agirait dans ce cas en dissociant des répresseurs associés à TBP dans le complexe TFIID (Cortes *et al.* 1992). Cependant des travaux récents montrent que TFIIA serait également capable de réprimer l'initiation de la transcription médiée par TBP à partir de promoteurs contenant une boîte TATA (Aso *et al.* 1994). La mécanistique de ce type d'activité n'est pas encore connue. Ainsi TFIIA pourrait à la fois stimuler l'initiation de la transcription médiée par le complexe TFIID et réprimer l'initiation de la transcription médiée par TBP.

Sur le complexe TFIID-ADN ainsi formé s'associe TFIIB (qu'il y ait ou non TFIIA), ce qui conduit au recrutement de l'ARN polymérase II associée à TFIIF. TFIIB ne fixe pas l'ADN mais serait le lien nécessaire entre TBP et l'ARN polymérase II : d'une part il interagit directement avec la protéine TBP dans le complexe TBP-ADN, d'autre part il interagit avec TFIIF, associée à l'ARN polymérase II, permettant ainsi son recrutement (Buratowski *et al.* 1989 ; Flores *et al.* 1991 ; Ha *et al.* 1993).

Dans la formation du complexe de pré-initiation, l'ARN polymérase II n'interagit pas directement avec l'ADN mais vient "s'asseoir" sur TFIID et TFIIB. Cette enzyme est constituée de plus de 10 sous-unités (12 chez la levure, Young *et al.* 1991) dont les plus grandes possèdent l'activité catalytique. Beaucoup d'études ont porté sur l'importance de la région carboxy-terminale (appelé domaine CTD) de la plus grande sous-unité, constituée de séquences répétées de 8 acides aminés pouvant être phosphorylés (revues de Conaway et Conaway 1993 ; Corden

1993). TFIID entre en contact avec la forme non phosphorylée de la polymérase II (Usheva *et al.* 1992), forme entrant dans le complexe de pré-initiation. La forme phosphorylée est impliquée dans l'élongation, suggérant que le mécanisme de phosphorylation du domaine CTD est responsable du démarrage de l'élongation par dissociation avec les facteurs généraux de transcription et notamment avec TBP (Payne *et al.* 1989 ; revue de Corden 1993). En effet, une hyperphosphorylation du domaine CTD empêche l'incorporation de l'ARN polymérase II dans le complexe d'initiation (Lu *et al.* 1991 ; Chesnut *et al.* 1992). Mais ce modèle doit être considéré avec beaucoup de réserve car des expériences indiquent que le mécanisme est plus complexe. En effet sur certains promoteurs, d'une part la transcription basale et également activée peut être reconstituée avec des ARN polymérases II délétées du domaine CTD, d'autre part l'inhibition de la phosphorylation n'affecte pas la transcription (Serizawa *et al.* 1993a).

- formation du complexe d'initiation

Sur le complexe de pré-initiation ainsi formé viennent se fixer TFIIE et TFIIH pour former un complexe d'initiation (Flores *et al.* 1992). Ces facteurs sont nécessaires pour la conversion du complexe d'initiation en un complexe d'élongation (Goodrich et Tjian 1994a).

TFIIE est composé d'un tétramère avec deux sous-unités de chaque type. Il interagit avec la forme non phosphorylée de l'ARN polymérase II, avec TBP, TFIIF ainsi que TFIIH. Par ces multiples interactions protéines-protéines, TFIIE jouerait un rôle dans la stabilisation du complexe d'initiation et serait nécessaire à l'incorporation de TFIIH (Maxon *et al.* 1994).

TFIIH est le dernier partenaire du complexe d'initiation. Il constitue un complexe multi-protéique possédant plusieurs fonctions : une activité kinase capable de phosphoryler le domaine CTD de l'ARN polymérase II (Lu *et al.* 1992), une activité ATPase ADN dépendante et une activité Hélicase (Schaeffer *et al.* 1993 ; Serizawa *et al.* 1993b). De plus il intervient dans les mécanismes de réparation de l'ADN (Drapkin *et al.* 1994).

1.2 Les promoteurs sans boîte TATA

Caractéristiques des gènes de "ménage" cellulaire ou "housekeeping", la transcription de ce type de promoteurs dépend de la présence des séquences Inr. Bien qu'un consensus PyPyA₊₁N^T/A PyPy ait été dégagé par comparaison de 80 promoteurs (Javahery *et al.* 1994), certains Inr ne présentent pas d'homologies de séquence avec ce consensus suggérant qu'il existe plusieurs familles d'Inr.

Les séquence Inr seules sont capables d'initier la transcription *in vitro* (Smale et Baltimore 1989) et se révèlent même être essentielles. Le modèle de formation du complexe d'initiation présenté (FIGURE 1) (revue d'Hernandez 1993) montre qu'une protéine spécifique, appelée IBP (pour Inr-Binding-Protein) se fixe sur la séquence Inr, remplaçant ainsi l'activité de fixation à l'ADN de TBP sur les éléments TATA. Plusieurs protéines IBP ont été décrites : TFII-I de 120 kDa qui reconnaît les séquences Inr des promoteurs tardif et IVa2 de l'adénovirus de type 2 (Roy *et al.* 1991) ; YY1 qui se fixe sur la séquence Inr du promoteur P5 du virus associé à l'adénovirus de type 2 (Weis et Reinberg 1992) et qui est nécessaire pour une transcription efficace *in vitro* (Seto *et al.* 1991 ; Shi *et al.* 1991) ; et HIP1 (E2F) qui se fixe sur l'Inr du promoteur du gène de la dihydrofolate réductase (Means et Farnham 1990).

L'ordre d'entrée des facteurs additionnels n'est pas connu mais il semble que les facteurs entrent dans le complexe d'initiation simultanément. En effet le complexe TBP, TFIIB, ARN polymérase II et TFIIF peut s'associer à l'Inr du promoteur tardif de l'adénovirus de type 2 en l'absence de la protéine IBP (Carcamo *et al.* 1991). TBP peut fixer faiblement la région -30 de plusieurs promoteurs sans boîte TATA (Wiley *et al.* 1992) et l'insertion d'une boîte TATA en amont d'une séquence Inr augmente l'efficacité de transcription (Smale et Baltimore 1989 ; Carcamo *et al.* 1991). Ceci suggère d'une part que TBP est positionné au même endroit dans le complexe d'initiation quelque soit le type de promoteur (avec ou sans boîte TATA), d'autre part que les interactions entre TBP et les facteurs TFIIB et l'ARN polymérase II sont similaires dans les deux types de promoteur.

Sur le complexe ainsi formé viendraient s'associer TFIIE et TFIIH comme dans les promoteurs à boîte TATA.

Certaines séquences Inr requièrent TFIID pour initier la transcription *in vitro* (Smale *et al.* 1990 ; Pugh et Tjian 1991), suggérant que dans certains promoteurs sans boîte TATA les TAFs pourraient stabiliser le complexe d'initiation, peut-être en se fixant sur l'ADN dans la région de l'Inr. En effet, il a été récemment démontré que TFIID (et non TBP) peut se fixer sur les séquences Inr (Purnell *et al.* 1994 ; Kaufmann et Smale 1994).

2/ LA RÉGULATION DE LA TRANSCRIPTION

La transcription basale d'un promoteur peut être stimulée ou inhibée par la présence de séquences situées en amont ou en aval (quelques paires de base à plusieurs milliers de paires de base) du site d'initiation, séquences reconnues et fixées par des protéines appelées facteurs de transcription spécifiques. Certains de ces facteurs nécessitent pour agir la présence de protéines auxiliaires appelées co-facteurs. Mais facteurs de transcription spécifiques et co-facteurs ne sont pas les seuls éléments intervenant dans l'expression d'un gène. En effet, *in vivo* l'ADN est engagé dans une structure appelée chromatine qui, selon le contexte, va permettre (et même favoriser) ou inhiber la transcription d'un gène. Dans ce chapitre nous allons donc décrire les différents protagonistes intervenant dans la régulation transcriptionnelle ainsi que leur mode de fonctionnement.

2.1 Les facteurs de transcription spécifiques

Les premiers travaux permettant d'établir l'anatomie fonctionnelle des facteurs de transcription ont été réalisés chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* sur les protéines GAL4 (Brent et Ptashne 1985) et GCN4 (Hope et Struhl 1986). Ces travaux ont permis d'établir la structure modulaire des facteurs de transcription spécifiques, qui s'est ensuite vérifiée pour un grand nombre d'entre eux chez différents organismes (drosophile, plantes, vertébrés) par l'analyse fonctionnelle des ADN complémentaires.

Nous pouvons ainsi définir un facteur de transcription spécifique comme étant une protéine possédant un ou plusieurs domaines fonctionnels physiquement séparables, définis en trois classes :

- un domaine d'activation ou de répression de la transcription
- un domaine de liaison à l'ADN
- un domaine de dimérisation (parfois non dissociable du domaine de liaison à l'ADN) ou de liaison à un ligand.

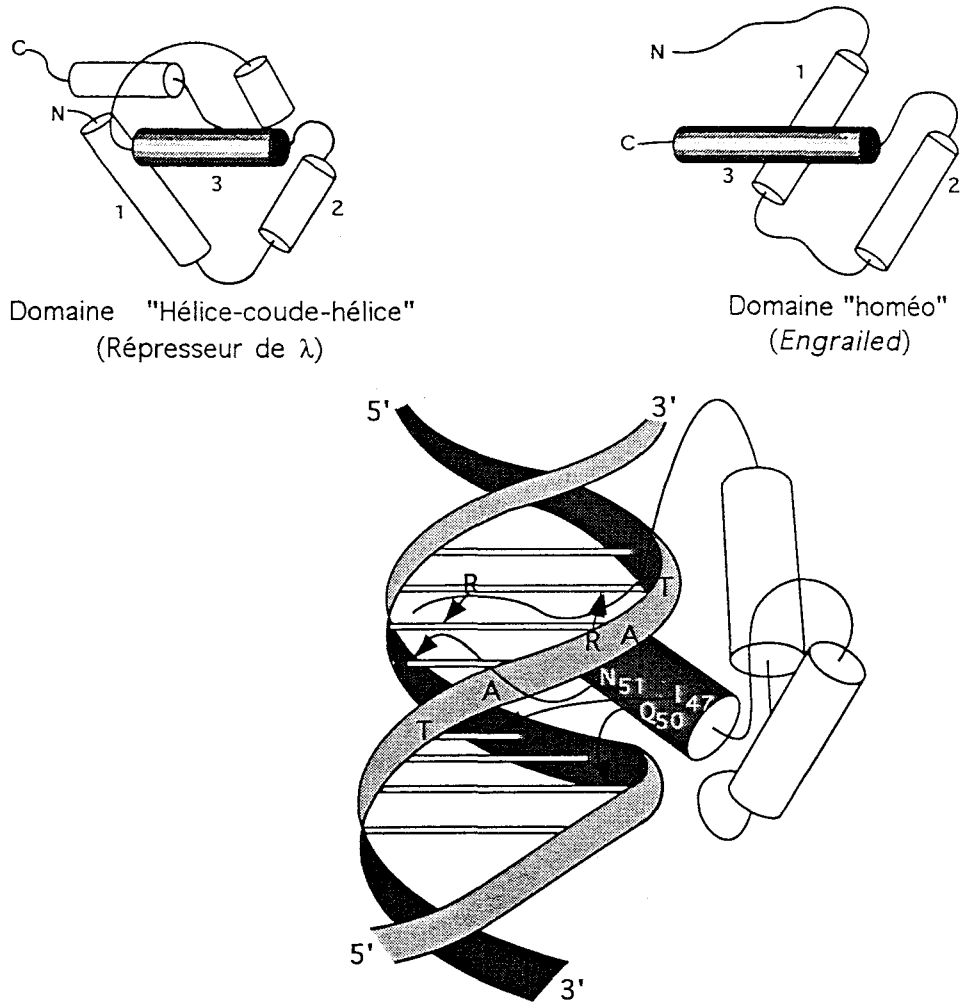
Ainsi certains facteurs de transcription spécifiques contiennent plusieurs domaines de liaison à l'ADN physiquement séparables ou plusieurs domaines de régulation de la transcription ou plusieurs domaines de dimérisation.

2.1.1 Différentes familles regroupées par homologie structurale du domaine de liaison à l'ADN

Les homologies présentes entre différents domaines fonctionnels ont amené à proposer une classification par homologie de structure et de séquence (regroupement en familles) entre les domaines de liaison à l'ADN ou les domaines de *trans*-activation. Il semble que la classification en fonction du type de domaine de liaison à l'ADN soit la plus utilisée. Le domaine de liaison à l'ADN est le domaine qui spécifie le mécanisme de reconnaissance à l'ADN car il se fixe sur une séquence bien précise et particulière pour chaque famille de facteur de transcription. Plusieurs structures ont été décrites :

- le motif Hélice-Coude-Hélice (HTH)

La première détermination de ce type de structure a été réalisée pour les répresseurs procaryotiques du phage λ (Anderson *et al.* 1981 ; McKay *et al.* 1981). Ces protéines procaryotiques adoptent, dans leur domaine de liaison à l'ADN, une structure constituée de deux hélices α de 8 à 10 acides aminés (hélices 2 et 3), séparées par trois acides aminés formant un coude β (FIGURE 2, d'après Pabo et Sower 1992). Ces protéines se lient à l'ADN sous forme de dimères, sur une séquence palindromique, chaque protéine fixant un héli-site. La première hélice contacte non spécifiquement l'ADN et joue un rôle de stabilisation. L'hélice 3 reconnaît spécifiquement des séquences d'ADN situées dans le grand sillon.



Protéine	Site de liaison
Bcd	TATTGG
BcdLys→Gln	TATTIG
Prd	TATTGG
PrdSer→Gln	TATTIG
PrdSer→Lys	TATTCC

FIGURE 2 : Le domaine homéo (d'après Angrand 1993). L'hélice 3 (grisée) est l'hélice de reconnaissance à l'ADN.

Il est intéressant de noter que ces grandes caractéristiques structurales sont conservées chez les espèces supérieures et se retrouvent notamment dans des protéines qui possèdent un domaine de fixation à l'ADN appelé domaine homéo (homéoprotéines).

- Le domaine Homéo

Chez les eucaryotes, la recherche de gènes associés à des mutations homéotiques du développement a permis l'isolement de gènes possédant un domaine comparable. Ce domaine est largement représenté dans les gènes homéotiques de drosophile puis chez les mammifères (revue de Duboule 1994). Le domaine homéo, extrêmement conservé au cours de l'évolution, est composé de 60 acides aminés. On le retrouve également dans des organismes non segmentés tels que la levure, l'oursin de mer, le nématode *Caenorhabditis elegans* et même chez les plantes. La détermination de la structure tridimensionnelle des homéoprotéines Antennapedia (Antp), Engrailed (En), et MAT α 2 (protéine de levure) démontre que le domaine homéo est formé de trois ou quatre hélices α et contient un motif HTH (Qian *et al.* 1989 ; Kissinger *et al.* 1990 ; Wolberger *et al.* 1991) (FIGURE 2). Les hélices 2 et 3 forment la structure hélice-coude-hélice et sont superposables aux hélices de stabilisation et de reconnaissance des procaryotes. L'hélice 3 du domaine homéo, hélice de reconnaissance, se couche dans le grand sillon de l'ADN et interagit avec certaines bases du site de reconnaissance. Celui-ci est une séquence riche en bases AT dont le motif central est TAAT. Cependant les bases adjacentes à ce motif sont importantes pour la reconnaissance. Ainsi les homéoprotéines Bicoïd (Bcd) et En reconnaissent des sites différents dans les bases adjacentes en ayant pourtant un coeur ATTA de reconnaissance identique. Cette différence est imputable à un acide aminés situé en position 50 du domaine homéo, correspondant au résidu 9 de l'hélice 3 (Hanes et Brent 1989 ; Treisman *et al.* 1989).

Le type d'acide aminé situé en position 50 de l'homéodomaine confère à ce dernier une spécificité de reconnaissance à l'ADN (FIGURE 2) et a été utilisé pour classer les différents types d'homéodomains (par rapport à leur spécificité de reconnaissance) : glutamine pour les homéodomains de type Hox ou En ; sérine pour ceux de type paired ; cystéine pour les

homéodomaines de type POU ; lysine pour ceux de type Bcd. Les différents homéodomaines sont aussi regroupés en familles selon leur homologie de séquence (voir thèse C. Carrière).

Enfin certaines homéoprotéines se caractérisent par la présence d'un deuxième domaine de liaison à l'ADN (dont nous discuterons ultérieurement l'importance pour la spécificité de reconnaissance à l'ADN) :

- Le domaine paired

Ce domaine de 128 acides aminés initialement découvert dans la protéine Paired de drosophile (Prd), est prédit comme étant aussi de structure HTH (Bopp *et al.* 1986)¹. Il est présent dans d'autres homéoprotéines de drosophile telles que Gooseberry proximal (Gsb-p), Gooseberry distal (Gsb-d), Gooseberry neuro (Gsb-n), Pox neuro, meso (Poxn, Poxm), eyeless (ey) (revue de Strachan et Read 1994 ; Quiring *et al.* 1994), et fonctionne comme un domaine de liaison à l'ADN autonome et indépendant de l'homéodomaine (Treisman *et al.* 1989).

Des gènes possédant le domaine paired ont été retrouvés chez les mammifères et portent le nom de gènes *Pax* (pour Paired Box). Ces gènes seront présentés ultérieurement.

- Le domaine POU

Ce domaine, à l'origine identifié chez les facteurs de transcription de mammifères Pit-1, Oct-1, Oct-2 et la protéine de *C. elegans* Unc-86 (revue de Rosenfeld 1991 ; Herr *et al.* 1988), est constitué de 135 acides aminés et s'organise en deux sous-domaines : en position N terminale un sous-domaine de 75 acides aminés appelé domaine POU-spécifique (POU_S), juxtaposant un domaine homéo très divergent (appelé POU_{HD}) qui constitue le deuxième sous-domaine (FIGURE 3).

A la différence du domaine Paired, chaque sous-domaine n'est pas considéré comme domaine de liaison à l'ADN indépendant et autonome. En effet, les domaines POU_S et POU_{HD} ne sont pas capables de fixer l'ADN avec une haute affinité lorsqu'ils sont séparés (Ingraham *et al.* 1990). La participation de chacun d'eux est indispensable à la fixation de la protéine (Verrijzer *et al.* 1992). Le domaine POU_S, formé de deux hélices α ; est lui aussi de structure

¹ Récemment, Xu *et al.* (1995) ont déterminé la structure tridimensionnelle du domaine paired de la protéine Paired par cristallographie et ont mis en évidence la présence de deux sous-domaines de structure HTH.

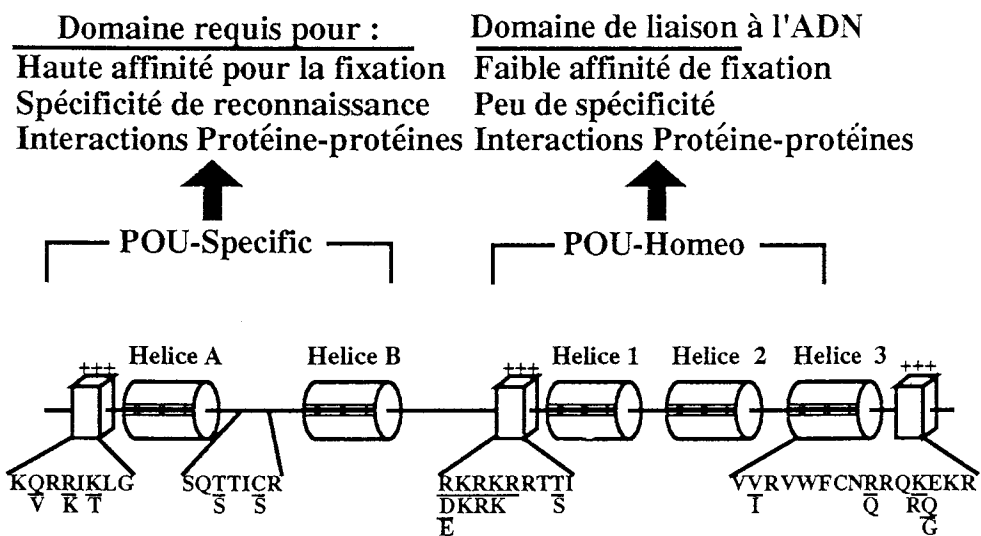


FIGURE 3 : Le domaine POU (d'après Ingraham *et al.* 1990).

HTH (Assa-Munt *et al.* 1993 ; Dekker *et al.* 1993), et l'hélice B est celle qui interagit spécifiquement avec les séquences d'ADN situées dans le grand sillon. Le domaine POU_{HD} se comporte comme les homéodomains "classiques" pour la fixation à l'ADN.

- les familles Ets et Myb

Des familles de facteurs de transcription, définies par homologies de séquence, et suspectées constituer des structures nouvelles par leur domaine de liaison à l'ADN, possèdent en fait un domaine de liaison à l'ADN de type HTH. C'est notamment le cas pour les protéines de la famille Ets et Myb pour lesquelles les structures ont été récemment déterminées par RMN et cristallographie (Liang *et al.* 1995 ; Donaldson *et al.* 1994 ; Ogata *et al.* 1994). Ces résultats suggèrent que le motif HTH est probablement très largement répandu comme structure de reconnaissance à l'ADN. Ainsi les facteurs de transcription spécifiques dont les structures tridimensionnelles ne sont pas encore définies s'apparentent probablement de près ou de loin aux structures déjà connues.

- **le doigt de Zinc**

Ce type de structure se caractérise par un arrangement particulier d'acides aminés cystéines ou histidines qui permet le repliement de ce domaine autour d'un atome de zinc. Les protéines possédant un domaine de liaison à l'ADN de ce type ont été regroupées par classes selon les homologies entre leur doigts de zinc (revue de Angrand 1993). Les différentes structures en doigt de zinc ont été déterminées par diffraction aux rayons X et par cristallographie, ce qui a permis d'établir que chaque doigt interagit avec trois ou cinq paires de base du grand sillon de l'ADN sur le même brin de la double hélice (FIGURE 4) (revue de Angrand 1993). Trois classes de motifs en doigt de zinc sont décrites :

Classe I (C₂H₂) : les doigts de zinc de cette famille sont caractérisés par deux cystéines et deux histidines chélatant un atome de zinc. Suivant le facteur de transcription considéré, le nombre de doigt varie. Cette structure est retrouvée dans de nombreux facteurs de transcription

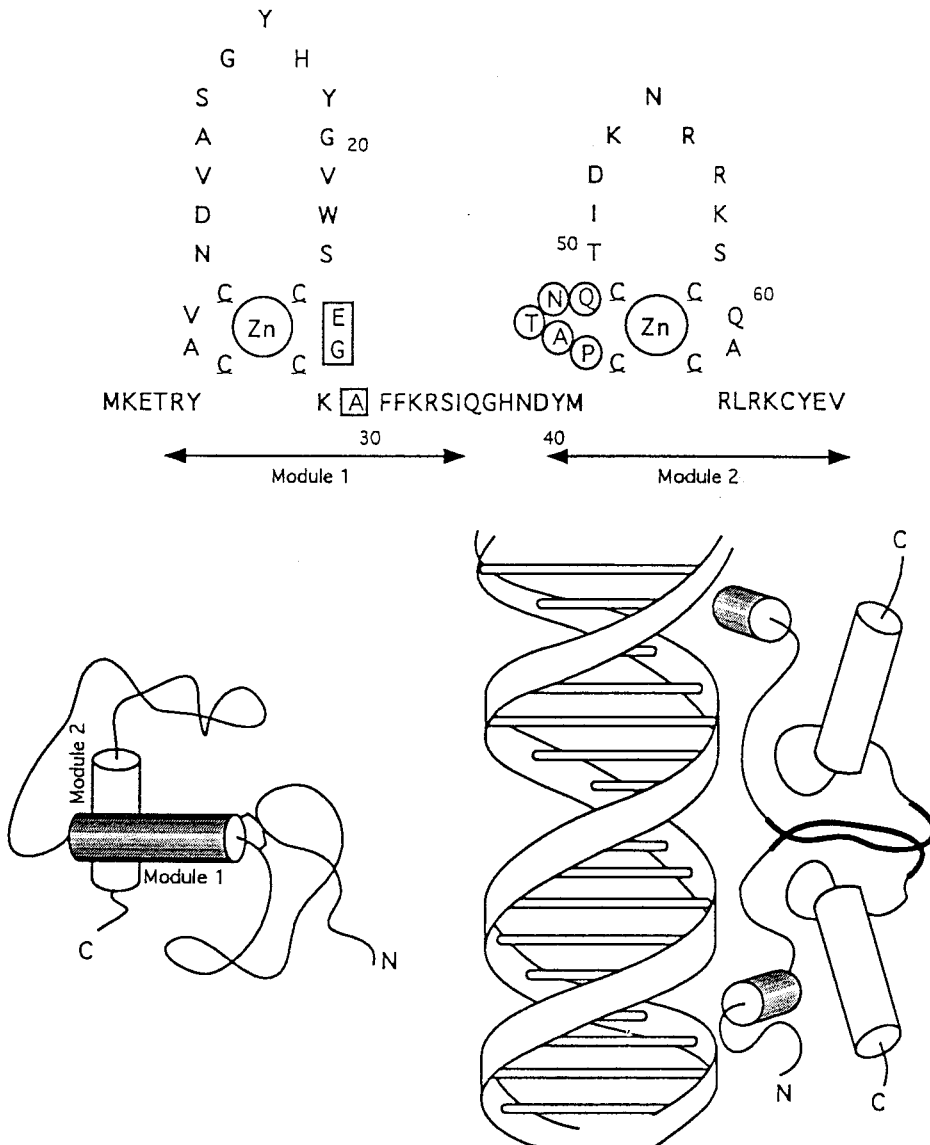


FIGURE 4 : Le doigt de zinc de type C4 (d'après Angrand 1993).

de mammifères tels que Sp1 et Krox24 , de levure tels que ADR1 et SW15, ainsi que dans des protéines de drosophile impliquées dans le développement telles que Krüppel et Hunchback. La comparaison de plus de 200 motifs peptidiques de ce type de doigt de zinc a permis de définir la séquence consensus : F/Y-X-C-X₂(4)-C-X₃-F-X₅-L-X₂-H-X₃(4)-H-X₂(6)

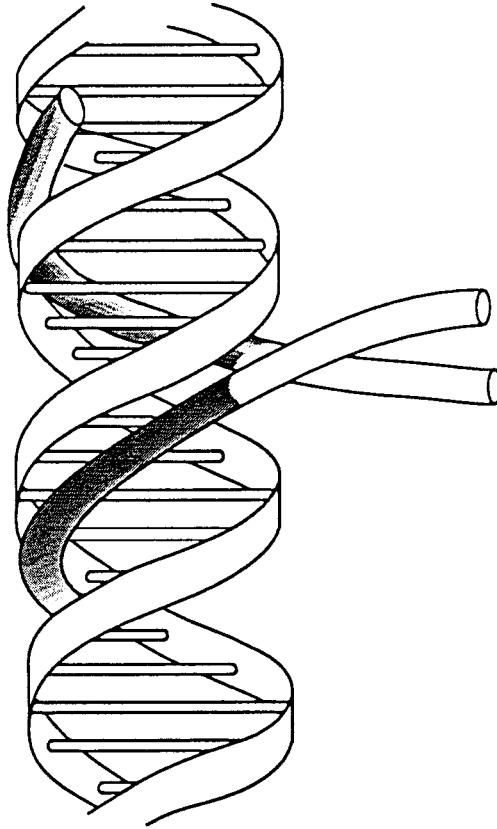
Classe II (C₄): ce type de doigt de zinc est constitué par quatre cystéines chélatant le zinc. Présent dans les récepteurs nucléaires aux hormones stéroïdes et thyroïdiennes ainsi que le récepteur de l'acide rétinoïque et dans le facteur de transcription HNF4 (pour Hepatocyte Nuclear Factor 4), leur structure est constituée de deux doigts de zinc organisés en deux modules dont le consensus est : C-X₂-C-X₁₃-C-X₂-C-X₁₅₋₁₇-C-X₅-C-X₉-C-X₂-C-X₄-C.

Classe III (C₆): de structure : C-X₂-C-X₆-C-X₆₋₉-C-X₂-C-X₆-C, cette famille se caractérise par six cystéines chélatant le zinc. Ce type de doigt de zinc est présent dans de nombreux activateurs transcriptionnels de levure tels que la protéine GAL4.

- le domaine basique associé à la crémaillère à leucines (bZip)

Cette structure se caractérise par la juxtaposition d'une région basique constituant le domaine de liaison à l'ADN et d'une région constituée d'acides aminés hydrophobes, généralement 4 à 5 leucines répétées tous les 7 acides aminés, correspondant à un domaine de dimérisation entre protéines.

La détermination de structure, réalisée par résonance magnétique nucléaire et cristallographie pour la protéine de levure GCN4 (O'Shea *et al.* 1991 ; Ellenberger *et al.* 1992) et le facteur de transcription AP1 (Glover et Harrison 1995), a permis d'établir, d'une part, que la région basique et la crémaillère à leucines étaient incluses dans une même hélice α , d'autre part, que le domaine de liaison à l'ADN interagit avec le grand sillon d'ADN (FIGURE 5). Les facteurs de transcription possédant cette structure ne se fixent à l'ADN que sous forme dimérique, chaque monomère reconnaissant un héli-site. Parmi les facteurs de transcription possédant cette structure on peut citer également les facteurs ATF/CREB (pour AMPc Transcription Factor /cAMP Responsive Element Binding protein) et C/EBP (pour



AP1	ATF	C/EBP
C-Fos	CREB	C/EBP α
Fra-1	ATF-1	C/EBP β
Fos B	ATF-2	C/EBP δ
C-Jun	ATF-3	
Jun B	ATF-4	
Jun D	ATF-5	
	ATF-6	
	CREM	

FIGURE 5 : La crémaillère à leucines associée à un domaine basique (d'après Angrand 1993).

CAAT/Element Binding Protein) (pour une synthèse des différents facteurs de transcription, voir Faisst et Meyer 1992).

- le domaine basique- Hélice-Boucle-Hélice (bHLH)

Ce motif est caractérisé par la présence d'une région basique juxtaposant un domaine constitué de deux hélices α amphipathiques séparées par une structure en boucle (HLH) (Ellenberger *et al.* 1994 ; Ferré-d'Amaré *et al.* 1993, 1994) (FIGURE 6). Le domaine basique contacte l'ADN alors que le domaine HLH est un domaine de dimérisation. Les facteurs possédant ce type de structure (MyoD, Myc, TFE3, TFEB, E12, E47...) sont capables de se dimériser et fixent des séquences palindromiques de type CANNTG appelées originellement boîte E (Faisst et Meyer 1992).

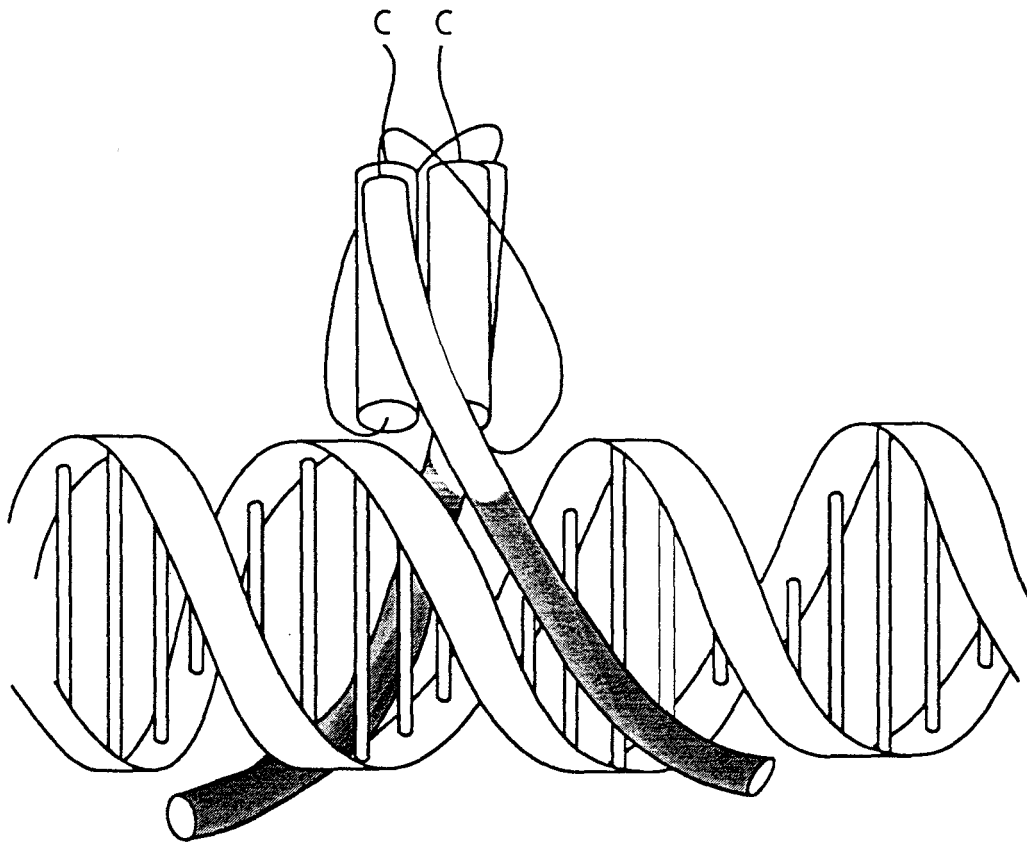
2.1.2 Les domaines d'activation de la transcription

Alors que le mode d'action du domaine de liaison à l'ADN est relativement bien connu, celui du domaine d'activation de la transcription reste encore très obscur. Les modèles qui émergent supposent des interactions protéines-protéines entre le domaine d'activation de la transcription et des facteurs cellulaires de la machinerie transcriptionnelle de base mais sans expliquer comment se font les interactions et quels sont les mécanismes qui vont rendre compte de l'activation de la transcription.

La comparaison des différents domaines d'activation de la transcription n'a pas permis de dégager de séquence consensuelle particulière pour chaque type de domaine. Néanmoins quatre types de structures différentes existent :

- le domaine acide

Ce domaine est présent dans les activateurs transcriptionnel GCN4 et VP16 (du virus de l'Herpès) (Ma et Ptashne 1987 ; Hope *et al.* 1988). La séquence du domaine d'activation transcriptionnel est riche en résidus acides lui conférant globalement une charge négative. Des études de prédiction de structure suggèrent qu'une hélice α amphipatique peut se former,



Facteurs	Séquence cible
----------	----------------

AP4	
-----	--

MyoD	
------	--

E12	
-----	--

E47	
-----	--

Tal1	
------	--

←○→

CAGCTG

Myc	
-----	--

USF	
-----	--

CBF1	
------	--

Max	
-----	--

TFE3	
------	--

PH04	
------	--

←○→

CACGTG

FIGURE 6 : Le domaine Hélice-Boucle-Hélice (d'après Angrand 1993).

répartissant les résidus acides sur l'une des faces de l'hélice, l'autre face étant riche en résidus hydrophobes. La comparaison de séquence des différents domaines transcriptionnels acides ne montre pas d'homologie mise à part la richesse en résidus acides. L'étude du domaine d'activation de VP16, considéré comme l'archétype de domaine acide montre, d'une part, que l'hélice α n'est pas essentielle et que les résidus acides ne font que contribuer à l'activation de la transcription, d'autre part, qu'un acide aminé hydrophobe est crucial dans l'activation de la transcription (Cress et Triezenberg 1991). Ces résultats remettent donc en cause la seule importance des résidus acides pour l'activité du domaine acide.

- le domaine riche en glutamine

La richesse en résidus glutamine est de l'ordre de 25 à 30%. Ce type de motif est retrouvé par exemples dans le facteur de transcription Sp1 ainsi que dans des protéines contrôlant le développement de la drosophile telles que Antennapedia, Ultrabithorax et Zeste (Courey et Tjian 1988). Aucune étude fonctionnelle ne permet d'attribuer un rôle important à ces résidus.

- le domaine riche en proline

Ce type de domaine présente une richesse en résidus proline de l'ordre de 20 à 30% et est identifié dans les protéines CTF/NFI, AP2, Jun, Oct2. Comme pour le domaine riche en glutamine, l'importance de ces résidus pour la fonction du domaine n'est pas démontrée.

- le domaine riche en sérine-thréonine

Initialement décrit par Ingraham *et al.* (1990) pour la protéine Pit-1, ce domaine peut s'apparenter au domaine acide quand il est phosphorylé. En effet, de nombreux facteurs de transcription sont décrits être sensibles aux modifications du statut de phosphorylation pour l'activation de la transcription (décrit ultérieurement). Ce type de domaine constitue ainsi un domaine d'activation transcriptionnel dont l'activité peut être modulée par la physiologie cellulaire.

2.1.3 Les domaines de répression transcriptionnelle

Des domaines de répression de la transcription ont pu être isolés. Leur intérêt réside dans le fait qu'ils sont capables de transformer un activateur transcriptionnel en un répresseur lorsqu'ils sont fusionnés au domaine de liaison à l'ADN du facteur considéré. Le mode d'action moléculaire des domaines de répression n'est pas connu, cependant il semble que, tout comme les domaines d'activation, ils se caractérisent par une richesse en certains acides aminés (richesse en Gln, Pro ou Ala) notamment en résidus hydrophobes (revue de Cowell 1994).

En conclusion, les facteurs de transcription contiennent de multiples domaines fonctionnels, qui parfois se chevauchent, incluant un domaine de liaison à l'ADN et un domaine de *trans*-activation ou de *trans*-répression. Comme nous l'avons vu précédemment, bien que les domaines de liaison à l'ADN diffèrent structurellement, ils ont en commun la présence d'une hélice α "couchée" dans le grand sillon de l'ADN. Beaucoup de protéines se fixent à l'ADN sous forme d'homodimères ou d'hétérodimères, la présence d'une interface de dimérisation est souvent indispensable à cet effet.

2.2 Les co-facteurs

2.2.1 Mise en évidence des TAFs comme co-activateurs

Alors que la transcription basale d'un promoteur peut-être reconstituée *in vitro* en utilisant la protéine TBP seule, l'activation de la transcription par certains facteurs de transcription spécifiques tels que Sp1, USF et les activateurs transcriptionnels acides et riches en proline, requiert la présence de TFIID (Pugh et Tjian 1990 ; Smale *et al.* 1990 ; Tanese *et al.* 1991 ; Zhou *et al.* 1992). Ainsi, les TAFs, protéines co-purifiées avec TBP dans la fraction TFIID, sont nécessaires pour l'activation de la transcription et se sont vues attribuer un rôle de co-facteur ou co-activateur (revues de Hernandez 1993 ; Goodrich et Tjian 1994b ; Tjian et Maniatis 1994). Parallèlement chez la levure, des facteurs appelés médiateurs ou adaptateurs étaient mis en évidence dans la transcription activée, ceux-ci n'étant pas requis dans la transcription basale (Berger *et al.* 1990 ; Kelleher *et al.* 1990).

Chez la drosophile et l'homme au moins huit TAFs sont présents dans la fraction TFIID. Chez la drosophile ces TAFs ont été clonés et dénommés dTAF_{II}250, 150, 110, 80, 60, 40, 30 α , 30 β (Dynlacht *et al.* 1993 ; Goodrich *et al.* 1993 ; Hoey *et al.* 1993 ; Kokubo *et al.* 1993a, b, c ; Verrijzer *et al.* 1994 ; Weinzierl *et al.* 1993a, b ; Yokomori *et al.* 1993) (FIGURE 7). Chez l'homme cinq TAFs sont partiellement caractérisés : hTAF_{II} 250, 130, 100, 70 et 30 (Hisatake *et al.* 1993 ; Ruppert *et al.* 1993 ; Weinzierl *et al.* 1993b ; Jacq *et al.* 1994). Il apparaît que les TAFs sont extrêmement conservés phylogénétiquement, suggérant un rôle très important dans le processus de transcription.

Ces protéines sont capables d'interagir entre elles, avec les facteurs généraux de transcription, ainsi qu'avec les activateurs transcriptionnels (voir mécanisme d'action des activateurs transcriptionnels) et pourraient donc constituer un lien entre ces derniers et les facteurs responsables de la transcription de base. Ainsi dTAF_{II}40 fixe TFIIB (Goodrich *et al.* 1993). TAF_{II}250 contacte TBP directement (Takada *et al.* 1992 ; Ruppert *et al.* 1993 ; Weinzierl *et al.* 1993a ; Zhou *et al.* 1993) de même que dTAF_{II}150 et dTAF_{II}30 α (Chen *et al.* 1994). D'autres TAFs ne s'associent pas à TBP mais ont besoin des précédents TAFs associés à TBP pour s'accrocher au complexe multi-protéique préexistant et constituer le complexe TFIID (Chen *et al.* 1994). C'est ainsi par exemple que dTAF_{II}110 n'interagit pas avec TBP mais s'associe au complexe TBP-ADN *via* dTAF_{II}250 (Weinzierl *et al.* 1993a ; Chen *et al.* 1994). L'étude des interactions TAF-TBP et TAF-TAF réalisées par Chen *et al.* (1994) (FIGURE 7) révèlent que dTAF_{II}250 sert de médiateur d'accrochage aux dTAF_{II}30, 60, 110 et 150 et qu'un ordre chronologique régit l'accrochage des différents TAFs.

2.2.2 Les autres co-activateurs

Outre les TAFs, il existe d'autres co-activateurs non présents dans la fraction TFIID. Par exemple une activité de co-activateur, appelé USA (pour Upstream Stimulatory Activity), présent dans des extraits nucléaires de cellules Hela est nécessaire pour une *trans*-activation maximale du promoteur tardif de l'adénovirus et du promoteur du virus HIV-1 par les facteurs de transcription respectifs USF et Sp1 (Meisterernst *et al.* 1991). De même un co-activateur,

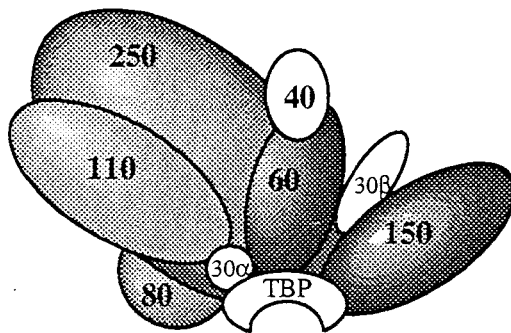


FIGURE 7 : Organisation du complexe TFIIID chez la *Drosophile* (d'après Chen *et al.* 1994).

appelé CoS, présent également dans des extraits nucléaires de cellules Hela augmente la *trans*-activation *in vitro* par le facteur transcriptionnel SRF (Serum Response Factor) (Zhu et Prywes 1992).

2.3 Les mécanismes d'action des activateurs transcriptionnels

Ces dernières années, les recherches se sont orientées sur la manière dont ces facteurs "communiquent" avec la machinerie transcriptionnelle pour stimuler ou inhiber la synthèse des ARNm. Un embryon de réponse vient de la découverte d'interactions directes entre les facteurs de transcription et les composants du complexe d'initiation de la transcription. Ces interactions pourraient augmenter l'initiation de la transcription d'une part en accélérant (ou en stabilisant) la fixation de TBP ou des autres facteurs de transcription généraux dans le complexe d'initiation, d'autre part en stimulant directement l'ARN polymérase II ou en induisant un changement conformationnel d'un composant du complexe d'initiation, lui-même en relation avec l'ARN polymérase II.

En effet, certains activateurs viraux comme les protéines VP16 (du virus de l'Herpès), E1A (de l'adénovirus de type-2), Zta (du virus de l'Epstein-Barr) et la protéine précoce IE2 (du cytomégalovirus) (revue d'Hernandez 1993), ainsi que des facteurs de transcription cellulaires tels que p53 (Seto *et al.* 1992), Oct1, Oct2 (Zwilling *et al.* 1994) et c-rel (Kerr *et al.* 1993 ; Xu *et al.* 1993) sont capables d'interagir directement avec TBP, ce qui peut stabiliser sa fixation sur la boîte TATA (par exemple avec Zta, Lieberman et Berk 1991). L'importance de ces interactions est démontrée par le fait que des mutations ponctuelles dans les activateurs VP16 et E1A réduisant leur capacité à fixer TBP *in vitro*, réduisent également leur capacité activatrice *in vivo* (Ingles *et al.* 1991 ; Lee *et al.* 1991), ce qui suggère que les interactions TBP-activateurs décelées *in vitro* sont pertinentes *in vivo*.

Les facteurs de transcription USF et Myc, interagissent *in vitro* avec le facteur TFII-I, qui se fixe sur les séquences Inr. (Roy *et al.* 1991, 1993). USF est d'ailleurs capable d'activer la transcription par l'intermédiaire de séquences Inr sur le promoteur du virus HIV (Du *et al.* 1993). Dans le cas de la protéine Myc, cette interaction empêche la formation du complexe TBP-TFII-

I-promoteur, ce qui inhibe l'initiation de la transcription (Roy *et al.* 1993). Ce type de mécanisme permet au proto-oncogène *c-myc* jusqu'ici montré coder un *trans*-activateur, de posséder une capacité de répression en *trans*, probablement restreinte aux gènes dont l'expression nécessite l'intervention de TFII-I.

Les facteurs généraux TFIIA, TFIIIB, TFIIE, TFIIF et TFIIH sont aussi des cibles potentielles pour les régulateurs transcriptionnels. Ainsi VP16 contacte également TFIIIB accélérant sa cinétique de fixation sur le complexe de pré-initiation (Lin et Green 1991), et cette interaction est nécessaire pour l'activation transcriptionnelle (Robert *et al.* 1993). De même la protéine c-rel interagit avec TFIIIB *in vitro* (Xu *et al.* 1993).

Néanmoins ces interactions n'expliquent pas toujours comment se transmet l'activation de la transcription par les facteurs de transcription spécifiques. En effet, quoique les interactions activateurs-TBP ou activateurs-facteurs généraux puissent contribuer au processus de l'activation, elles ne sont pas suffisantes pour l'expliquer. Par exemple les activateurs viraux Zta et E1A nécessitent la présence des TAFs pour *trans*-activer (Zhou *et al.* 1992). Dans ce cas ces co-facteurs joueraient un rôle subséquemment à la fixation de TBP.

De nombreux régulateurs transcriptionnels, qui par ailleurs n'interagissent pas directement avec les facteurs généraux de transcription, nécessitent également la présence des TAFs pour *trans*-activer et des interactions physiques entre ces régulateurs transcriptionnels et les TAFs ont été décrites. Par exemple, le facteur de transcription Sp1 interagit directement avec TAF_{II}110 (Hoey *et al.* 1993). L'analyse de mutants Sp1 ainsi que des expériences de reconstitution du complexe TFIID *in vitro* révèlent, d'une part, une étroite corrélation entre cette interaction et l'activation transcriptionnelle par Sp1 (Gill *et al.* 1994 ; Chen *et al.* 1994), d'autre part, que TAF_{II}250 est également nécessaire à l'activation de la transcription par Sp1 (Chen *et al.* 1994). TAF_{II}250 interagit directement avec TBP et pourrait donc constituer le lien entre Sp1 et TBP *via* TAF_{II}110 (FIGURE 8). De même l'activateur viral VP16 contacte TAF_{II}40 et, comme dans le cas de Sp1, cette interaction est nécessaire à son activation transcriptionnelle (Goodrich *et al.* 1993). Le facteur de transcription de drosophile NTF-1 contacte à la fois TAF_{II}60 et TAF_{II}150, ce dernier interagissant avec TBP (Chen *et al.* 1994). Comme TAF_{II}250 interagit avec de

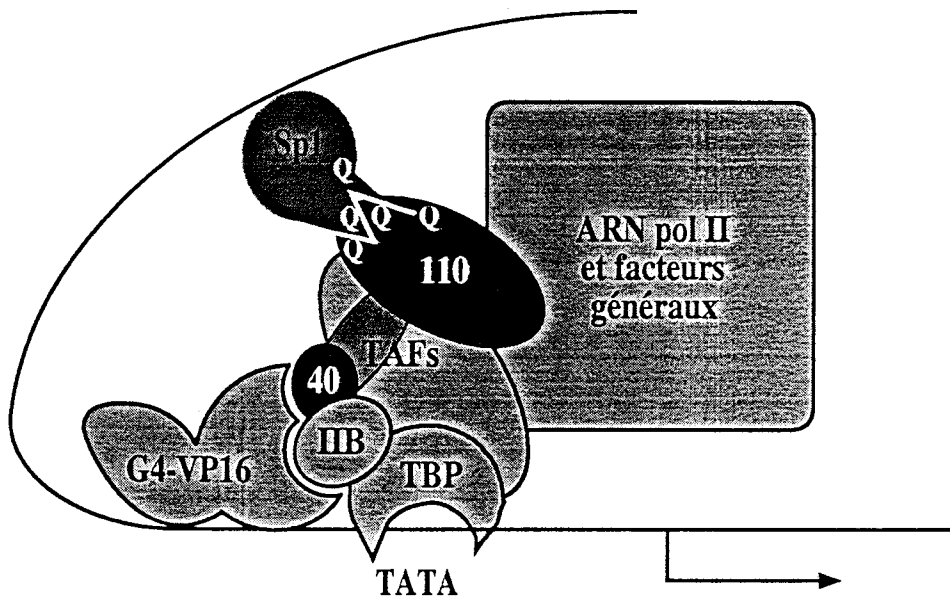


FIGURE 8 : L'activation de la transcription (d'après Tjian et Maniatis 1994).

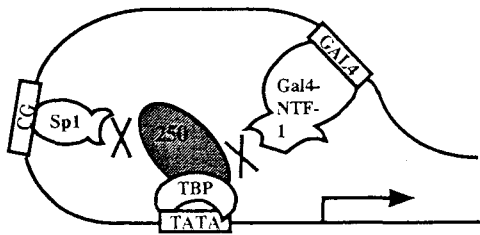
nombreux TAFs (décrits dans mise en évidence des TAFs comme co-activateurs), il pourrait donc représenter un moyen pour les facteurs de transcription de "communiquer" avec TBP (FIGURE 9). L'utilisation de lignées cellulaires thermosensibles pour les TAFs confirme l'importance du complexe TAF_{II}250-TBP dans la médiation de l'activation transcriptionnelle *in vivo* (Wang et Tjian 1994).

Ces données très récentes ont permis de proposer un modèle pour l'activation de la transcription. D'une part, les TAFs sont nécessaires à la transmission du signal activateur par les facteurs de transcription spécifiques, d'autre part, l'activation des facteurs de transcription spécifiques va passer par des TAFs différents (Chen J.-L. *et al.* 1994 ; Jacq *et al.* 1994). Il est important de noter que les interactions TAFs-facteurs de transcription spécifiques décrites ne sont que la partie émergente de l'iceberg, car tous les TAFs ne sont probablement pas connus de même que les différentes interactions existantes. Les expériences sont en effet réalisées à partir d'extraits de cellules Hela ainsi que pour certains facteurs de transcription. Il est alors tentant d'imaginer l'existence de TAFs exprimés de façon transitoire au cours du cycle cellulaire et /ou au cours du développement embryonnaire et présentant une spécificité d'expression tissulaire restreinte comme il l'est maintenant clairement démontré pour les facteurs de transcription.

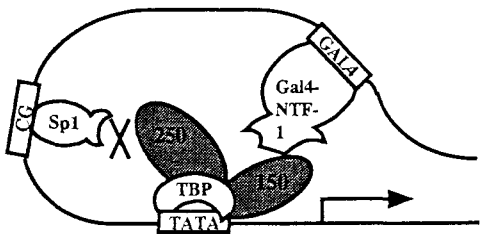
3/ LA RÉGULATION DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION SPÉCIFIQUES

L'expression des gènes étant sous le contrôle des facteurs de transcription spécifiques, toute modification de l'activité de ces derniers va se répercuter sur l'expression de leur gènes cibles et ainsi modifier la réponse cellulaire (prolifération ou différenciation).

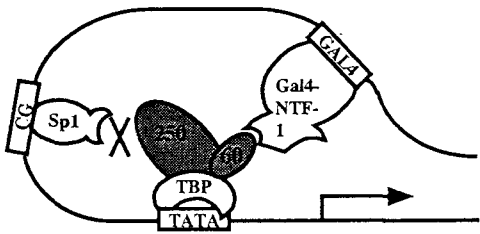
Ce chapitre est donc consacré à la description des différents mécanismes de régulation des facteurs de transcription spécifiques, et nous dégagerons à l'aide d'exemples précis divers événements susceptibles de modifier leur activité transcriptionnelle ainsi que leur capacité de fixation à l'ADN.



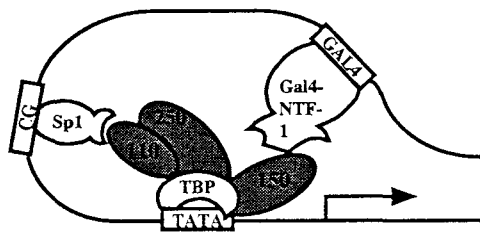
Le complexe minimal TBP/TAF₂₅₀ ne permet pas de transmettre l'activation de la transcription.



Des TAFs différentes sont impliquées dans l'activation de la transcription.



Le TAF110 est nécessaire à la transmission de l'activation par le facteur Sp1 .



Le complexe TFIID reconstitué *in vitro* peut transmettre l'activation provenant de facteurs de transcriptions différents.

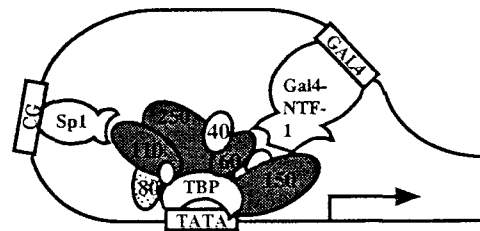


FIGURE 9 : Les co-activateurs et l'activation de la transcription (d'après Chen *et al.* 1994).

3.1 Les modifications post-traductionnelles

Les modifications post-traductionnelles peuvent moduler la capacité de fixation à l'ADN ainsi que l'activité transcriptionnelle des facteurs de transcription (voir revue d'Hunter et Karin, 1992).

3.1.1 Le statut d'oxydo-réduction

Le groupe de Curran a cloné une protéine appelée Ref1, qui a la particularité de modifier l'état d'oxydation/réduction d'un résidu cystéine situé au sein du domaine de liaison à l'ADN de la protéine c-Jun (Xanthoudakis et Curran 1992 ; Xanthoudakis *et al.* 1992). Lorsque cette cystéine est réduite, elle favorise la fixation de la protéine à l'ADN, par contre lorsqu'elle est oxydée elle rend impossible cette liaison. De plus, sa mutation en sérine favorise et rend la fixation à l'ADN indépendante de l'oxydo/réduction (Abate *et al.* 1990).

Cet acide aminé est très conservé dans toutes les protéines de la famille AP1, et aussi ATF/CREB, suggérant que cette régulation est commune à tous les membres de ces familles. Il est intéressant de noter que cet acide aminé régulateur est muté dans v-Jun et que cette mutation introduite dans Jun ou Fos favorise la transformation (Xanthoudakis *et al.* 1992).

L'impact du statut d'oxydo/réduction sur l'activité de liaison à l'ADN a été décrit pour d'autres facteurs tels que Myb et NFkB (Meyer *et al.* 1993) et très récemment pour le facteur E2A (Benezra 1994). Ce facteur, constitué des protéines isoformes E12 et E47 produites à partir du même locus du gène *E2A*, ne se fixe sur ses séquences cibles (boîtes E) que sous la forme d'un homodimère. L'homodimère E2A, instable dans les conditions cellulaires physiologiques (37°C), est stabilisé par la formation d'un pont di-sulfure, et ceci spécifiquement dans les cellules B où il peut alors réguler les gènes codant les immunoglobulines. Il existerait donc une activité d'oxydo-réduction qui serait dans ce cas spécifique d'un facteur de transcription et d'un type cellulaire particulier.

3.1.2 La phosphorylation/déphosphorylation

Les mécanismes de phosphorylation/déphosphorylation des facteurs de transcription représentent une réponse privilégiée aux stimuli externes auxquels est soumise la cellule. Ces processus peuvent affecter l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription, sa capacité à lier l'ADN, ainsi que son transport vers le noyau (revue de Hunter et Karin 1992) (FIGURE 10).

Un exemple de régulation par ce mécanisme est illustré par la protéine c-Jun, qui possède cinq sites principaux de phosphorylation sur des résidus sérine et thréonine (Boyle *et al.* 1991). Deux sites sont présents sur les sérines 63 et 73 situées dans le domaine d'activation transcriptionnelle de la protéine et la phosphorylation de ces résidus résulte en une augmentation de l'activité *trans*-activatrice de la protéine (Smeal *et al.* 1991, 1992, 1994). Le groupe de M. Karin a récemment isolé une protéine kinase spécifique pour la phosphorylation de ces résidus sérine (Hibi *et al.* 1993). Mais la phosphorylation peut aussi inhiber l'activité de ce facteur de transcription. En effet, trois sites de phosphorylation (thréonine 231, sérines 243 et 249) sont présents à proximité du domaine de liaison à l'ADN de la protéine c-Jun. La phosphorylation *in vitro* par la caséine kinase II de deux de ces sites (sérine 249 et thréonine 231) a pour conséquence d'inhiber la fixation à l'ADN de la protéine Jun produite par bactérie recombinante. Cet effet est réversible suite à un traitement à la phosphatase (Lin *et al.* 1992).

Ce mécanisme régule également d'autres membres AP1. Ainsi la protéine c-Fos est également phosphorylée mais le rôle de la phosphorylation est moins bien compris. Il semble que la phosphorylation de trois sérines est importante pour la capacité de la protéine c-Fos à réprimer son propre promoteur, sans faire intervenir son activité de liaison à l'ADN (Lucibello *et al.* 1989 ; Gius *et al.* 1990 ; Ofir *et al.* 1990). Un travail récent a permis d'établir que les membres Fra1 et Fra2 sont également phosphorylés au cours du cycle cellulaire et que la phosphorylation affecte leur activité de liaison à l'ADN (Gruda *et al.* 1994).

Des mécanismes similaires ont été rapportés pour les protéines c-Myb et c-Ets1 pour lesquelles la phosphorylation inhibe la capacité de liaison à l'ADN (Lüscher *et al.* 1990 ; Rabault et Ghysdael 1994), ainsi que pour la protéine CREM qui est le siège de

Mécanisme de régulation	Protéine	Effet de la phosphorylation
Régulation du transport au noyau	SW15	La phosphorylation de Ser-552, Ser 646, et Ser-664 par Cdc28 dans SW15 inhibe le transport nucléaire
	NF- κ B	La phosphorylation de sous-unité I κ B provoque le transport nucléaire
	C/EBP β	Activation de la transcription
	NF-AT	?
	ISGF3	Tyrosine phosphorylation de ISGF3a
Régulation de la fixation à l'ADN		
Inhibition de la fixation	c-Myb	CKII La phosphorylation de Ser-11/12 par CKII inhibe la liaison à l'ADN
	c-Jun	La phosphorylation d'un ou plusieurs sites dans Thr-231-Ser-249 par GSK-3 ou CKII inhibe la liaison à l'ADN
	Max	La phosphorylation of Max par CKII inhibe la fixation à l'ADN des homodimères Max
	Myogenin	La phosphorylation dans le domaine de liaison à l'ADN inhibe la liaison à l'ADN
	Oct1	La phosphorylation de Sr-385 dans le domaine de liaison à l'ADN inhibe la liaison à l'ADN pendant la mitose
	GHF-1/Pit1	La phosphorylation de Thr-220 par PKA ou PKC inhibe la liaison à l'ADN sur certains éléments de réponse
Stimulation de la fixation	SRF	CKII phosphorylation de sites en dehors du domaine de liaison à l'ADN augmente la fixation
	E2F and E4F	La phosphorylation augmente l'activité de liaison à l'ADN
	CREM	La phosphorylation augmente l'activité de liaison à l'ADN
Régulation de la transactivation		
Stimulation de la transactivation	CREM	La phosphorylation de Ser-117 par PKA (ou CAM kinases I ou II) stimule la transactivation
	CREB	La phosphorylation de Ser-133 par PKA (ou CAM kinases I ou II) stimule la transactivation
	c-Jun	La phosphorylation de Ser-67/73 en réponse aux mitogen/oncoprotéines stimule la transactivation
	c-Myc	La phosphorylation de Ser-62 stimule la transactivation
	C/EBP β	La phosphorylation de Ser-276 stimule la transactivation
	GAL4	La phosphorylation stimule la transactivation
	Yeast HSF	La phosphorylation stimule la transactivation
	STE12	La phosphorylation stimule la transactivation
Stimulation de la transrépression	c-Fos	La phosphorylation d'un ou plusieurs sites dans les 20 résidus C-terminaux est requise pour la transrépression
Inhibition de la transactivation	v-ErbA	La phosphorylation de Ser-16/17 par PKA ou PKC est nécessaire à la répression de l'activité c-ErbA
	ADR1	La phosphorylation de Ser-230 par PKA inhibe la transactivation

FIGURE 10 : Régulation des facteurs de transcription par phosphorylation (d'après Hunter et Karin 1992). CKII : Caséine Kinase II ; PKA : Protéine Kinase A ; PKC : Protéine Kinase C.

phosphorylations multiples et coopératives augmentant sa capacité de liaison à l'ADN et son activité transcriptionnelle (De Groot *et al.* 1993, 1994).

Ce mécanisme de contrôle permet donc de moduler, positivement ou négativement, l'activité du facteur déjà présent dans la cellule, et ainsi de répondre très rapidement aux stimuli externes (facteurs de croissance, hormones) sans nécessité de synthèse *de novo*.

3.1.3 La dégradation

Ce contrôle met en jeu des mécanismes de reconnaissance et de mise en route d'un processus de dégradation. Un peptide appelé ubiquitine peut être fixé en concatémères sur certains résidus de la protéine (préférentiellement une lysine). Le complexe ainsi formé est rapidement dégradé par une protéase (revue de Ciechanover 1994) (FIGURE 11). Ce mécanisme, mis en évidence pour l'anti-oncogène p53, qui est instable lorsqu'il est complexé à la protéine virale E6 et dégradé par la voie d'ubiquitination, a été récemment montré comme régulant également la stabilité de la protéine c-Jun (Treier *et al.* 1994). La phosphorylation peut également provoquer un signal de dégradation (revue de Ciechanover 1994).

Enfin ce processus de dégradation peut activer une fonction. En effet, l'ubiquitination a lieu sur le précurseur inactif du facteur de transcription NF κ B (protéine de 105 kDa), et résulte par clivage protéolytique en la formation d'une forme active (de 65 kDa) de ce facteur de transcription (Palombella *et al.* 1994).

3.1.4 La compartimentation

Le facteur de transcription doit se localiser dans le noyau pour être fonctionnel. Après synthèse dans le cytoplasme, il y a transport actif dans le noyau, étape qui peut être régulée. Des séquences de translocation nucléaire sont généralement présentes dans les facteurs de transcription. Un exemple type est le facteur de transcription NF κ B dont l'expression est pleiotrope (revue de Lenardo et Baltimore 1989). NF κ B est présent sous une forme active dans le noyau d'un nombre restreint de types cellulaires. Dans la plupart des autres cellules, il se trouve sous forme inactive dans le cytoplasme, associé à un inhibiteur appelé I κ B. La

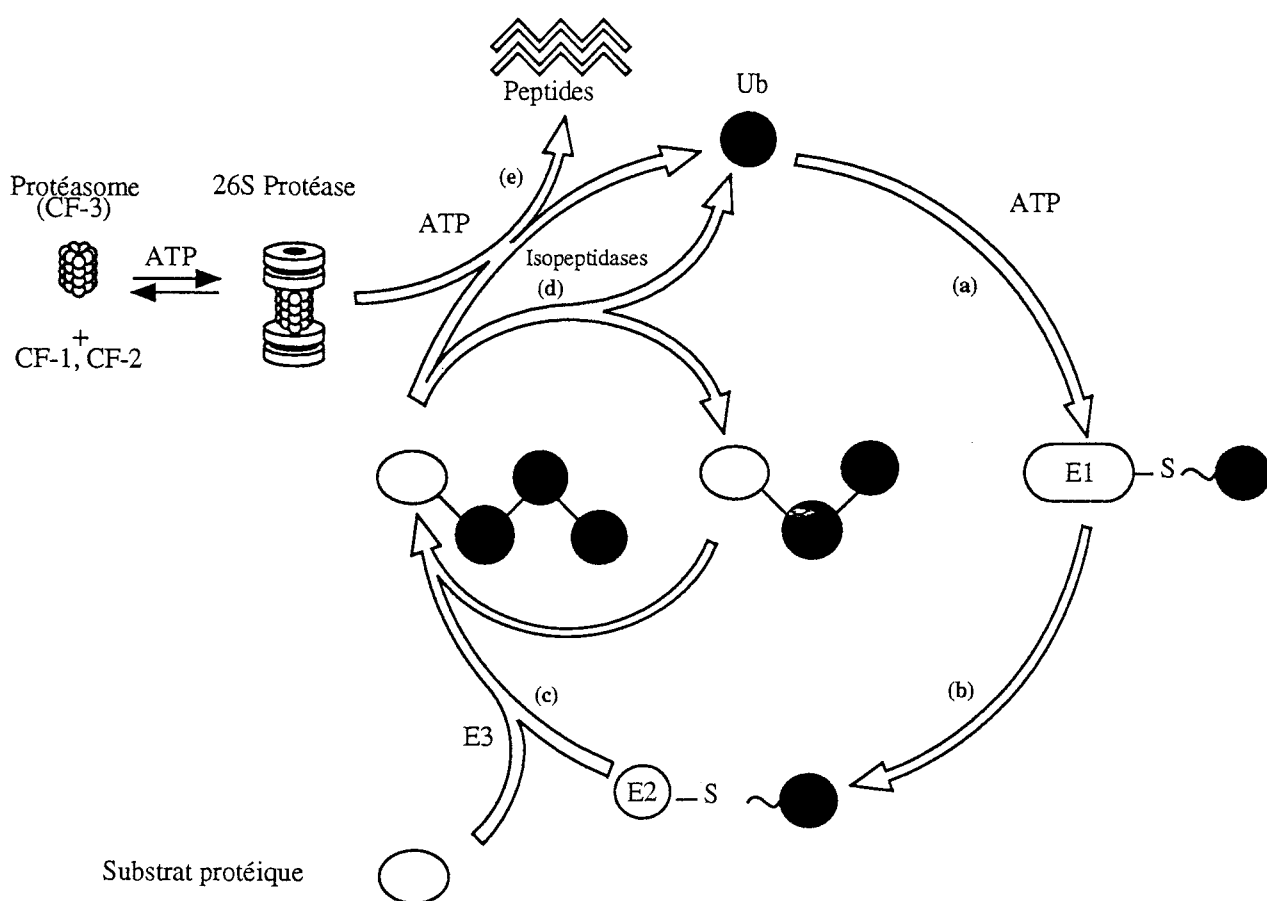


FIGURE 11 : La voie de dégradation de l'ubiquitine. E1, E2, E3 sont des complexes protéiques (d'après Hoschstrasser 1992). Ub : Ubiquitine. Ce mécanisme de dégradation nécessite la présence d'ATP. L'Ub est prise en charge par différents complexes enzymatiques (E1 à E3) avant d'être fixée par liaison covalente à la protéine. L'Ub est recyclée après dégradation de la protéine.

phosphorylation d'I κ B provoque sa dégradation et libère NF κ B qui peut alors migrer dans le noyau (Alkalay *et al.* 1995, Donato *et al.* 1995, Lin *et al.* 1995, revue Thanos et Maniatis 1995).

3.1.5 Le repliement intramoléculaire

Ce mécanisme connu depuis fort longtemps chez les procaryotes par passage d'une forme inactive à une forme active suite à un changement conformationnel, vient d'être décrit récemment dans les espèces supérieures.

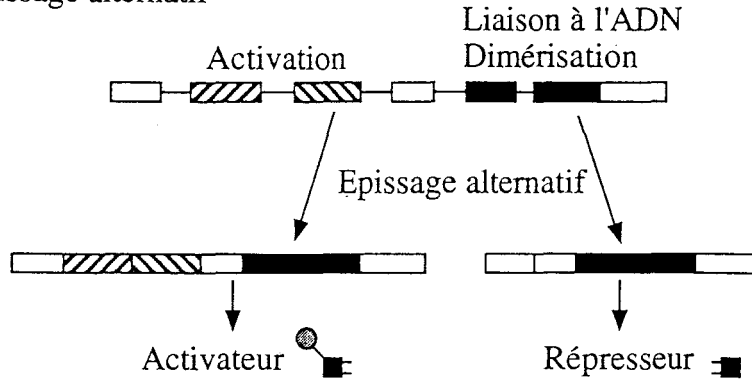
Un tel modèle a été proposé pour rendre compte des différences d'activité de liaison à l'ADN entre les protéines c-Ets1 et v-ets (Lim *et al.* 1992). Le repliement dans ce cas agirait au niveau du domaine de liaison à l'ADN (masquage/démasquage). Par contre pour la protéine C/EBP β (protéine se fixant sur le motif CCAAT et appelée également NFM ou NFIL-6), ce serait le domaine *trans*-activateur qui serait le siège d'une telle régulation (Kowentz-Leutz *et al.* 1994).

3.2 La présence d'inhibiteurs

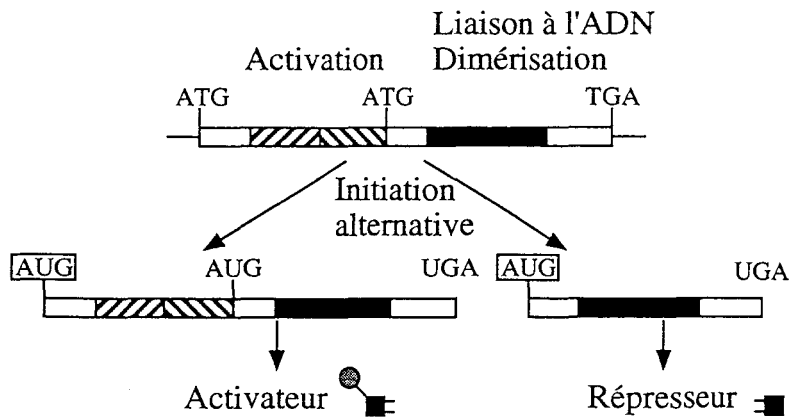
L'identification et le clonage du gène codant la protéine Id a permis d'isoler un inhibiteur des protéines à domaine de dimérisation de type HLH. La protéine Id possède le domaine HLH de dimérisation mais pas de domaine de liaison à l'ADN. Il en résulte la formation de dimères en solution (par exemple MyoD/Id) incapables de lier l'ADN (Benezra *et al.* 1990). Dans certains cas les gènes peuvent coder à la fois des activateurs et des inhibiteurs de la transcription (FIGURE 12). Ainsi, les protéines de la famille POU produisent par épissage alternatif des protéines activatrices et inhibitrices. Par exemple la protéine twin of I-POU est un régulateur positif de la transcription alors que l'isoforme I-POU, incapable de se fixer à l'ADN, régule négativement l'activité du facteur de transcription Cf1-a en formant des hétérodimères inactifs en solution (Treacy *et al.* 1992) (FIGURE 13).

Différentes familles de facteurs de transcription génèrent des répresseurs spécifiques des formes activatrices. Ainsi le clonage d'une forme épissée du gène *FosB* (appelée Δ FosB ou FosB2) a permis de mettre en évidence une protéine sans domaine d'activation transcriptionnelle, capable de se dimériser avec Jun et de réprimer la transcription du complexe

Epissage alternatif



Initiation de la traduction alternative



Modèle de régulation transcriptionnelle

- Domaine de liaison à l'ADN et de dimérisation
- Domaine d'activation



FIGURE 12 : Activateur et répresseur à partir du même gène (d'après Foulkes et Sassone-Corsi 1992). Des protéines sans domaine d'activation transcriptionnelle sont produites par épissage alternatif de l'ARNm ou par initiation interne de la traduction dans l'ARN. Ces protéines "tronquées" agissent comme répresseurs.

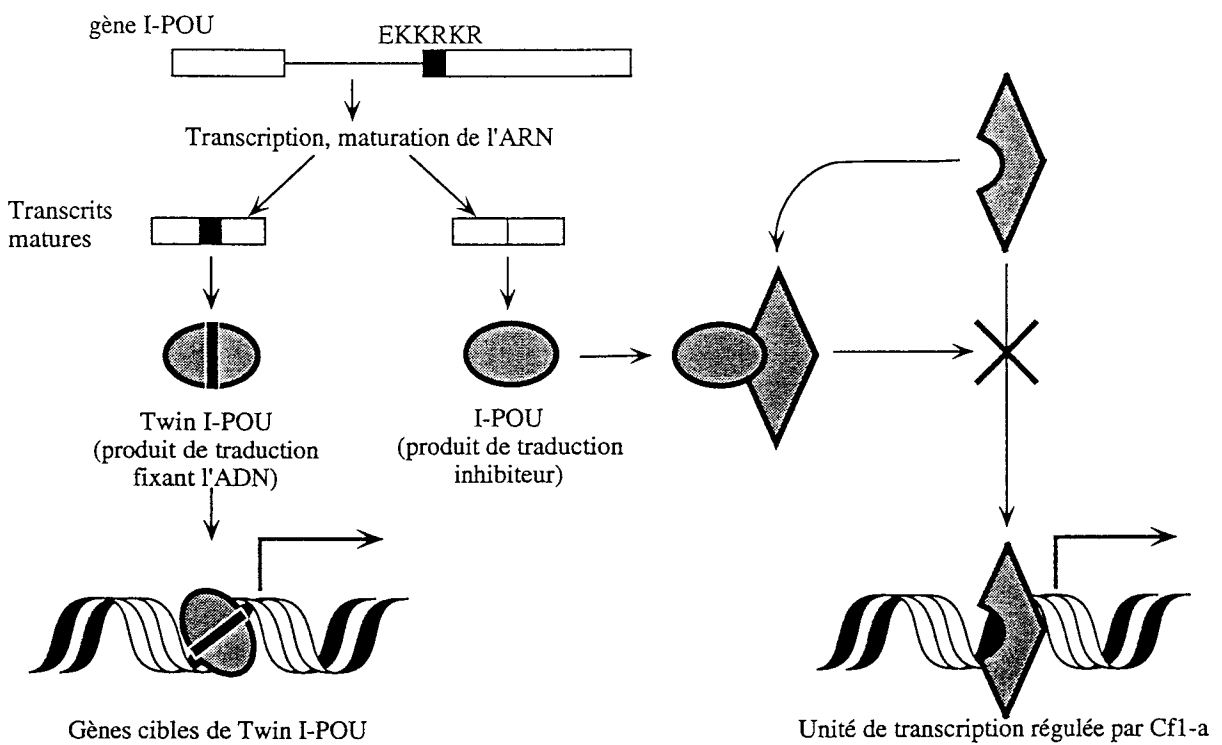


FIGURE 13 : Activateur et répresseur à partir du même gène (d'après Treacy *et al.* 1992).

AP1 formé (Mumberg *et al.* 1991 ; Nakabeppu et Nathans 1991 ; Yen *et al.* 1991). La balance entre les isoformes FosB et Δ FosB module l'activité du facteur AP1. Il en est de même du gène *CREM* (pour cAMP-responsive element modulator) qui produit par initiation interne, par épissage alternatif ou par utilisation de promoteurs alternatifs, des protéines activatrices ou inhibitrices de la transcription (revue de Foulkes et Sassone-Corsi 1992 ; Molina *et al.* 1993). La forme inhibitrice est dépourvue de domaine d'activation de la transcription mais peut encore lier l'ADN. Le mécanisme d'inhibition est comparable avec celui de Δ FosB. On peut citer également le cas du gène *HNF1* (pour Hepatocyte Nuclear Factor 1) qui produit une protéine à homéodomaine épissée dans le domaine *trans*-activateur et inhibitrice sur la forme activatrice de la transcription. L'inhibition se fait par dimérisation ou compétition de fixation avec l'isoforme activatrice (Bach et Yaniv 1993).

4/ DIFFÉRENTS ÉLÉMENTS RENDENT COMPTE DE LA SPÉCIFICITÉ D'EXPRESSION DES GÈNES

4.1 Le positionnement nucléosomal

In vivo, l'ADN est engagé dans une structure appelée chromatine. L'unité de base de la chromatine est le nucléosome, constitué d'un noyau central protéique dit "octamère", formé par l'association de deux molécules de chacune des histones H2A, H2B, H3 et H4, entouré par deux tours d'ADN (totalisant 160 bp) (Hayes *et al.* 1991). Une molécule d'histone H1 interagit avec l'ADN à l'extérieur du nucléosome. Cette structure nucléosomale se retrouve fréquemment au niveau des régions promotrices et régulatrices des gènes. Selon le contexte, le nucléosome peut être considéré comme une structure de répression ou d'activation.

4.1.1 Le nucléosome, structure de répression

L'importance des nucléosomes et de l'état de condensation de la chromatine dans la transcription est connu, d'une part, par l'observation historique que les zones d'ADN transcrites sont des régions où l'ADN est peu condensé car le mécanisme de transcription décondense la chromatine, d'autre part, par des expériences de génétique chez la levure. En utilisant des gènes

d'histone inductibles, Grunstein *et al.* (1992) ont montré que trois gènes (*PHO5*, *CUP1* et *HIS3*), réprimés lorsque les histones sont exprimées, sont transcrits dès que l'expression des histones est réprimée.

L'agencement particulier des nucléosomes peut empêcher l'accessibilité des facteurs de transcription sur l'ADN. En effet, la fixation des facteurs de transcription est augmentée suite à la désorganisation de la chromatine induite par la nucléoplasmine, une protéine liant les histones (Chen H. *et al.* 1994).

Des exemples de l'importance des nucléosomes dans la répression des gènes par inaccessibilité/accessibilité de séquences sont illustrés par la régulation du promoteur du virus MMTV (pour mouse mammary tumor virus) et du promoteur du gène *PHO5* chez la levure (Bresnick *et al.* 1992 ; Lee et Archer 1994 ; Straka et Horz 1991). L'étude de l'activation transcriptionnelle de ces promoteurs a permis d'établir un modèle constitué de trois étapes :

1/ le positionnement particulier des nucléosomes sur le promoteur va permettre l'accessibilité de certains facteurs de transcription spécifiques sur leurs séquences ;

2/ la fixation de ces facteurs de transcription spécifiques peut rompre la structure nucléosomale qui rendra alors accessible les séquences de reconnaissance d'autres facteurs de transcription spécifiques ainsi que la boîte TATA ;

3/ ces autres facteurs de transcription spécifiques ainsi que les composants de la machinerie transcriptionnelle peuvent alors se fixer et réguler le promoteur.

Par exemple, en ce qui concerne le promoteur du virus MMTV (revue de Wolffe 1994), celui-ci est réprimé en absence de glucocorticoïdes et il est dans ce cas incorporé dans six nucléosomes. Deux nucléosomes contiennent les éléments de promotion principaux (FIGURE 14). La fixation du récepteur des glucocorticoïdes sur sa séquence cible (le site est accessible) induit une chaîne d'événements aboutissant à la désorganisation de la structure du nucléosome et au déplacement de l'histone H1. Cette étape est nécessaire pour permettre la fixation du facteur NF1 qui facilite alors l'assemblage d'un complexe transcriptionnel fonctionnel.

Des expériences de reconstitution *in vitro* établissent un rôle important de l'histone H1 dans ces mécanismes de régulation. En effet, les structures chromatiniennes sont plus accessibles aux

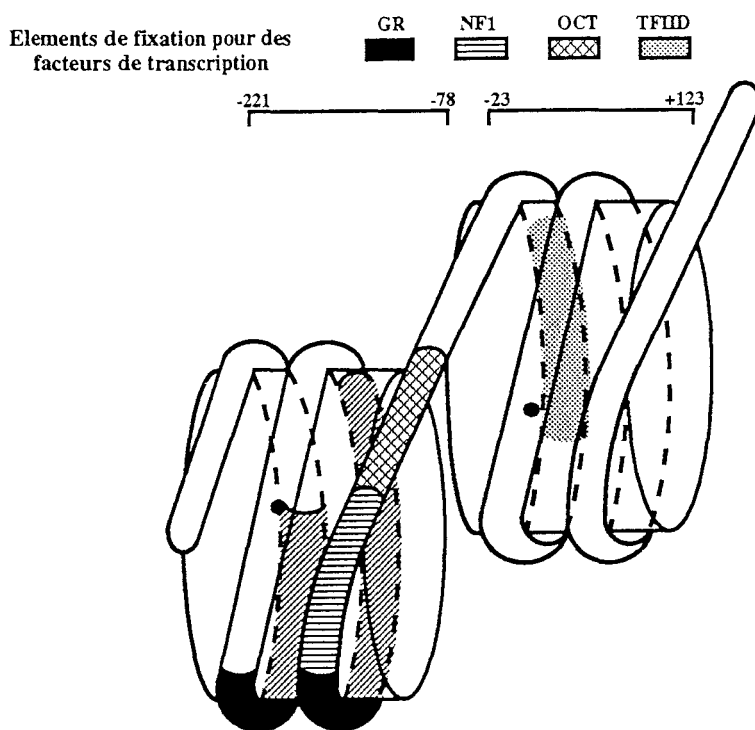


FIGURE 14 : Le nucléosome et le promoteur du virus MMTV (d'après Wolffe 1994).

facteurs de transcription spécifiques quand elles ne contiennent pas l'histone H1 (Almouzni *et al.* 1991 ; Kamakaka *et al.* 1993). De plus, l'assemblage préalable des octamères d'histones sur un promoteur contenant des sites de fixation pour l'activateur GAL4-VP16 n'empêche pas cette protéine de se fixer sur ces séquences, mais la présence de l'histone H1 réduit sensiblement sa capacité à *trans*-activer (Workman et Kingston 1992 ; Almouzni et Wolffe 1993). Néanmoins, il a été montré récemment chez la drosophile que la répression transcriptionnelle n'impliquait pas toujours l'histone H1 (Sandaltzopoulos *et al.* 1994).

Ainsi l'incorporation de la boîte TATA et des séquences de régulation dans des structures nucléosomales sert à maintenir un état de répression. La transcription nécessite la désorganisation des structures nucléosomales, notamment celles associées à la boîte TATA. Ce processus impliquerait l'intervention d'un complexe "activateur général" encore non défini dont le rôle serait de rompre l'interaction des histones H3-H4 avec l'ADN (revue de Lewin 1994).

4.1.2. Le nucléosome, structure d'activation

La mécanistique d'activation de la transcription, exposée ci-dessus, a été réalisée *in vitro* sur des promoteurs artificiels, ce qui ne pose pas de problèmes dans la modélisation des interactions protéines-protéines entre les facteurs de transcription spécifiques, les TAFs et les facteurs généraux de transcription puisque les sites de fixation sont très proches. Cependant *in vivo*, les sites de fixation des régulateurs transcriptionnels peuvent être très éloignés du promoteur. Notamment des régions d'ADN appelées "enhancer" ou amplificateurs sont capables de réguler un gène de façon tissu-spécifique et ceci en étant situées parfois à des dizaines ou des milliers de paires de bases du promoteur.

Comment se réalise la transmission de l'activation du facteur de transcription spécifique lorsque celui-ci se fixe sur des amplificateurs très éloignés du promoteur ? Il est maintenant démontré que les facteurs de transcription spécifiques fixés sur l'amplificateur interagissent directement avec les composants de la machinerie transcriptionnelle (Müller *et al.* 1989). Ceci est possible grâce à la structure chromatinienne qui permet à des régions d'ADN séparées parfois

de plusieurs milliers de paires de bases, d'être proches topologiquement, ce qui favorise ainsi la communication entre des éléments de régulation distants (FIGURE 15).

En effet, pour les promoteurs du gène *HSP26* et celui de l'*alcool déshydrogénase* de *drosophile*, l'agencement des nucléosomes induit une structure tridimensionnelle de l'ADN qui permet la juxtaposition (rapprochement) des éléments de régulation espacés (revue de Wolffe 1994). Pour le gène de la *vitellogénine* (*vitelline*) chez le xénope, la reconstitution *in vitro* de nucléosomes entre le promoteur et l'amplificateur augmente l'activité de ce dernier d'un facteur 10 (Schild *et al.* 1993). Des résultats obtenus *in vivo* semblent confirmer l'importance des nucléosomes entre des éléments de régulation lointains (Cullen *et al.* 1993). De plus, il semblerait que la fixation de facteurs de transcription spécifiques sur des séquences activatrices puisse dicter un positionnement nucléosomal particulier aboutissant à la formation d'une structure activatrice fonctionnelle (McPherson *et al.* 1993).

4.2 Les séquences de reconnaissance à l'ADN

Les promoteurs et les éléments régulateurs (amplificateurs) des gènes contiennent des séquences de fixation pour les facteurs de transcription spécifiques divers et multiples (appelées éléments *cis*) qui gouvernent l'expression spatiale et temporelle des gènes dans l'embryon. Ces éléments peuvent être localisés en amont ou en aval, à proximité ou à distance du site d'initiation du gène. Il apparaît donc que la présence ou l'absence de sites de fixation dicte en partie la spécificité d'expression des gènes (nous verrons en effet que certaines protéines peuvent réguler des gènes en l'absence de fixation à l'ADN).

Les différentes familles de facteurs de transcription reconnaissent en général des séquences d'ADN différentes. Cette particularité impose un niveau de régulation par l'intermédiaire des séquences de reconnaissance. L'expression d'un gène est par conséquent dépendante du type de séquence de régulation présente au sein de son promoteur ou dans les régions régulatrices. Cette évidence a comme conséquence d'aboutir à des régulations très complexes, puisqu'un gène est généralement soumis à plusieurs régulateurs positifs ou négatifs.

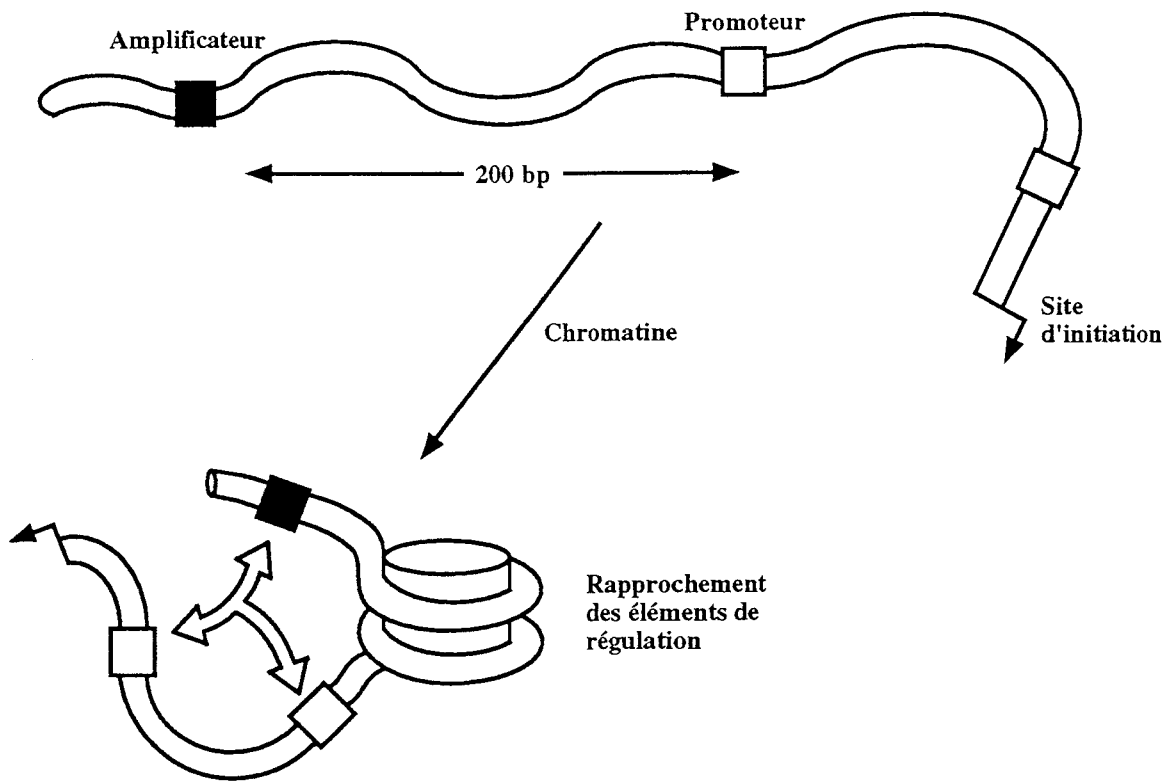


FIGURE 15 : Rôle du nucléosome dans l'activation de la transcription (d'après Wolffe 1994).

4.2.1 Compétition pour la fixation

Il existe des cas où deux séquences de fixation pour des activateurs différents sont imbriquées l'une dans l'autre, ce qui entraîne une compétition pour la fixation des facteurs (FIGURE 16). C'est le cas du promoteur du gène de l'*ostéocalcine*, qui possède un site de réponse à l'acide rétinoïque et à la vitamine D3 (appelé HRE pour hormon responsive element) qui transmet une activation transcriptionnelle. L'activation de la transcription par l'acide rétinoïque et la vitamine D3 est réprimée par le facteur AP1, dont le site de fixation est contenu dans le site HRE. La répression est donc expliquée par une compétition pour la fixation entre le récepteur nucléaire et le facteur AP1 (Schüle *et al.* 1990). Le même type de mécanisme est proposé pour le gène *c-Fos* dont l'activation par les oestrogènes est réprimée par AP1. Le promoteur de ce gène possède en effet un site AP1 imbriqué dans la séquence de fixation du récepteur aux oestrogènes (Weisz et Rosales 1990).

4.2.2 Sélectivité pour les séquences de fixation

Des bases situées en dehors du site de reconnaissance peuvent également déterminer la spécificité de fixation.

Par exemple, les gènes *Hox* codent des protéines à homéodomaine qui dirigent l'identité des différents segments présents le long de l'axe antéro-postérieur de l'embryon. De nombreuses protéines à homéodomaines (telle que HOXD-4) régulent leur propre expression par un mécanisme d'autorégulation (Serfling 1989). Bien que les protéines HOX reconnaissent des séquences consensus très similaires dont le motif central est TAAT (Hoey et Levine 1988 ; Pellerin *et al.* 1994), la protéine HOXA-1 est incapable de réguler le promoteur du gène *Hoxd-4*, alors que la protéine HOXD-4 active fortement la transcription de son promoteur par l'intermédiaire de motifs TAAT. Ce mécanisme est lié à une absence de reconnaissance à l'ADN de HOXA-1 pour des sites de type HOXD-4, alors que HOXA-1 régule la transcription positivement par l'intermédiaire d'autres séquences. Cette différence de reconnaissance est liée au type d'acides aminés présents dans la partie amino-terminale de l'homéodomaine, située en dehors des hélices de reconnaissance, et qui confère une contrainte supplémentaire dans la

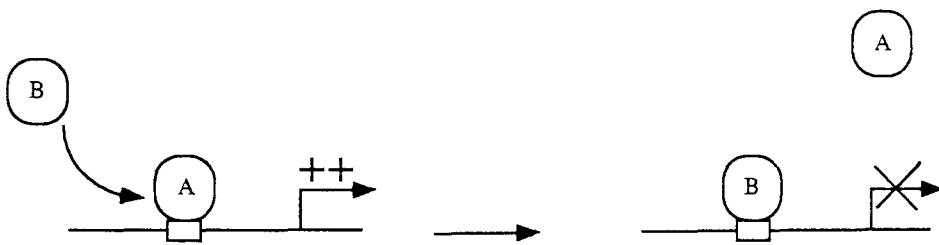


FIGURE 16 : Compétition pour la fixation.

sélection des séquences de reconnaissance (Phelan *et al.* 1994). Dans ce mécanisme, les séquences adjacentes au site de fixation homéo (TAAT) joueraient un rôle important dans la sélectivité des sites de fixation *in vivo*.

Des séquences adjacentes au site de fixation sont impliquées dans la régulation tissulaire spécifique des amplificateurs des gènes de la créatine kinase musculaire (*MCK* pour muscle creatine kinase) et des immunoglobulines H (*IgH*). Chacun de ces amplificateurs est régulé par la fixation de protéines de type bHLH sur des séquences CANNTG (appelées boîtes E). L'amplificateur du gène *MCK* est activé par l'hétérodimère MyoD/E12 dans le muscle alors que celui du gène des *IgH* est régulé dans les lymphocytes B par l'homodimère E12/E12. Or il apparaît que MyoD est capable de fixer les boîtes E présentes au sein de l'amplificateur du gène des *IgH* mais il est incapable d'activer la transcription de ce gène. Weintraub *et al.* (1994) ont montré que l'absence d'activation par MyoD sur cette séquence dépend de la nature des deux bases adjacentes à la boîte E qui agissent en *cis* pour l'inhibition d'activation par MyoD (FIGURE 17). Ces auteurs suggèrent que MyoD n'active que des gènes musculaires spécifiques car les séquences régulatrices qui ne sont pas spécifiques du muscle contiennent des "éléments" négatifs empêchant l'activité de MyoD. Donc, outre les séquences de reconnaissance strictes pour un facteur de transcription donné, les séquences adjacentes jouent un rôle dans la spécificité de régulation .

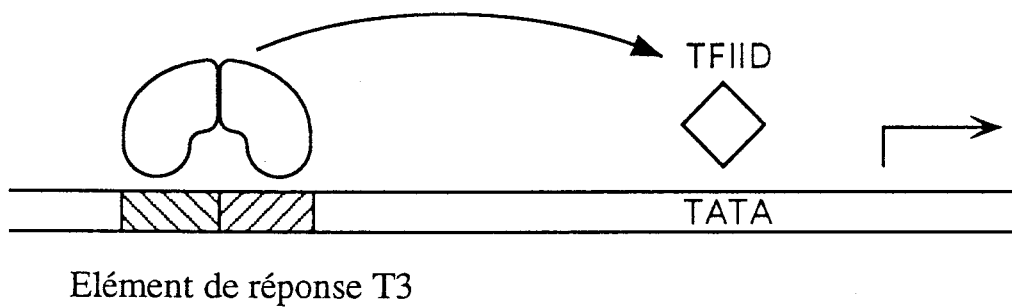
4.2.3 L'espacement des sites de fixation dicte la réponse transcriptionnelle

En plus de la contrainte apportée par le type d'éléments *cis* présents sur le promoteur, il apparaît qu'un type de site de fixation peut être reconnu par plusieurs facteurs différents, qui peuvent appartenir à la même famille. Par exemple, plusieurs protéines à homéodomaine peuvent fixer des séquences identiques (Hoey et Levine 1988 ; Pellerin *et al.* 1994). Il en est de même, pour les récepteurs nucléaires : les séquences de reconnaissance pour les récepteurs aux oestrogènes, aux hormones thyroïdiennes et à la vitamine D sont identiques. Ce sont l'orientation relative, ainsi que, l'espacement qui dictent la réponse transcriptionnelle (c'est-à-dire l'activation ou l'inhibition) (Glass *et al.* 1989 ; Umesono *et al.* 1991 ; Näär *et al.* 1991) (FIGURE 18). Le

	MyoD	E12
TCCCCTGCAGGTC TT CCAGA	-	++
AGGGGACGTCCAC AA GGTCT		
TCCCAGGCAGGTC GC CCAGA	++	+
AGGGTCCGTCCAC CC GGTCT		

FIGURE 17 : Importance des séquences adjacentes au site de fixation E Box pour la régulation transcriptionnelle (d'après Weintraub *et al.* 1994). Le - révèle une absence de *trans*-activation. Les + indiquent une *trans*-activation.

Le récepteur T3 fixe l'élément de réponse T3 et est transcriptionnellement actif



Le récepteur T3 fixe l'élément de réponse séparé et est transcriptionnellement inactif

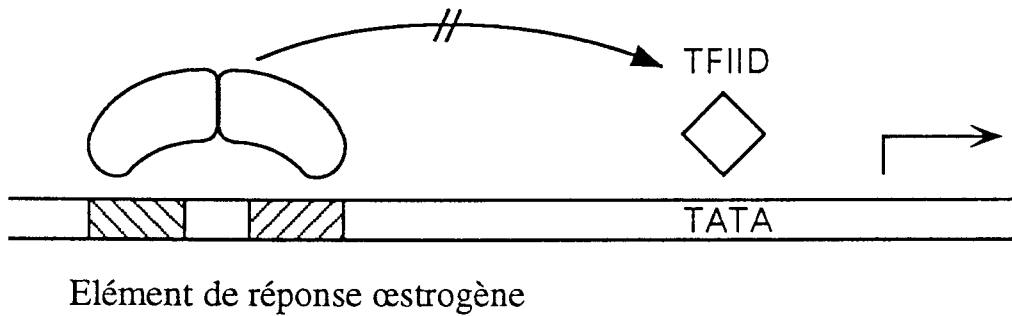


FIGURE 18 : Importance de l'espacement des hémi-sites de fixation pour la régulation transcriptionnelle par les récepteurs nucléaires (d'après Glass *et al.* 1988).

site de fixation est constitué de deux hémi-sites identiques (le récepteur nucléaire agit sous forme de dimère). Les trois orientations possibles des deux hémi-sites de fixation (répétée directe et répétée inversée) dicte le type de régulation (positive ou négative) pour chaque récepteur (Näär *et al.* 1991). De plus, l'espacement entre ces deux hémi-sites sera responsable de la différence de régulation. Ainsi, le récepteur de l'hormone thyroïdienne T3 fixe des sites reconnus par le récepteur aux oestrogènes. Le récepteur T3 qui régule positivement la transcription lorsque les deux hémi-sites de fixation sont accolés (pas d'espacement), se comporte comme régulateur neutre ou négatif lorsque les deux hémi-sites sont espacés de trois bases, et complète dans ce cas l'activation médiée par le récepteur aux oestrogènes, (Glass *et al.* 1988). L'espacement entre les hémi-sites dicte également le type de dimère qui fixera la séquence (FIGURE 19).

Le même type de mécanisme de régulation a été décrit pour les protéines à homéodomaine POU, protéines contenant un domaine de liaison à l'ADN bipartite (POU_S et POU_{HD}). L'espacement entre le site de fixation de type homéo (POU_{HD}) et celui de type POU (POU_S) détermine en effet la réponse transcriptionnelle des facteurs de cette famille Brn2 et Brn3. La protéine Brn2 tolère un espacement de 0, 1, 2 ou 3 bases entre les deux motifs alors que Brn3 ne fixe que des séquences possédant un espacement de 3 bases entre le motif de fixation POU et Homéo (Li *et al.* 1993) (FIGURE 20). Ce mécanisme est particulièrement intéressant car il montre que la présence de deux domaines de reconnaissance à l'ADN au sein de la même protéine peut conférer une spécificité face aux séquences de reconnaissance.

4.2.4 Coopérativité et synergie

La proximité de séquence de reconnaissance pour des facteurs de transcription peut engendrer un mécanisme de coopérativité entre facteur pour la fixation, la fixation de la deuxième molécule étant facilitée celle de la première molécule. Ce mécanisme peut être illustré par le cas des protéines à homéodomaine de type paired.

La présence d'un site de fixation palindromique ATTAC/GTAAT permet la fixation de deux molécules une affinité de fixation à l'ADN pour la deuxième molécule protéique augmentée

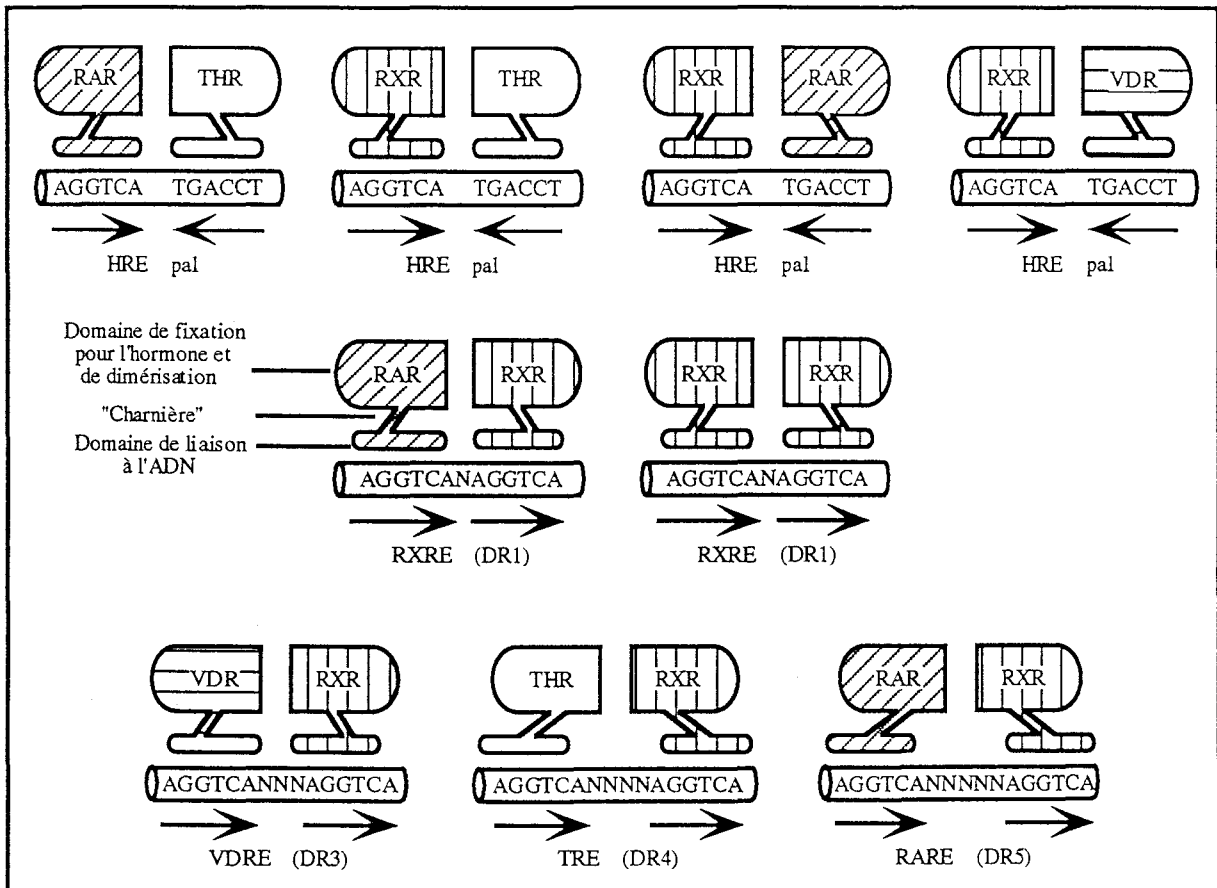


FIGURE 19: Importance de l'espacement des héli-sites de fixation pour la reconnaissance à l'ADN de différents hétérodimères et récepteurs nucléaires (d'après Laudet et Stéhelin 1992). RAR : récepteur acide rétinoïque tout *trans* ; RXR : récepteur à l'acide rétinoïque 9-*cis* ; THR : récepteur hormones thyroïdiennes ; VDR : récepteur vitamine D.

Sous-classe	Espacement	Consensus	Exemple
III	0	$CAT_A^T AAT$	Ddc (cf1a): <u>CATAAAT</u>
	2	$CATN_2^T AAT$	P ₀ (Tst-1): <u>CATTCTAAT</u>
	3	$CATN_3^T AAT$	CRH II (Brn2): <u>CATAAATAAT</u>
IV	3	$CATN_3^T AAT$	Mec-3 (unc-86): <u>CATTCGTAAT</u> <u>CATAAGTAAT</u> <u>CATCGGTAAT</u> <u>CATTAATAAT</u> <u>CATCTATAAT</u> CE-2 (Brn-3): <u>CATCCTAAT</u>

FIGURE 20 : Importance de l'espacement entre sites de reconnaissance POU_S et POU_{HD} pour la reconnaissance à l'ADN de différentes classes de protéines POU (d'après Li *et al.* 1993).

de 300 fois par rapport à la première molécule (Wilson *et al.* 1993). Le taux d'activation transcriptionnelle obtenue sur ce type de séquence est très élevé et décelable à faible quantité de facteur de transcription alors qu'un site de fixation non dimérisé requiert de fortes concentrations du même facteur pour répondre positivement (Wilson *et al.* 1993). Ainsi, le type de séquence de fixation dictera la sensibilité d'induction d'un gène par rapport à un autre, ceci en fonction de la quantité de *trans*-activateur.

La présence de sites de reconnaissance multiples proches les uns des autres permettant une coopérativité de fixation est également décrite pour la protéine Zeste de drosophile, qui ne peut pas se fixer à l'ADN lorsque un seul site de fixation est présent. Cette coopérativité de fixation est d'ailleurs requise et nécessaire pour que la protéine exerce sa fonction *in vivo* (Chen et Pirrota, 1993).

Une des conséquences de ce mécanisme est d'aboutir à une activation transcriptionnelle de type synergique, le taux d'activation de la transcription ainsi obtenu étant supérieur à la somme de l'activation transmise par chacun des activateurs pris séparément (FIGURE 21).

Indépendamment du mécanisme de coopérativité de fixation, la proximité de séquence de reconnaissance pour des facteurs de transcription peut également résulter en une activation transcriptionnelle synergique. Par exemple, l'activation transcriptionnelle du LTR (Long Terminal Repeat) des virus du polyome et celle de HTLV1 (Human T-Cell Leukemia Virus) par le facteur de transcription c-Ets1 nécessite un mécanisme de coopération avec les facteurs AP1 ou Sp1 (Wasylyk *et al.* 1990 ; Gégonne *et al.* 1993). De même, l'induction du gène *mim1*, gène marqueur de différenciation granulocytaire, résulte d'une coopération entre les facteurs Myb et C/EBP β (Ness *et al.* 1993 ; Burk *et al.* 1993). Dans les deux cas, les sites de fixation de chacun des facteurs de transcription sont adjacents et sont nécessaires à l'activation synergique. Des travaux semblent indiquer que ce mécanisme joue un rôle très important *in vivo*. En effet, l'induction du gène *mim1* ne peut être obtenu *in vivo* dans un système hétérologue (fibroblastes) qu'après introduction des deux partenaires Myb et C/EBP β qui ne sont naturellement pas présents dans ces cellules (Ness *et al.* 1993 ; Burk *et al.* 1993). De plus, des mécanismes de synergie existant entre différents facteurs de transcription codés par des gènes de développement

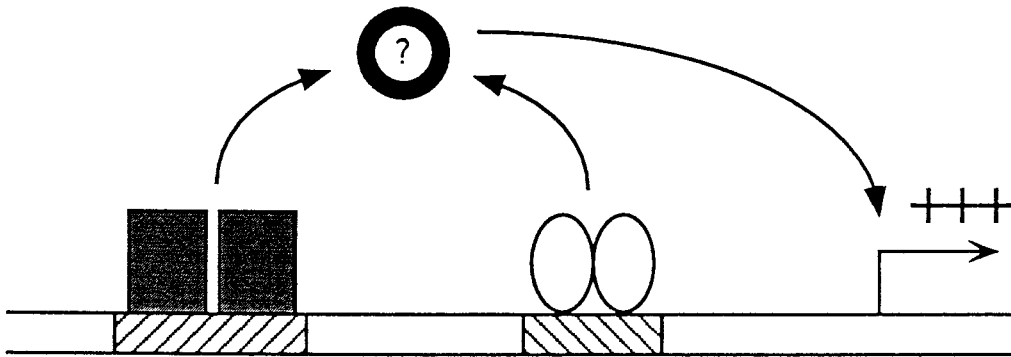


FIGURE 21 : Coopération entre facteurs de transcription pour la réponse transcriptionnelle. Chacun des facteurs pris séparément active peu la transcription du gène. Les deux facteurs réunis activent fortement la transcription. Ce mécanisme de synergie n'est pas expliqué (?) et peut impliquer d'autres protéines(d'après He et Rosenfeld 1991).

(telles que les protéines Fushi-Tarazu et Paired) sont nécessaires pour le développement de l'embryon (Fitzpatrick *et al.* 1992 ; Anathan *et al.*, 1993 ; Schier et Gehring, 1993 ; Gondie et Capecchi 1994 ; Simpson-brose, 1994)

4.3 L'expression des facteurs de transcription spécifiques

La régulation des gènes peut s'effectuer au niveau de l'expression même du régulateur. Ce mécanisme est illustré par la découverte de facteurs de transcription présentant une spécificité tissulaire dans leur expression. Dans certains cas, l'introduction artificielle de ce facteur dans des cellules suffit à induire un programme de différenciation de ces cellules. Dans ce cas il n'existe pas de "verrou" cellulaire empêchant l'activité de ce facteur et la seule présence ou absence de ce facteur est l'élément limitant de la régulation des gènes cibles. Cet exemple peut être illustré par le facteur de transcription MyoD (pour Myoblaste determination gene 1) qui est capable d'induire une différenciation musculaire lorsqu'il est introduit dans des fibroblastes (Davis *et al.* 1987).

Cependant la notion de facteur de transcription seul déterminant absolu "master gene" pour une différenciation donnée doit être tempérée. En effet, toute cellule n'est pas reprogrammable. Par exemple, toute cellule ne peut se différencier en myoblaste sous l'effet de la surexpression de MyoD seul. Ceci suggère que ce facteur de transcription a besoin d'un contexte cellulaire particulier pour son activité que l'on pourrait considérer en terme de "prédisposition cellulaire". L'identification de co-facteurs rend compte de la "prédisposition cellulaire" et explique en partie la spécificité d'action d'un facteur d'un type cellulaire donné.

Un autre exemple beaucoup plus général est illustré par les protéines à homéodomaine faisant partie des gènes de développement. La plupart d'entre eux présentent une expression restreinte à quelques cellules ou tissus. La dérégulation de ces gènes par surexpression, mutation ou extinction suffit à induire une anomalie du statut de différenciation cellulaire (revue de McGinnis et Krumlauf 1992). Cela signifie que l'expression de ces gènes est impliquée dans un programme de détermination cellulaire, défini par l'expression des gènes cibles placés sous leur contrôle. L'analyse moléculaire du mode d'action du facteur de transcription Pit1, protéine à

homéodomaine présentant une spécificité tissulaire pour son expression, en est un exemple. En effet, ce facteur qui est exprimé dans l'hypophyse est nécessaire pour l'expression du gène de l'hormone de croissance (*GH*). L'expression de *Pit1* précède celle de *GH* et des mutations dans le gène *Pit1*, abolissant sa capacité à fixer l'ADN, se traduisent par une absence d'expression de *GH* et des anomalies du développement chez l'animal (nanisme) (Li *et al.* 1990). Cependant, là encore, la présence ou l'absence du facteur est loin de déterminer l'expression du gène cible. En effet *Pit1* est exprimé dans trois types cellulaires distincts : les cellules thyrotrophes, somatotrophes et lactotrophes, et régule des gènes d'expression spécifique de chaque cellule à savoir *TSH β* (pour thyroid stimulating hormon β), *GH* et *Prolactine* (voir revue de Rosenfeld 1991). Il existe donc d'autres déterminants cellulaires qui vont permettre l'expression du gène considéré dans un type cellulaire donné en présence de Pit1, qui est pourtant nécessaire pour l'expression de chacun de ces gènes.

4.4 Interactions entre les facteurs de transcription

L'interactions entre les facteurs de transcription spécifiques est l'un des mécanismes les plus importants dans la régulation de l'activité des gènes. En effet, il est possible de retrouver des associations entre facteurs pour les différentes classes de facteur de transcription. Diverses combinaisons spécifiques de dimères se formeront en fonction de l'expression respective de chaque facteur de transcription dans la cellule mais aussi en fonction du promoteur lorsque les sites de fixation interviennent dans la dimérisation. Deux types de dimérisation peuvent être définis, les interactions entre facteurs de transcription appartenant à une même famille et celles entre protéines non apparentées.

4.4.1 Dimérisation entre facteurs de transcription apparentés

- les protéines bZIP

Le meilleur exemple est représenté par la famille AP1, constituée des protéines c-Jun, JunB, JunD et c-Fos, FosB, Fra1, Fra2 (voir revue d'Angel et Karin 1991). Les protéines Jun ont la capacité de s'homodimériser et de s'hétérodimériser entre elles, capacité que n'ont pas les

protéines Fos. Par contre ces dernières s'hétérodimérisent avec les protéines Jun. La formation d'homodimères et d'hétérodimères permet donc un nombre élevé de combinaisons différentes du facteur de transcription AP1. Les différents membres Jun et Fos ne sont pas exprimés au même moment du cycle cellulaire et exhibent des stabilités différentes. Par exemple les protéines c-Fos et FosB sont rapidement dégradées alors que Fra1 et Fra2 sont plus stables ; pour les membres Jun, la protéine JunD est beaucoup plus stable. Ce fait est important car il se traduit par une variation qualitative et quantitative du facteur AP1 au cours du cycle cellulaire (Kovary et Bravo 1991a, b, 1992).

Les différents dimères reconnaissent tous la même séquence palindromique TGAC^C/GTCA (appelée TRE pour TPA responsive element) mais, fait intéressant, ne se fixent pas avec la même affinité : les hétérodimères Jun-Fos se fixent plus fortement que les homodimères Jun-Jun (Ryseck et Bravo 1991). Il en résulte que les hétérodimères Jun-Fos seront les régulateurs préférentiels lorsque les membres Fos seront fortement exprimés, et empêcheront la fixation des dimères Jun-Jun.

De plus, la capacité d'activation transcriptionnelle (*trans*-activation) varie selon le type de dimère. Ainsi parmi les membres Jun, seul c-Jun est un *trans*-activateur efficace (Chiu *et al.* 1989). JunD, un pauvre *trans*-activateur en homodimère, devient capable d'activer efficacement la transcription quand il est dimérisé avec c-Fos (Hirai *et al.* 1989). Les hétérodimères c-Jun-JunB sont des inhibiteurs de la *trans*-activation de c-Jun (Chiu *et al.* 1989 ; Deng et Karin 1993). Alors que l'hétérodimère c-Jun-c-Fos *trans*-active plus fortement que l'homodimère c-Jun (Hirai *et al.* 1990 ; Nakabeppu *et al.* 1988), les hétérodimères c-Jun-Fra1 et c-Jun-Fra2 se comportent comme des inhibiteurs de la *trans*-activation de c-Jun. Les protéines Fra1 et Fra2 sont d'ailleurs incapables, à l'inverse de c-Fos, d'activer la transcription de la transine *in vivo* lorsqu'ils sont surexprimés dans des fibroblastes de rat (Wisdom et Verma 1993). Cependant ils exhibent les mêmes capacités à *trans*-activer que c-Fos, lorsqu'ils sont dimérisés avec JunD (Suzuki *et al.* 1991).

Il est donc facile d'envisager que la régulation des gènes cibles du facteur AP1 passe par l'intermédiaire des mêmes séquences d'ADN mais que le type d'hétérodimère va dicter la

réponse transcriptionnelle. Ces résultats signifient que la régulation d'un gène dépendra de la nature du (ou des) dimères présents dans la cellule.

La protéine Jun est également capable de s'hétérodimériser avec d'autres protéines telles que les protéines ATF/CREB (revue d'Angel et Karin 1991). Les membres AP1, qui sont induits par le TPA, rendent compte d'une voie d'activation du signal mitotique dépendante de la protéine kinase C. Les membres ATF sont activés par la voie de l'AMP cyclique (et donc la protéine kinase A) et régulent leur gènes par l'intermédiaire du site TGACGTCA (appelé CRE pour cyclic AMP responsive element). L'hétérodimérisation entre Jun et ATF va modifier les séquences de reconnaissance : la protéine Jun reconnaîtra un site ATF, et conférera ainsi à un site CRE la capacité de répondre également au TPA (Hai *et al.* 1991).

Les interactions croisées s'étendent aux membres de la famille NFIL-6 (C/EBP β), protéines impliquées dans le signal de transduction de l'interleukine 6. L'interaction entre Jun ou Fos avec NFIL-6 résulte en une diminution de l'activité de fixation à l'ADN et de *trans*-activation sur des séquences de réponse NFIL-6 (Hsu *et al.* 1994).

- les protéines bHLH

Nous avons vu précédemment que MyoD est un facteur de transcription spécifique des cellules musculaires (revue de Kadesch 1993). En fait, pour être actif, ce facteur a besoin de se dimériser avec les protéines E2A (isoformes E12 ou E47) pour fixer et *trans*-activer efficacement ses gènes cibles par l'intermédiaire de boîte E (Lassar *et al.* 1991 ; Sun et Baltimore 1991) (FIGURE 22). Il est intéressant de noter que la formation du facteur de transcription fonctionnel résulte de l'association d'un facteur de transcription quasi ubiquitaire (E2A) et d'un facteur de transcription tissulaire spécifique (MyoD).

La dimérisation des protéines bHLH en vue de constituer un facteur de transcription fonctionnel est observée notamment lorsque les protéines présentent des stabilités différentes : une protéine instable se dimérise avec une protéine stable et constitue alors une forme active. Par exemple la protéine c-Myc, instable et régulée au cours du cycle cellulaire, est stabilisée par l'association avec la protéine Max qui est elle très stable. Il en résulte des activités

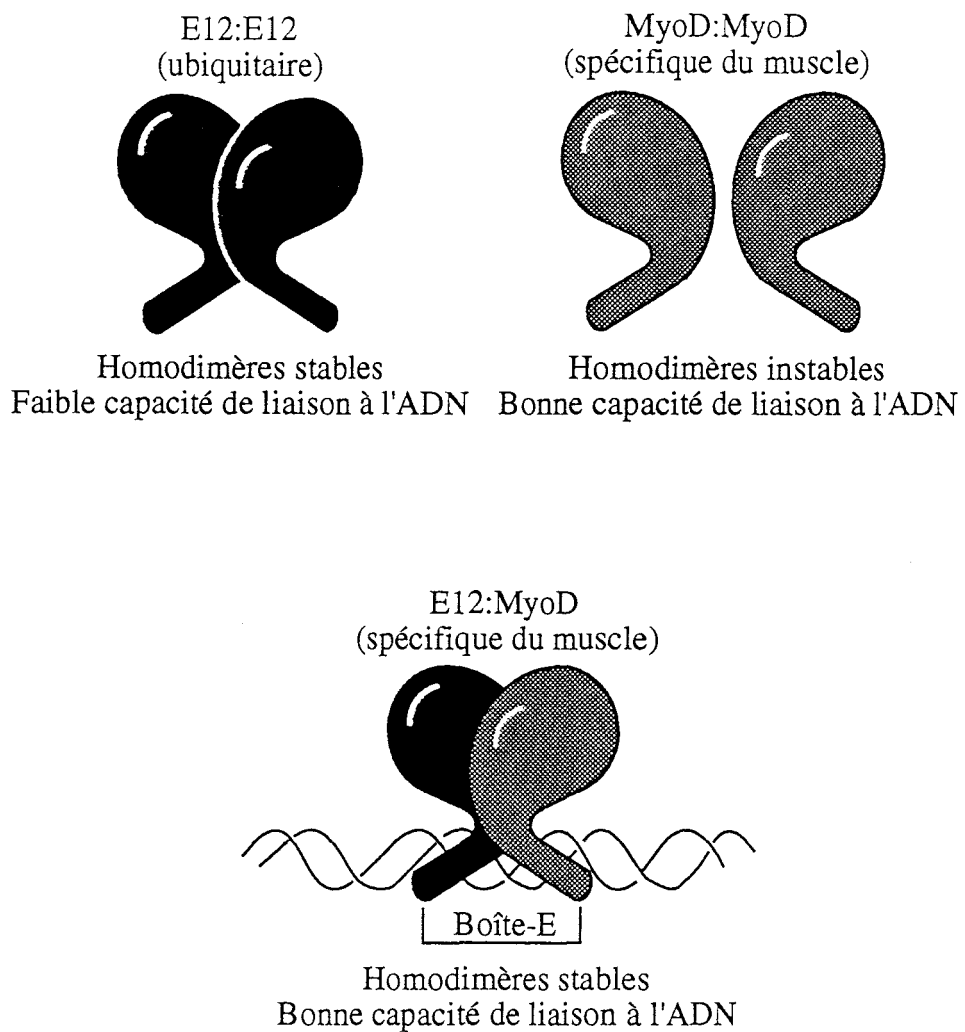


FIGURE 22 : Dimérisation entre protéines bHLH (d'après Kadesch 1993).

fonctionnelles différentes pour les divers dimères. L'homodimère Myc-Myc ne fixe pas l'ADN alors que l'hétérodimère Myc-Max et l'homodimère Max-Max fixent l'ADN et représentent les formes fonctionnelles dans la cellule : Myc-Max est un *trans*-activateur alors que Max-Max ne *trans*-active pas et se comporte comme régulateur négatif de l'activité de Myc-Max par compétition de fixation (Blackwood *et al.* 1992 ; Kato *et al.* 1992 ; Mukheije *et al.* 1992).

- les protéines à doigt de Zinc

Des interactions entre protéines conduisant à la formation d'homodimères peuvent aussi transformer un activateur en un répresseur transcriptionnel. Le produit du gène de développement Krüppel de *drosophile* régule positivement ses gènes cibles à l'état non dimérisé et se comporte comme répresseur à l'état d'homodimère. Cette régulation est alors dépendante de la concentration en protéine (Sauer et Jäckle 1993).

Pour la famille des récepteurs nucléaires, les récepteurs aux oestrogènes et aux glucocorticoïdes apparaissent fixer l'ADN sous forme homodimérique (Kumar et Chambon 1988 ; Tsai *et al.* 1988) alors que les récepteurs à l'acide rétinoïque peuvent fixer l'ADN sous forme d'hétérodimères avec différents membres des récepteurs nucléaires (FIGURE 23). Ces co-régulateurs n'affectent pas seulement l'activité de liaison à l'ADN du récepteur à l'acide rétinoïque mais également la réponse transcriptionnelle. Le type d'hétérodimère sera soit activateur soit répresseur de la transcription pour un site de fixation donné (Glass *et al.* 1989, 1990). Il est essentiel de souligner ici l'importance que joue la dimérisation en conjonction avec l'espacement des hémi-sites de fixation à l'ADN pour la réponse transcriptionnelle (décrit ci-dessus) (FIGURES 19 et 23).

- Les protéines à domaine Homéo

Nous avons vu précédemment que les protéines HOX reconnaissent des séquences consensus très similaires dont le motif central est TAAT (Hoey et Levine 1988 ; Pellerin *et al.* 1994) et que le bras amino-terminal de l'homéodomaine pouvait influencer sur la spécificité de fixation de la protéine. Seulement, ce résultat n'explique pas comment la protéine HOXD-8 qui

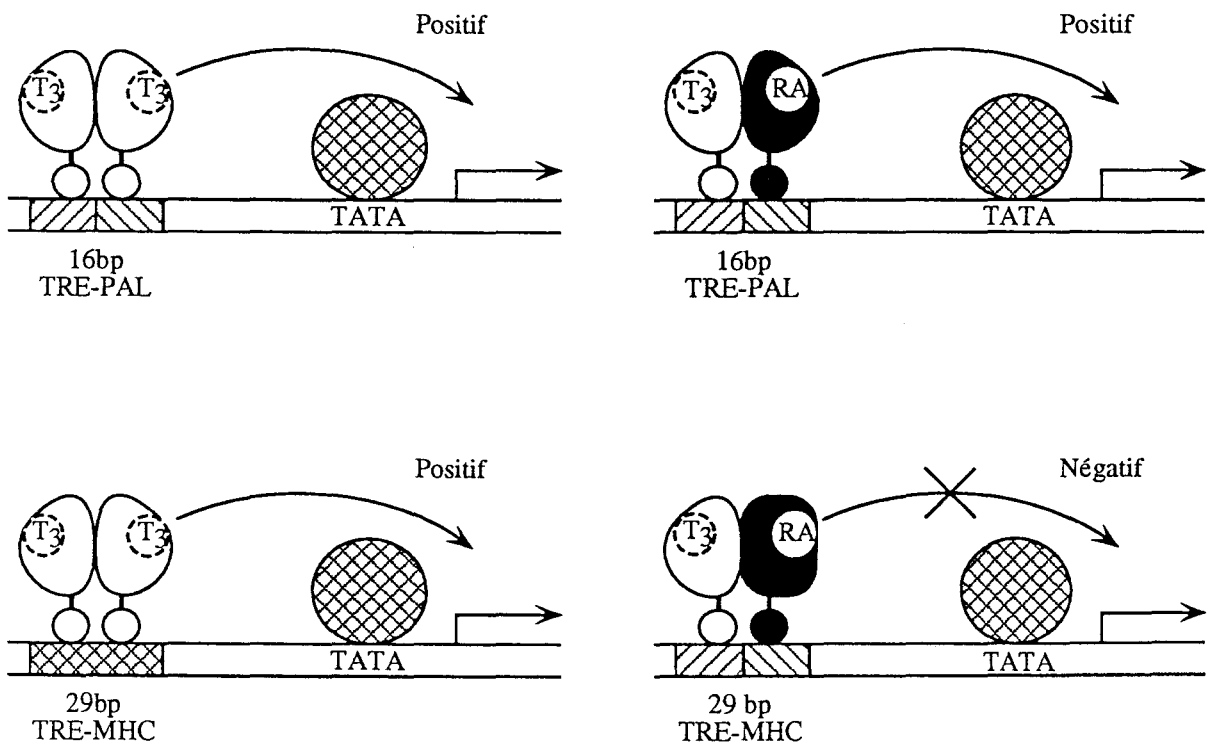


FIGURE 23 : Dimérisation entre protéines à doigt de zinc et réponse transcriptionnelle. Le site de fixation peut induire une modification de conformation du récepteur et moduler la réponse transcriptionnelle (d'après Glass *et al.* 1989).

agit comme activateur de la transcription sur le promoteur de son gène, peut agir en tant que répresseur du gène *Hoxd-9*. Zappavigna *et al.* (1994) ont montré que la conversion de l'activateur HOXD-8 en un répresseur résulte en fait d'une hétérodimérisation de cette protéine avec la protéine HOXD-9 (FIGURE 24). Cette hétérodimérisation, qui s'effectue par l'intermédiaire de l'hélice 1 de l'homéodomaine de HOXD-8 ainsi que de sa portion amino-terminale, empêche la fixation de la protéine HOXD-8 à l'ADN (Zappavigna *et al.* 1994).

D'autres associations protéines-protéines existent et peuvent réguler la transcription en l'activant. Dans certains cas l'activité de liaison à l'ADN n'est pas requise. Ainsi la protéine Fujitarazu, protéine à homéodomaine intervenant dans le processus de segmentation chez la drosophile, est capable de réguler des gènes *in vivo* en l'absence de domaine de liaison à l'ADN (Fitzpatrick *et al.* 1992 ; Schier et Gehring 1993). Le mécanisme d'action impliquerait la protéine Paired, dont l'activité de liaison à l'ADN est requise, suggérant des interactions protéines-protéines par l'intermédiaire de régions autres que l'homéodomaine (Ananthan *et al.* 1993).

La dimérisation peut aussi influencer la liaison à l'ADN en modulant la spécificité de reconnaissance ou en augmentant l'affinité. Ainsi les protéines Ultrabithorax (Ubx) et Antennapedia (Antp) montrent des spécificités de reconnaissance à l'ADN très similaires. Cependant la reconnaissance d'Ubx pour son site de fixation est favorisée après dimérisation avec la protéine à homéodomaine extradenticle (exd). Il est alors tentant de penser que la dimérisation augmente l'affinité d'Ubx pour l'ADN. Ce mécanisme de dimérisation est spécifique puisque exd n'interagit pas avec Antp (autre protéine à homéodomaine) et qu'elle est nécessaire à la régulation des gènes cibles par Ubx *in vivo* (Chan *et al.* 1994 ; Rauskolb et Wieschaux 1994). Une récente étude réalisée à l'aide d'expériences de double hybride chez la levure rapporte que l'interaction entre ces protéines implique le bras amino-terminal de l'homéodomaine (Johnson *et al.* 1995). La protéine exd possède également la capacité de se dimériser avec la protéine engrailed (En) et de modifier les séquences de reconnaissance de cette protéine, suggérant ainsi que les gènes régulés par engrailed seront différents en l'absence ou en présence d'exd (Chan *et al.* 1994 ; Van Dijk et Murre 1994).

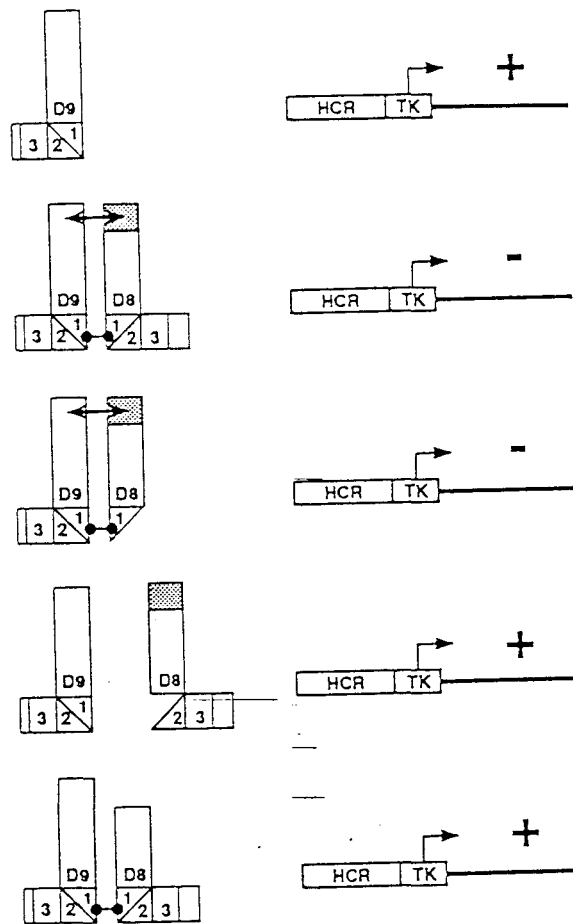


FIGURE 24 : Interaction entre protéines à homéodomaines et la réponse transcriptionnelle qui en résulte. Les numéros 1, 2, 3 déterminent les hélices α de l'homéodomaine (d'après Zappavigna *et al.* 1994).

4.4.2 Interactions entre facteurs de transcription non apparentés

Ce type d'interaction est défini par des associations entre facteurs de transcription qui ne possèdent pas le même type de domaine de fixation à l'ADN et la même interface de dimérisation. Ce cas peut-être illustré par l'exemple de la régulation des glucocorticoïdes par AP1 (revue de Schüle et Evans, 1991). La surexpression des membres AP1 inhibe l'activation d'un élément de réponse aux glucocorticoïdes. Inversement, la surexpression d'un récepteur aux glucocorticoïdes réprime l'activation transcriptionnelle du facteur AP1 sur le promoteur de la collagénase. Des expériences biochimiques ont permis d'établir que c-Jun et le récepteur aux glucocorticoïdes interagissent par l'intermédiaire de leur domaine de liaison à l'ADN : un domaine basique et un en doigt de zinc respectivement. La répression mutuelle de la liaison à l'ADN par interaction protéine-protéine ("piégeage") est proposée comme mécanisme d'inhibition de la transcription (FIGURE 25). Ce mécanisme de "piégeage" rend compte d'une double fonctionnalité du domaine de liaison à l'ADN : il peut être impliqué à la fois dans des interactions ADN-protéine et protéine-protéine.

Une interaction entre les protéines NFκB et AP1 permet une augmentation de l'affinité du complexe résultant pour l'ADN du LTR du virus HIV1 et résulte en une activation transcriptionnelle par l'intermédiaire de séquences de fixation NFκB ou AP1 (Stein *et al.* 1993a). Le facteur AP1 peut alors réguler des gènes qui ne contiennent pas de site de fixation AP1.

Dans certains cas, la régulation de la transcription dépend à la fois de la fixation à l'ADN et de l'interaction des deux protéines. L'activité transcriptionnelle des facteurs fixés en *cis* sur des séquences adjacentes est alors régulée par des interactions protéine-protéine. Par exemple, la régulation transcriptionnelle du gène de la *proliférine* en réponse aux glucocorticoïdes, requiert la présence du récepteur aux glucocorticoïdes (GR) et du facteur AP1 (Miner et Yamamoto 1992). La co-régulation dépend de l'activité de fixation à l'ADN des différentes protéines impliquées. Des interactions protéine-protéine ont pu alors être montrées. Ainsi, des hétérodimères AP1-GR sont visualisés par co-immunoprécipitation et des mutations abolissant la dimérisation du facteur AP1 (mutation dans la crémaillère à leucines) ont pour conséquence

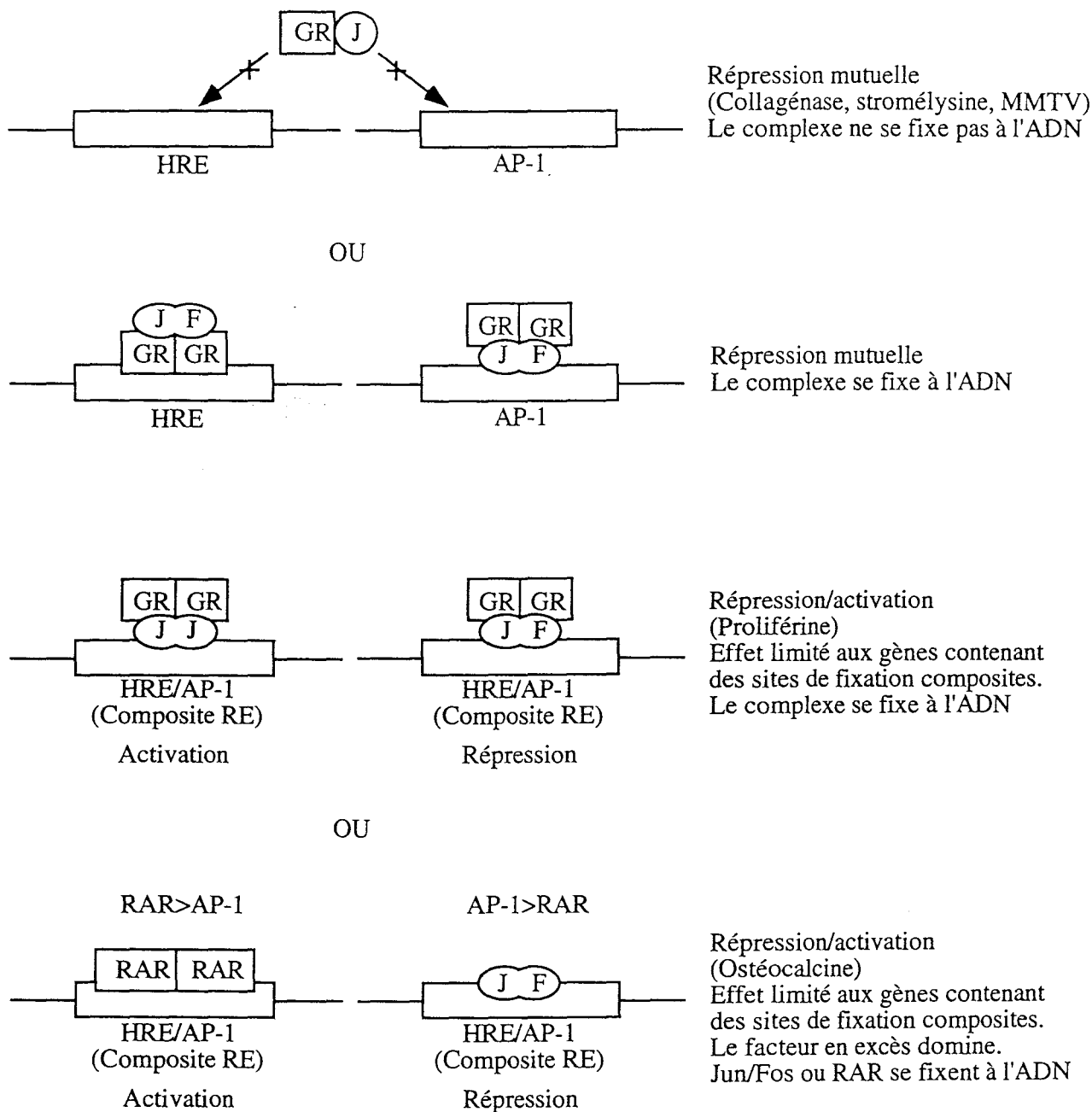


FIGURE 25 : Un exemple d'interaction entre facteurs de transcription non apparentés (d'après Schüle et Evans 1991). F : Fos ; GR : récepteur aux glucocorticoïdes ; J : Jun ; RAR : récepteur de l'acide rétinolique.

d'abolir l'interaction avec GR. De plus, il est intéressant de signaler que ce mécanisme d'activation impliquant l'activité de liaison à l'ADN et les interactions protéine-protéine dépend du type d'hétérodimère AP1 : ceci pour insister sur le fait que le type de dimérisation entre membres AP1 est très important pour la formation de complexes d'activation de la transcription fonctionnels. Ainsi il apparaît que l'hétérodimère c-Jun/c-Fos en conjonction avec GR va inhiber l'activité du promoteur de la proliférine alors que l'hétérodimère c-Jun/Fra1 en conjonction avec GR va en activer la transcription. Cette différence de comportement impliquerait le domaine de liaison à l'ADN : le domaine basique de c-Fos diffère de celui de Fra1 par trois acides aminés (Miner et Yamamoto 1992).

Des publications récentes ont décrit d'autres associations notamment entre C/EBP β et la protéine c-Rel (Matsusaka *et al.* 1993 ; Stein *et al.* 1993b).

Enfin le dernier exemple réside dans l'antagonisme c-Jun/MyoD face aux processus de prolifération et de différenciation cellulaire. L'infection de myoblastes par un rétrovirus exprimant c-Jun inhibe leur différenciation en myotubes mais n'inhibe pas leur prolifération (Bengal *et al.* 1992). A l'opposé, la surexpression de MyoD bloque l'activation des gènes associés à la prolifération induits par AP1 (Grossi *et al.* 1991 ; Su *et al.* 1991). Il semble donc que la balance entre prolifération et différenciation de ce système soit régulée par la formation d'un complexe c-Jun/MyoD. Un modèle d'interaction entre ces protéines a pu être décrit nécessitant le domaine HLH de MyoD et la crémaillère à leucines de c-Jun *in vivo*. Li *et al.* (1992) ont aussi montré que la répression est également obtenue avec c-Fos, JunB mais pas JunD, ce qui est compatible avec l'expression constitutive de ce gène dans les cellules musculaires. Ce mécanisme suggère que le complexe c-Jun/MyoD résulte en un dimère non fonctionnel présent de façon libre, c'est à dire non lié à l'ADN dans la cellule.

4.5 Les répresseurs

Nous avons vu précédemment, à travers les différents exemples, que le mécanisme de régulation négatif de la transcription résulte en majeure partie d'une perte de fonction activatrice du facteur de transcription (inhibition de la liaison à l'ADN par modification post-traductionnelle

ou séquestration par un inhibiteur) ou d'une compétition de fixation chassant l'activateur de sa séquence et le remplaçant par une protéine neutre (peu ou pas d'activation de la transcription). Ces mécanismes de régulation négative de la transcription peuvent être définis comme un processus "d'anti-activation".

Cependant, des protéines ayant des caractéristiques de répresseur intrinsèque et possédant un domaine actif de répression ont été isolées. Les homéoprotéines de drosophile En et even-skipped (Jaynes et O'Farrel 1991 ; Han et Manley 1993a, b) ont ainsi été décrites, la première se comportant comme un répresseur spécifique de la transcription activée alors que la seconde réprime également l'expression de base du promoteur, ce qui en fait un répresseur constitutif. Des protéines En ont été isolées chez les mammifères, suggérant que ces mécanismes sont conservés au cours de l'évolution.

D'autres facteurs qui répriment la transcription basale d'un promoteur ont été identifiés et joueraient un rôle dans la régulation transcriptionnelle. Ces régulateurs négatifs dénommés NC1, NC2, Dr1 et Dr2 empêcheraient l'incorporation de TFIIA et/ou TFIIB dans le complexe de pré-initiation TBP-ADN et ceci en se fixant directement à la protéine TBP (Meisterernst et Roeder 1991 ; Meisterernst *et al.* 1991 ; Inostroza *et al.* 1992 ; Merino *et al.* 1993 ; Yeung *et al.* 1994).

Conclusion générale sur la régulation génique (FIGURE 26)

Le premier niveau de régulation d'un gène peut être défini par l'état de condensation de la chromatine. Un état décondensé rend accessible les sites de fixation pour les facteurs généraux et facteurs de transcription spécifiques et permet ainsi la transcription du gène.

Le deuxième niveau de régulation se joue au niveau du complexe de pré-initiation de la transcription dont la formation et l'activité peuvent être permises ou au contraire bloquées par l'intervention de répresseurs (telles que les protéines NC1, NC2, Dr1 et Dr2).

Les facteurs de transcription spécifiques (lorsqu'ils sont présents) se fixent sur leur site de reconnaissance (au niveau du promoteur ou des régions régulatrices) et agissent : soit en réprimant, soit en activant la transcription du gène ce qui se traduit en partie par une augmentation du taux d'initiation. Cette étape requiert des interactions directes ou indirectes (par

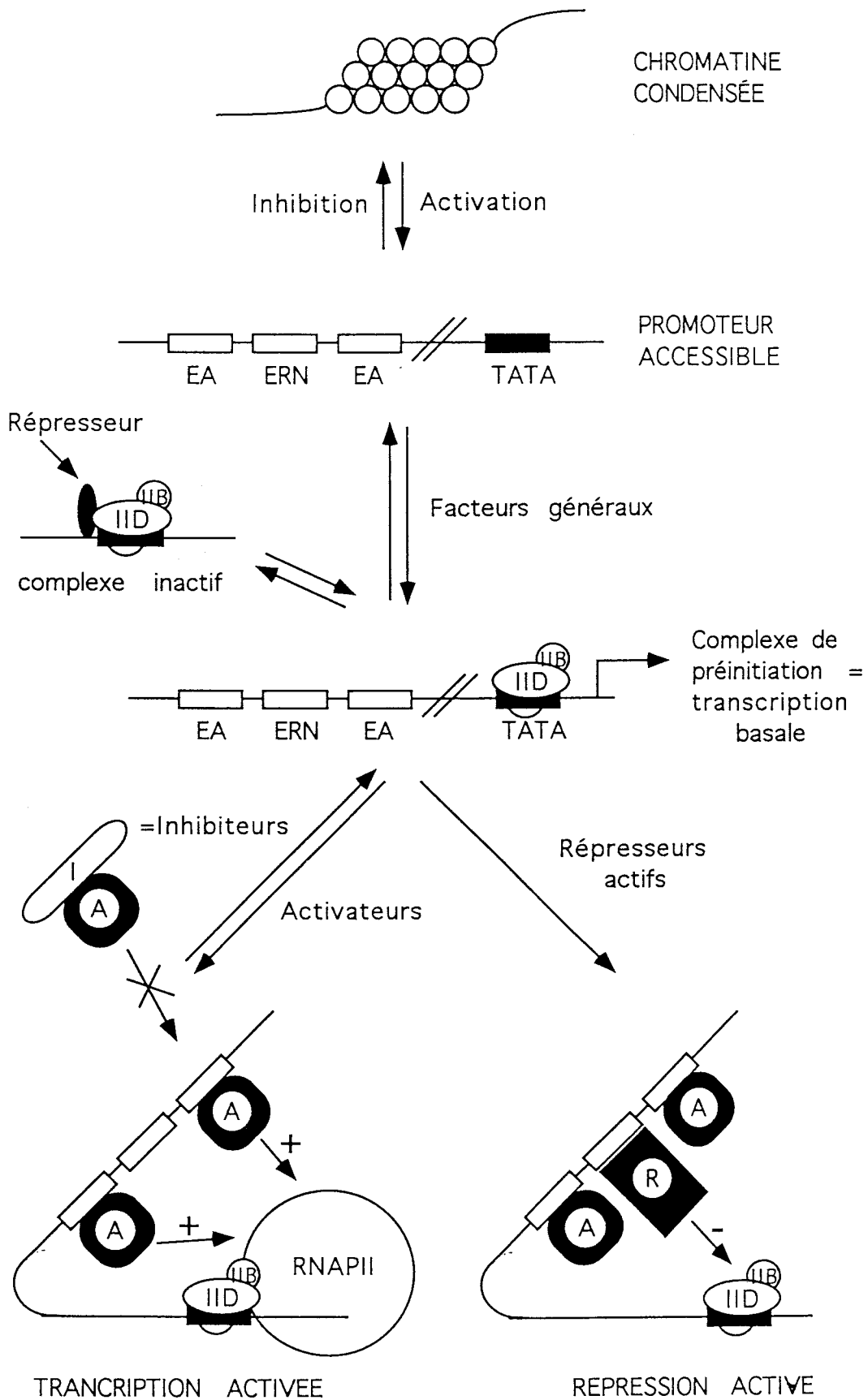


FIGURE 26 : Activation et répression transcriptionnelle (d'après Cowell 1994). EA : élément activateur ; ERN : élément de réponse négatif ; I : inhibiteur.

l'intermédiaire de co-facteurs) avec les composants de la machinerie transcriptionnelle. Les facteurs de transcription spécifiques peuvent être eux-mêmes régulés par de nombreux mécanismes (compartimentation cellulaire, dégradation, phosphorylation, inhibiteurs protéiques) dont certains vont influencer leur capacité à lier l'ADN ou à *trans*-réguler.

L'expression tissulaire spécifique d'un gène apparaît donc comme étant la résultante de la combinaison d'événements simples s'appliquant de façon particulière à chaque cellule.

II/ LES GÈNES *PAX* / LE GÈNE *PAX6*

Ces gènes portent le nom *Pax* (pour Paired box) car ils sont caractérisés par la présence d'un domaine de liaison à l'ADN homologue à celui de la protéine Paired de drosophile. Les gènes *Pax* ont été isolés chez les mammifères sur la base d'une homologie de séquence avec la séquence codant le domaine paired de la protéine Paired. Ainsi, neuf gènes *Pax* (appelés *Pax1* à *9*) ont pu être isolés chez les mammifères et définissent une famille de gènes (Walther *et al.* 1991). Nous allons décrire leurs propriétés structurales et fonctionnelles en insistant sur *Pax6* qui fait l'objet du travail présenté dans les résultats.

1/ STRUCTURE

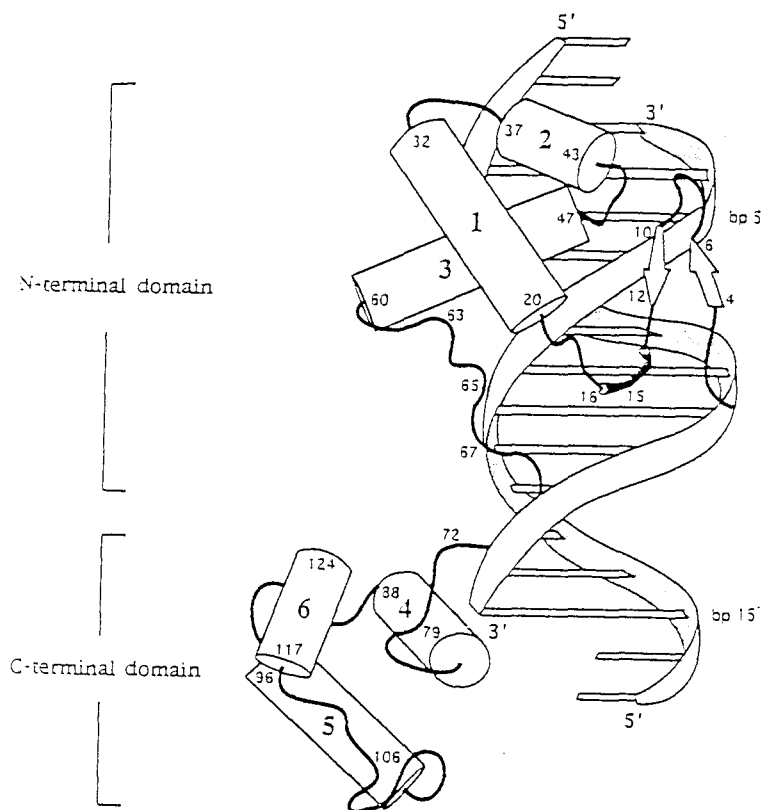
Ces gènes se caractérisent par des propriétés structurales similaires (FIGURE 27A). Dans la partie amino-terminale de la protéine est localisé le domaine paired. La structure tertiaire de ce domaine de la protéine Paired, réalisée par cristallographie, montre une structure tridimensionnelle formée de deux feuillets β et de six hélices α : deux structures HTH sont ainsi formées ressemblant au motif Homéo, l'une dans la portion amino-terminale du domaine paired, l'autre dans la portion carboxy-terminale (FIGURE 27B)(Xu *et al.* 1995).

Ce domaine est suivi d'une région charnière possédant pour toutes les protéines *Pax*, à l'exception de *Pax4* et *Pax6*, une séquence octapeptide homologue à la séquence HSIDGILG présente dans d'autres protéines de drosophile. Néanmoins, sa fonction n'est pas clairement

A

Gène	Position Chromos.	Structure protéique	Taille	ARNm	Mutations	
					Souris	Homme
<i>Pax-1</i>	2	N PD oct HD PST C	361 aa	3.1 kb	<i>undulated</i>	
<i>Pax-2</i>	19	N PD oct HD PST C	392 / 415 aa	4.2 / 4.7 kb		
<i>Pax-3</i>	1	N PD oct HD PST C	479 aa	3.3 / 3.6 kb	<i>splotch</i>	<i>Waardenburg Syndrome</i>
<i>Pax-4</i>	6	N ? PD oct HD ? C	?	?		
<i>Pax-5</i>	4	N PD oct HD PST C	391 aa	?		
<i>Pax-6</i>	2	N PD oct HD PST C	422 / 436 aa	3.0 kb	<i>small eye</i>	<i>Aniridia</i>
<i>Pax-7</i>	4	N ? PD oct HD ? C	>300 aa	4.9 kb		
<i>Pax-8</i>	2	N PD oct HD PST C	457 aa	3.1 kb		
<i>Pax-9</i>	12	N ? PD oct HD ? C	?	?		

B

FIGURE 27 : Structure des gènes *Pax* .

A: les différents gènes, produits et phénotypes (d'après Tremblay et Gruss 1994).
 B: Structure du domaine Paired (d'après Xu et al. 1995)

établie mais il pourrait être impliqué dans les mécanismes de dimérisation entre protéines (revues de Strachan et Read 1994 ; Tremblay et Gruss 1994).

En aval de la région charnière, les protéines Pax3, Pax7, Pax4 et Pax6, possèdent un second domaine de liaison à l'ADN de type homéo. Ce domaine est tronqué dans les protéines Pax2, Pax5 et Pax8, et absent dans la protéine Pax1. La comparaison de séquence ainsi que des différences fonctionnelles ont permis de définir une nouvelle classe d'homéodomaine appelée domaine homéo de type paired qui se caractérise notamment par la présence d'une sérine en position 50, alors qu'une glutamine caractérise les domaines de type homéo à cette même position. Le résidu en position 50 de l'homéodomaine détermine une spécificité de reconnaissance à l'ADN différente (FIGURE 2) (Treisman *et al.* 1989). Dans la portion carboxy-terminale de la protéine un domaine de plus de 100 acides aminés, riche en résidus proline, sérine et thréonine, présente les caractéristiques structurales de domaine d'activation transcriptionnelle.

2/ FONCTION

La structure de ces gènes suggère qu'ils codent des facteurs de transcription. Ce fait a été confirmé pour de nombreux gènes *Pax*, en étudiant d'une part leur capacité de se lier à l'ADN, d'autre part leur capacité à *trans*-activer.

En ce qui concerne la protéine Pax6, la première séquence nucléotidique utilisée pour les études de fixation à l'ADN est une séquence artificielle dérivée du promoteur du gène *even-skipped* de *drosophile*, cible de la protéine Paired. Cette séquence dénommée e5 possède deux motifs de fixation : le motif GTTCC impliqué dans la fixation du domaine paired et le motif ATTA consensus de fixation pour l'homéodomaine (Treisman *et al.* 1991). L'étude des propriétés de liaison à l'ADN de la protéine Pax6 montre que cette protéine se fixe à l'ADN par l'intermédiaire de ses deux domaines de liaison à l'ADN. Le domaine paired interagit avec le motif GTTCC et le domaine homéo avec le motif ATTA, comme pour la protéine Paired (Dozier *et al.* 1993). L'importance du motif GTTCC pour la fixation du domaine paired a été confirmée également pour les protéines Pax1, Pax2 et Pax3 (Chalepakis *et al.* 1991 ;

Fickenscher *et al.* 1993 ; Chalepakis *et al.* 1994a). Cependant, la détermination des séquences optimales de fixation du domaine paired, ainsi que des expériences d'interférence de méthylation, de protection à la DNase I ont permis d'établir que les modalités de reconnaissance de l'ADN par la protéine Pax6 sont beaucoup plus complexes. En effet, les séquences de reconnaissance sont plus étendues (au moins 20 bases) que les cinq bases précédemment décrites et peuvent être dégénérées (Epstein *et al.* 1994a). Ces caractéristiques sont retrouvées également dans les séquences de fixation de la protéine Pax6 sur les promoteurs de ses gènes cibles potentiels : le gène codant l' α A cristalline, le gène codant la NCAM-L1 (pour neural cell adhesion molecule) et le gène *Pax6* (Plaza *et al.* 1993 ; Chalepakis *et al.* 1994b ; Cvekl *et al.* 1994). Ces caractéristiques de reconnaissance de l'ADN par le domaine paired sont également applicables aux protéines Pax1, Pax2, Pax3, Pax5 et Pax8 (Chalepakis *et al.* 1991 ; Zannini *et al.* 1992 ; Czerny *et al.* 1993 ; Epstein *et al.* 1994a ; Fickenscher *et al.* 1993). Une étude récente réalisée sur le domaine paired de Pax5 et vérifiée pour Pax6 montre que le domaine de reconnaissance à l'ADN est bipartite (Czerny *et al.* 1993 ; Epstein *et al.* 1994b) : la partie amino-terminale du domaine paired contenant la première hélice de reconnaissance se fixe à l'ADN sur un héli-site de reconnaissance indépendamment du reste du domaine, ce dernier qui contient les hélices deux et trois se fixant sur l'autre héli-site de l'ADN de façon indépendante de la région amino-terminale (FIGURE 28). Il en résulte une flexibilité de reconnaissance qui peut rendre compte de la forte dégénérescence du consensus de fixation établi pour la protéine Pax6 (Epstein *et al.* 1994a). Une des conséquences de ce mécanisme réside dans le fait qu'une insertion de 14 acides aminés dans la portion amino-terminale du domaine paired (résultat d'un épissage alternatif) confère à l'isoforme Pax6 correspondante des propriétés de fixation à l'ADN différentes. En effet, le domaine paired alternatif ne lie à l'ADN que par le sous-domaine carboxy-terminal et ne se fixe pas aux séquences reconnues par le domaine paired ne contenant pas ce peptide additionnel (Epstein *et al.* 1994b) (FIGURE 28).

Le rôle de l'homéodomaine dans la fixation à l'ADN n'est pas bien compris dans le contexte de la protéine entière et plusieurs hypothèses peuvent être envisagées. La première est que ce domaine peut lier l'ADN de façon indépendante du domaine paired *in vivo* suggérant ainsi que la

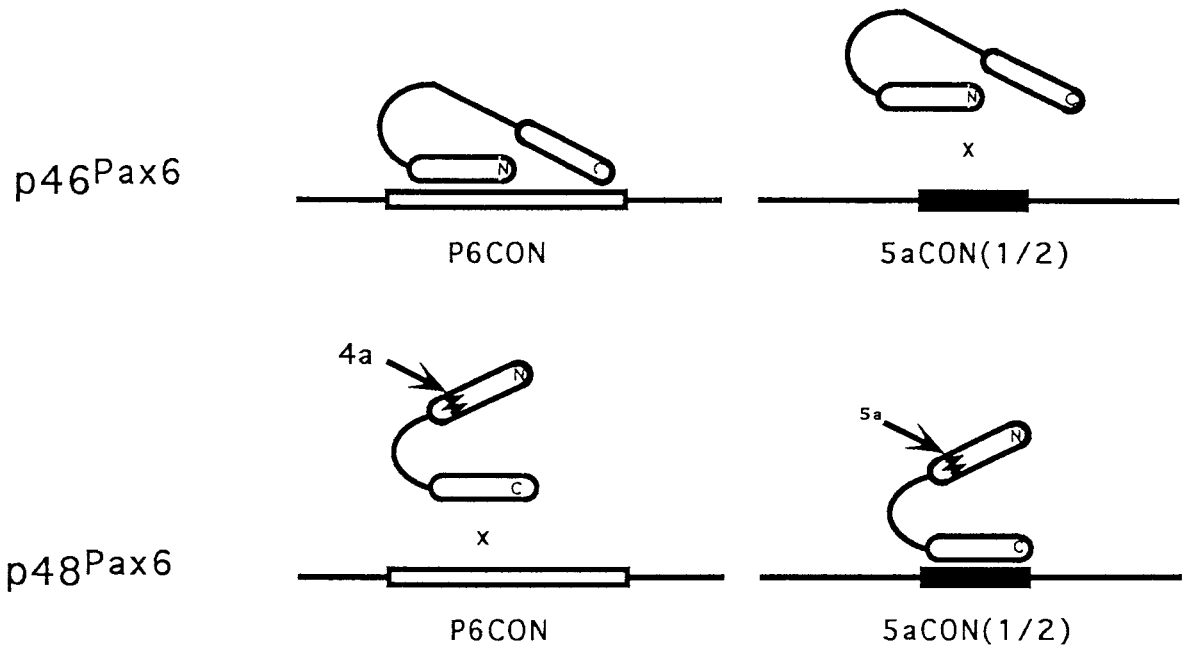


FIGURE 28 : Domaine paired de Pax6 et reconnaissance à l'ADN (d'après Epstein *et al.* 1994).

protéine peut réguler des gènes cibles par l'intermédiaire du domaine paired ou du domaine homéo de façon indépendante. Exprimé en système procaryote, le domaine homéo des protéines Paired et Pax6 est effectivement capable de se lier à l'ADN (Treisman *et al.* 1991 ; Dozier *et al.* 1993). De plus, les protéines Pax3, Pax6 et Pax7 sont capables de se fixer à l'ADN par l'intermédiaire de sites de fixation homéo (Dozier *et al.* 1993 ; Schäfer *et al.* 1994). La seconde hypothèse repose sur la contrainte apportée par le deuxième domaine pour la sélection des séquences de reconnaissance et la régulation des gènes cibles. Il est en effet possible d'envisager que la protéine se lie à l'ADN par l'intermédiaire des domaines paired et homéo pour réguler correctement ses gènes cibles (coopération pour la fixation) et que l'agencement et l'espacement des sites soient importants. Pour Pax6 notamment, il semble que le domaine homéo participe à la fixation à l'ADN en coopérant avec le domaine Paired. En effet, la mutation du motif de fixation homéo (ATTA) au sein de la séquence e5 diminue la capacité de la protéine Pax6 à fixer cette séquence (Dozier *et al.* 1993). Des résultats similaires ont été obtenus avec Pax3 (Chalepakis *et al.* 1994a). Un parallélisme peut être fait avec les protéines POU qui possèdent deux sous-domaines de reconnaissance à l'ADN (POU_S et POU_{HD}) qui coopèrent pour une fixation efficace à l'ADN.

L'étude des capacités *trans*-activatrices des protéines Pax a également été déterminée pour certains membres. Les protéines Pax1, Pax2 et Pax3 sont capables d'activer la transcription d'un promoteur artificiel en amont duquel est placée une séquence artificielle dérivée de la séquence e5 (Chalepakis *et al.* 1991, 1994c ; Fickenscher *et al.* 1993). Pour Pax6 ainsi que Pax5 et Pax8, l'isolement de gènes cibles potentiels a permis de démontrer leurs capacités *trans*-activatrices (Barberis *et al.* 1990 ; Plaza *et al.* 1993 ; Zannini *et al.* 1992).

La modulation du statut *trans*-activateur de plusieurs isoformes de Pax8 épissées dans le domaine carboxy-terminal (Kozmik *et al.* 1993), ainsi que la délétion de ce domaine pour les protéines Pax2 et Pax7 ayant pour conséquence d'abolir la capacité à *trans*-activer sans affecter la capacité de liaison à l'ADN, suggèrent que le domaine carboxy-terminal contient le domaine d'activation de la transcription (Fickenscher *et al.* 1993 ; Schäfer *et al.* 1994). La confirmation a été apportée par la fusion des domaines carboxy-terminaux des protéines Pax6 et Pax3 au

domaine de liaison à l'ADN de la protéine de levure GAL4. Ces constructions chimériques deviennent alors capables d'activer spécifiquement la transcription d'un promoteur par l'intermédiaire de sites de fixation pour GAL4 (Glaser *et al.* 1994 ; Chalepakis *et al.* 1994c).

3/ DES GÈNES DE DÉVELOPPEMENT

Les territoires d'expression de ces gènes dans l'espace et dans le temps au cours de l'embryogenèse suggèrent un rôle informateur dans les processus de développement. Tous les gènes *Pax*, à l'exception de *Pax1*, sont exprimés au cours de la formation du système nerveux (pour une description détaillée et approfondie des différents territoires d'expression, voir revue de Tremblay et Gruss 1994), mais leur rôle et leur importance au cours du développement sont attestés par la présence de mutants spontanés ou induits par transgénèse et recombinaison homologue.

Pax1, qui est exprimé dans les cellules précurseurs de la colonne vertébrale, est associé lorsqu'il est muté à une altération du développement du disque intervertébral (Balling *et al.* 1988). Cette mutation décrite chez la souris est appelée *un* pour "*undeleted*" et n'a pas d'équivalent chez l'homme. L'analyse moléculaire de l'effet de la mutation a permis de montrer que la protéine mutante (dans le domaine paired) n'est plus capable d'une part de reconnaître les séquences fixées par la protéine normale et par conséquent d'activer la transcription d'un promoteur artificiel possédant les mêmes séquences de reconnaissance d'autre part (Chalepakis *et al.* 1991).

Pax3 est associé à la mutation *splotch* chez la souris et le syndrome de Wardenburg de type 1 et 3 chez l'homme (Epstein *et al.* 1991 ; Hoth *et al.* 1993). La mutation *splotch* qui se traduit par des anomalies de développement des territoires d'expression naturels du gène se manifeste chez la souris par des déficiences de pigmentation, des exencéphalies, de méningocèle ou spina bifida, et chez l'homme par la surdité ainsi que des défauts de pigmentation. Ces anomalies sont expliquées par un défaut de migration des cellules des crêtes neurales.

Le gène *Pax6* est aussi associé à des mutations chez la souris (*Sey*), chez l'homme (*AN* pour *aniridia*) et chez la drosophile (*eyeless*) (Hill *et al.* 1991 ; Ton *et al.* 1991 ; Quiring *et al.* 1994).

Les territoires d'expression de ce gène sont localisés dans le système nerveux central (certaines parties du cerveau, le tube neural et l'œil) (Walther et Gruss 1991 ; Martin *et al.* 1992) ainsi que dans le pancréas endocrine (Turque *et al.* 1994). Les mutants *Pax6* se manifestent à l'état homozygote, par une absence totale de cavités nasales et d'yeux ainsi que de graves anomalies de développement du système nerveux central, ceci à la fois chez la souris et chez l'homme (Hill *et al.* 1991 ; Glaser *et al.* 1994). L'étude du gène ou du produit de transcription du gène chez les mutants *AN* chez l'homme et *Sey* chez la souris a permis de mettre en évidence dans la majorité des cas des délétions ou mutations ponctuelles situées dans la phase codante du gène ayant pour conséquence de produire une protéine tronquée et dépourvue du domaine *trans*-activateur (revue de Strachan et Read 1994) (FIGURES 29 et 30).

Le gène *Pax5* est exprimé dans le cerveau moyen (mésencéphale) et les testicules ainsi que dans les lymphocytes B (Adams *et al.* 1992). La destruction de ce gène par recombinaison homologue montre qu'il est impliqué dans le développement du mésencéphale ainsi que dans la différenciation des cellules B (qui restent bloquées à l'état de précurseurs) (Urbanek *et al.* 1994).

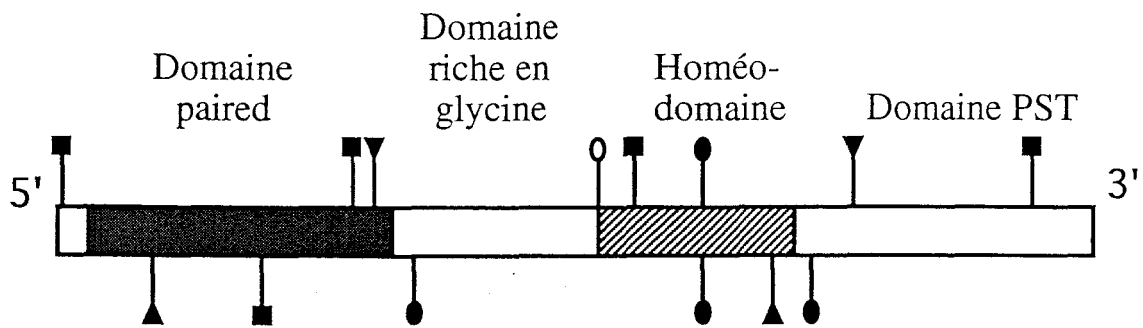
La surexpression du gène *Pax2* par transgénèse provoque des anomalies du développement des reins (*Pax2* ne s'exprime que de façon transitoire dans ce tissu) (Dressler *et al.* 1993). La délétion du locus par insertion d'un transgène (mutation *Krd*) provoque également des anomalies du développement des reins et de la rétine (Keller *et al.* 1994).

Enfin, il est intéressant de noter que les mutations des gènes *Pax1*, *Pax3* et *Pax6* se manifestent à l'état hétérozygote par des anomalies moins sévères qu'à l'état homozygote ce qui traduit donc un effet semi-dominant. Cela pourrait s'expliquer par une mutation de type gain de fonction, puisque certaines mutations *un* se caractérisent par un changement des séquences de reconnaissance de la protéine mutante par rapport à la protéine normale (Chalepakis *et al.* 1991). Des gènes normalement non régulés deviendraient alors régulés par la protéine mutante. Cependant, étant donné que d'autres mutants *un* présentent des délétions dans le gène et que des mutants de *Pax3* et *Pax6* sont aussi délétés dans tout le locus du gène (revue de Strachan et Read 1994), cette hypothèse reste peu vraisemblable. Alternativement, le phénotype peut s'expliquer par un effet de dosage génique, les deux allèles actifs du gène sauvage étant nécessaires à un

MUTATION	NOM	POSITION	EFFET DE LA MUTATION	REFERENCES
DELETION	<i>Sey^H</i>		Deletion de Pax-6, wt-1 et d'autres genes	Hill et al., 1991
	<i>Sey^{Dey}</i>		Deletion de Pax-6	
	WAGR		Deletion de Pax-6, WT-1 et d'autres genes	
	Syndrome PP(Peters')		Deletion de Pax-6	Hanson et al., 1994
CHANGEMENT DE CADRE : DELETION OU INSERTION	—	Insertion de 7pb dans exon 7, codons 123-124	Délétions des 8 derniers aa du domaine PRD et perte du cadre de lecture	Glaser et al., 1992
	HZAMT	Insertion de 2pb dans exon 10, codon 283	Produit tronqué, taille 317aa	Jordan et al., 1992
	AN1	Insertion de 2pb dans exon 5 codon 39	Produit tronqué dans domaine PRD	Davis et al., 1994
	AN4	Insertion de 1pb dans exon 10 codon 259	Produit tronqué dans homéodomaine	Davis et al., 1994
	VIGMA	Délétions de 151pb dans exon 12, codons 345-395	Produit tronqué dans la moitié du domaine carboxy-terminal	Hanson et al., 1993
DELETION CONSERVANT LE CADRE	NIKIT	Délétion de 118pb dans exon 6 codons 84-119	Délétion de 36aa dans domaine PRD	Hanson et al., 1993
MUTATION AUX SITES D'ÉPISSAGE	<i>Sey^{neu}</i>	SA, intron?	Produit tronqué après l'homéodomaine	Hill et al., 1991
	<i>rSey</i>	Nouveau SD créé	Produit tronqué au début du domaine carboxy-terminal	Matsuo et al., 1993
	AN6	SD, intron 6 GT → AT	Produit tronqué dans domaine PRD	Davis et al., 1994
	RUBAI	SA, intron 8 GT → TT	Produit tronqué dans domaine PRD	Jordan et al., 1992
	—	SD, intron 3 AG → GG	Produit tronqué dans domaine PRD	Glaser et al., 1992
MUTATIONS FAUX SENS	JECK	Exon 8 codon 208	Arg → Trp avant l'homéodomaine	Hanson et al., 1993
	Famille 3 Syndrome de Peter	Exon 5 codon 26	Arg → Gly aa 23 dans domaine PRD	Hanson et al., 1994
MUTATIONS NON SENS	<i>Sey</i>	Exon 8 Codon 194	Produit tronqué avant l'homéodomaine	Hill et al., 1991
	AN2	Exon 6 codon 116	Produit tronqué dans homéodomaine	Davis et al., 1994
	—	Exon 9 codon 240	Produit tronqué dans homéodomaine	Glaser et al., 1992
	AN3	Idem	Produit tronqué dans homéodomaine	Davis et al., 1994
	CACHE	Idem		Hanson et al., 1993
AN5	Exon 11 codon 317	Produit tronqué après homéodomaine	Davis et al., 1994	

SA: site accepteur d'épissage SD : site donneur d'épissage

FIGURE 29 : Les mutations dans le gène *Pax6*. Les mutants *sey* réfèrent à la souris, les autres à l'homme (d'après Tremblay et Gruss 1994).



- Codon stop
- Substitution d'acide aminé
- ▲ Changement de cadre de lecture
- Erreur d'épissage de l'ARN

FIGURE 30 : Les mutations associées à l'Aniridie. Domaine PST : domaine de régulation transcriptionnelle riche en Proline, Sérine, Thréonine.

développement normal. Cette hypothèse semble la plus probable. Pour *Pax1*, un mutant *un* est en effet associé à une diminution du taux d'expression de l'ARNm (revue de Tremblay et Gruss 1994). A ce titre, les phénotypes *AN* et *eyeless* associés à des délétions (et insertions) situées en dehors de la phase codante du gène *Pax6* (Ton *et al.* 1991 ; Quiring *et al.* 1994) peuvent être expliqués par la destruction de séquences de régulation importantes pour l'expression du gène.

III / LA NEURORÉTINE

1/ STRUCTURE

La perception visuelle est basée sur l'interprétation faite par le cortex cérébral des signaux neurochimiques envoyés par la rétine en réponse aux stimuli lumineux auxquels est soumise la neurorétine. Les photorécepteurs sont les cellules qui convertissent le signal lumineux en signal neurochimique. La plupart des vertébrés ont des rétines possédant deux types de photorécepteurs, les cônes et les bâtonnets qui présentent des différences structurales et fonctionnelles.

La structure type d'une neurorétine de poulet à l'état différencié est schématisée FIGURE 31. Les cônes et les bâtonnets présentent une structure compartimentée et polarisée formée d'une région externe, contenant toutes les molécules impliquées dans la conversion du signal lumineux en signal neurochimique, une région centrale contenant les noyaux et une région interne présentant une structure synaptique impliquée dans la transmission des signaux électriques par l'intermédiaire de neurotransmetteurs.

La neurorétine contient d'autres types cellulaires : des cellules neuronales de type ganglionnaire (qui sont les seuls neurones projetant leurs axones vers le cerveau), bipolaire, horizontales, amacrine, et interplexiforme, spécialisées dans la transmission des signaux provenant des cônes et des bâtonnets ; des cellules de Müller, cellules de type glial qui s'étendent à travers toutes les couches de la rétine. La fonction des cellules de Müller n'est pas

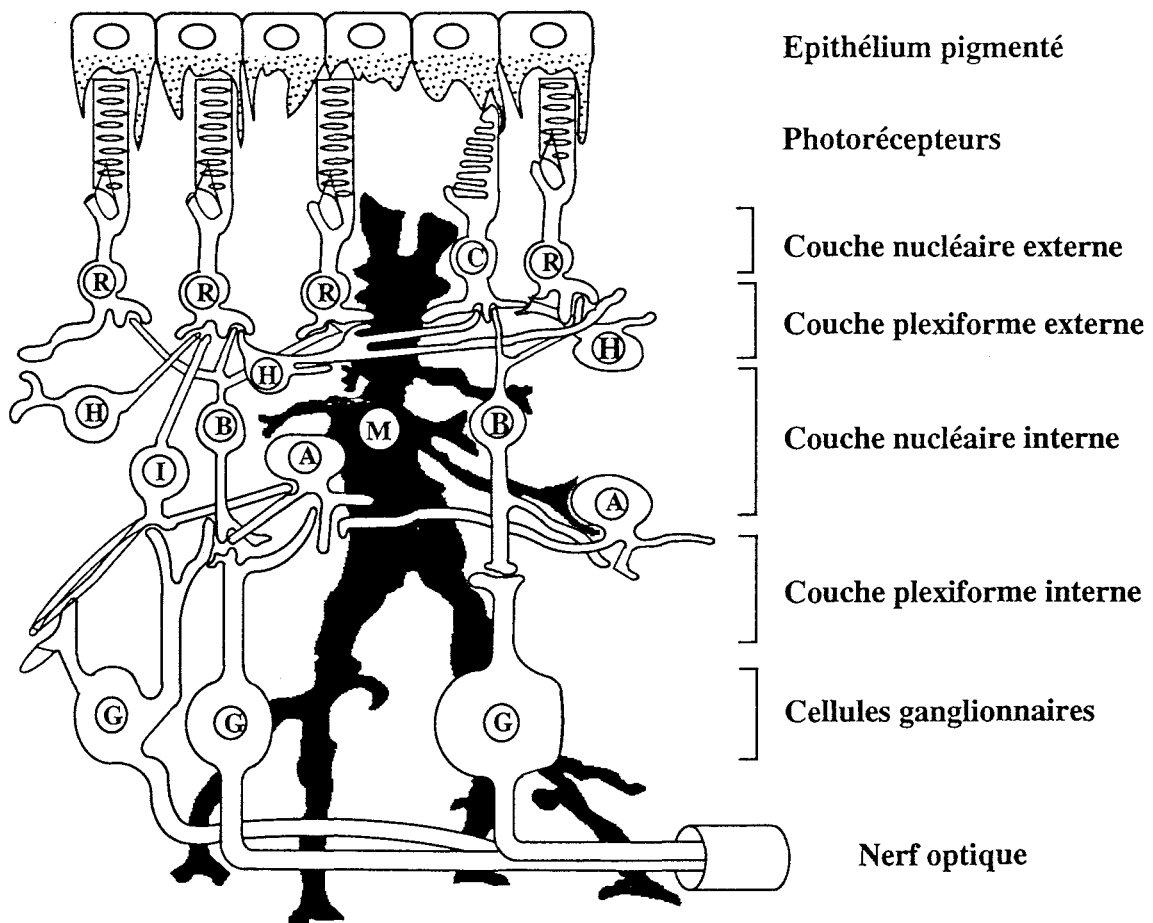


FIGURE 31 : Organisation de la neurorétine. A : cellules amacrines ; B : cellules bipolaires ; C : cônes ; G : cellules ganglionnaires ; H : cellules horizontales ; I : interneurones ; M : cellule de Müller ; R : bâtonnets ;

clairement établie et différents rôles leurs sont attribués (pour analyse détaillée de la fonction de ces cellules voir Pierani 1994) :

- un rôle de substrat pour la migration des cellules neuronales lors de la formation des différentes couches rétinienne (par comparaison avec le rôle joué par les cellules gliales du cerveau) (revue de Hatten 1993) ;

- un rôle différenciateur par l'intermédiaire de molécules sécrétées (ces cellules synthétisent des facteurs diffusibles tels que l'acide rétinique) (Edward *et al.* 1992) ;

- diriger la croissance axonale par chimiotactisme (attirance ou répulsion) en exprimant par exemple des molécules d'adhésion (ces cellules ont été montrées produire des N-cadhérines) ;

- un rôle structural en maintenant une structure organisée de la rétine par l'intermédiaire des interactions cellulaires.

- un rôle métabolique par élimination des "déchets" ainsi que les neurotransmetteurs produits par les photorécepteurs et les neurones (ces cellules possèdent l'équipement enzymatique adéquat).

Ces différentes couches cellulaires définissent la neurorétine. Dans la partie la plus externe, une couche épithéliale pigmentée appelée rétine pigmentaire est adjacente aux photorécepteurs.

Les différents types cellulaires de la rétine mature sont distribués et organisés dans l'espace de façon extrêmement structurée. La couche nucléaire externe est occupée essentiellement par les photorécepteurs ; la couche plexiforme externe constitue la zone des synapses reliant photorécepteurs aux cellules horizontales et bipolaires ; la couche nucléaire interne contient des neurones bipolaires, amacrines, horizontaux, interplexiformes qui sont spécialisés dans la transmission des signaux ; la couche plexiforme interne constitue la zone des synapses reliant cellules amacrines et cellules ganglionnaires ; la couche la plus interne aussi appelée couche ganglionnaire est constituée de neurones ganglionnaires.

2/ DÉVELOPPEMENT

La neurorétine est formée à partir de précurseurs neuro-ectodermiques d'origine embryonnaire diencéphalique.

La morphologie et le développement de la neurorétine sont très similaires chez tous les vertébrés.

L'organisation complexe de la rétine différenciée est le résultat de processus de division, de migration et de différenciation cellulaire d'une population homogène de cellules s'apparentant morphologiquement à un épithélium stratifié, dans lequel 100% des cellules sont capables de se diviser. Durant le développement embryonnaire trois phases distinctes peuvent être définies :

- la prolifération des précurseurs neuro-ectodermiques
- l'organisation en couches cellulaires
- la différenciation des cellules post-mitotiques

Cette séparation des phases est arbitraire parce que ces processus sont en réalité imbriqués.

Chez le poulet, dont la période embryonnaire dure 21 jours, un stade de prolifération intense à lieu entre le deuxième et le huitième jour du développement embryonnaire. Entre le troisième et cinquième jour, les cellules ganglionnaires vont les premières cesser de se diviser, suivies des cellules précurseurs des cônes et des bâtonnets. Au 8ème jour, les premiers neurones ganglionnaires peuvent être détectés histologiquement, alors que le reste des cellules apparaît non différencié (revue Adler 1993).

Entre le 8ème jour et le 10ème jour, les mouvements de migration cellulaire auront lieu à travers la neurorétine et les précurseurs vont se positionner aux endroits qui vont ultérieurement donner naissance aux différentes couches rétinienne. Parallèlement, les cellules horizontales et amacrines, suivies des cellules précurseurs des cellules de Müller, vont cesser chronologiquement de se diviser. Ainsi, au jour 10, la majorité des cellules de neurorétine sont dans un état de quiescence (stade post-mitotique).

Les premiers signes de la différenciation des photorécepteurs apparaissent au jour 10, bien que ce ne soit qu'au 15ème jour que ces cellules présentent une morphologie totalement différenciée. Les mécanismes de différenciation terminale s'étendent du jour 10 jusqu'à l'éclosion.

3/ MODÈLE BIOLOGIQUE

La neurorétine aviaire offre de nombreux avantages pour l'étude moléculaire des processus de différenciation car elle propose un répertoire de modifications phénotypiques accessibles *in vitro* et *in vivo*. Son premier intérêt réside dans l'accessibilité à différents stades de différenciation au cours du développement embryonnaire ; le deuxième intérêt réside dans la capacité qu'à la neurorétine de se différencier *in vitro*.

Les cellules de neurorétine de poulet prélevées sur un embryon de 7 jours et mises en culture présentent une morphologie non différenciée. Cette population homogène est rapidement perdue et trois sous populations peuvent être distinguées après trois à six jours de culture *in vitro* (Adler 1993). La première population est constituée de cellules non différenciées. La deuxième population est composée de neurones multipolaires, caractérisés par un large corps cellulaire. La troisième population correspond aux photorécepteurs, qui représentent 10 à 20% des cellules différenciées et apparaissent sous la forme de cellules allongées, polarisées et compartimentées. Il est donc clair que les cellules sont capables de poursuivre leur différenciation *in vitro* suivant une cinétique temporelle proche de celle observée *in vivo*. (Crisanti-combes *et al.* 1977 ; revue d'Adler 1993).

Les cellules de neurorétine possèdent en plus la capacité à se transdifférencier en cellules cristallines ou pigmentées, ceci spontanément à partir de la quatrième semaine de culture *in vitro*. Inversement, la rétine pigmentaire peut se transdifférencier en neurorétine *in vivo* et même *in vitro* (revue de Eguchi et Kodama 1993). Il est donc important de souligner que ce système permet l'étude de gènes impliqués dans ces mécanismes.

Enfin, la neurorétine cultivée *in vitro* prolifère peu et peut être maintenue à l'état de quiescence assez longtemps en culture, ce qui en fait un outil de choix pour étudier les événements régulant la prolifération.

Pessac et Calothy ont été les premiers à rapporter l'induction de la prolifération de la neurorétine suite à l'introduction de l'oncogène *src* (Pessac et Calothy 1974), et ce système est utilisé depuis plusieurs années dans le laboratoire afin d'étudier l'effet qu'induisent les oncogènes sur la prolifération et la différenciation cellulaires (Saule et Fauquet 1994). Ce

modèle cellulaire s'est avéré non redondant et complémentaire par rapport aux autres systèmes cellulaires car il permet notamment de dissocier prolifération (test de croissance en monocouche) et transformation (croissance en agar), ce qui n'est pas le cas des autres systèmes cellulaires dont les cellules prolifèrent dans les conditions normales de culture.

Ainsi, ce modèle cellulaire a permis de révéler pour la première fois une activité mitogène de l'oncogène *v-mil* sur ces cellules (Bechade *et al.* 1985). L'étude de la coopération entre oncogènes pour la transformation a permis de montrer que certains oncogènes étaient associés à la prolifération, d'autres à la transformation cellulaire (Amouyel *et al.* 1989 ; Garrido *et al.* 1992a, b ; 1993a, b ; Saule et Fauquet 1993).

IV/ PRÉSENTATION DES RÉSULTATS ANTÉRIEURS

1/ ISOLEMENT DU GÈNE *Pax6* DE CAILLE (*Pax-QNR*)

Après infection par le rétrovirus aviaire MC29 (contenant l'oncogène *v-myc*) les cellules de neurorétine de caille, normalement quiescentes dans les conditions de culture, se transforment morphologiquement et prolifèrent très rapidement. Après plusieurs passages, la culture se pigmente et les cellules mélanisées, deviennent majoritaires. Un criblage différentiel d'une banque d'ADNc construite à partir de l'ARN poly-adénylé de ces cellules devait permettre d'isoler d'une part les gènes cibles de la protéine myc responsables de cet effet, d'autre part les gènes exprimés dans la neurorétine. Parmi les clones isolés, un clone (MC29-QNR2) s'est révélé être apparenté aux gènes *Pax*. Ce gène fut appelé *Pax-QNR* et il est l'équivalent aviaire du gène murin *Pax6* (Martin *et al.* 1992 ; Walther et Gruss 1991). Ce gène a été isolé également chez la souris (*Pax6*), le poisson zèbre (*Pax-zfa*), l'homme (*AN*) et la drosophile (*eyeless*) (Walther et Gruss 1991 ; Krauss *et al.* 1991 ; Ton *et al.* 1991 ; Quiring *et al.* 1994). La conservation du gène *Pax6* au cours de l'évolution est remarquable. Par exemple, le domaine paired présente 100% d'homologie dans sa séquence en acides aminés entre la caille et la souris, et 94% entre la drosophile et l'homme (Martin *et al.* 1992 ; Quiring *et al.* 1994). De même l'homéodomaine

présente 90% d'homologie en acides aminés entre la drosophile et les vertébrés (Quiring *et al.* 1994). La conservation du gène se retrouve également au niveau de la structure génomique. En effet l'organisation exons/introns est similaire chez la caille et l'homme (Glaser *et al.* 1992 ; Dozier *et al.* 1993).

2/ LES PRODUITS DU GÈNE *Pax-QNR*

L'étude de l'organisation génomique et des produits d'expression de ce gène (ARNm et protéines) a permis de mettre en évidence une diversité tant au niveau des ARNm que des protéines produites (FIGURE 32).

1/ Les produits de transcription

Plusieurs ADNc correspondant à différents ARNm ont été isolés et caractérisés et rendent compte d'un mécanisme d'épissage alternatif (Carrière *et al.* 1993 ; Dozier *et al.* 1993) :

- dans la partie 5' non codante du gène
- dans la région codant le domaine paired de la protéine (domaine de liaison à l'ADN)
- dans la région codant la partie carboxy-terminale de la protéine (domaine de régulation).

2/ Les produits de traduction

Au moins cinq protéines distinctes sont synthétisées dans la neurorétine *in vivo* à partir des différents ARNm produits (Carrière *et al.* 1993) :

- une protéine de 48 kDa contenant un exon supplémentaire (dénommé 4a) au niveau de la première hélice de reconnaissance du domaine paired ;
- une protéine de 46 kDa (codée notamment par l'ARNm correspondant au premier ADNc isolé) ;
- une protéine de 43 kDa dont une partie du domaine paired est absente, résultat d'un épissage de l'exon 5 ;
- deux protéines de 32 et 33 kDa, produites vraisemblablement par initiation interne à partir de codons initiateurs AUG situés en aval du domaine paired. Ces protéines sont donc dépourvues de domaine paired. La différence de taille observée entre ces deux protéines peut

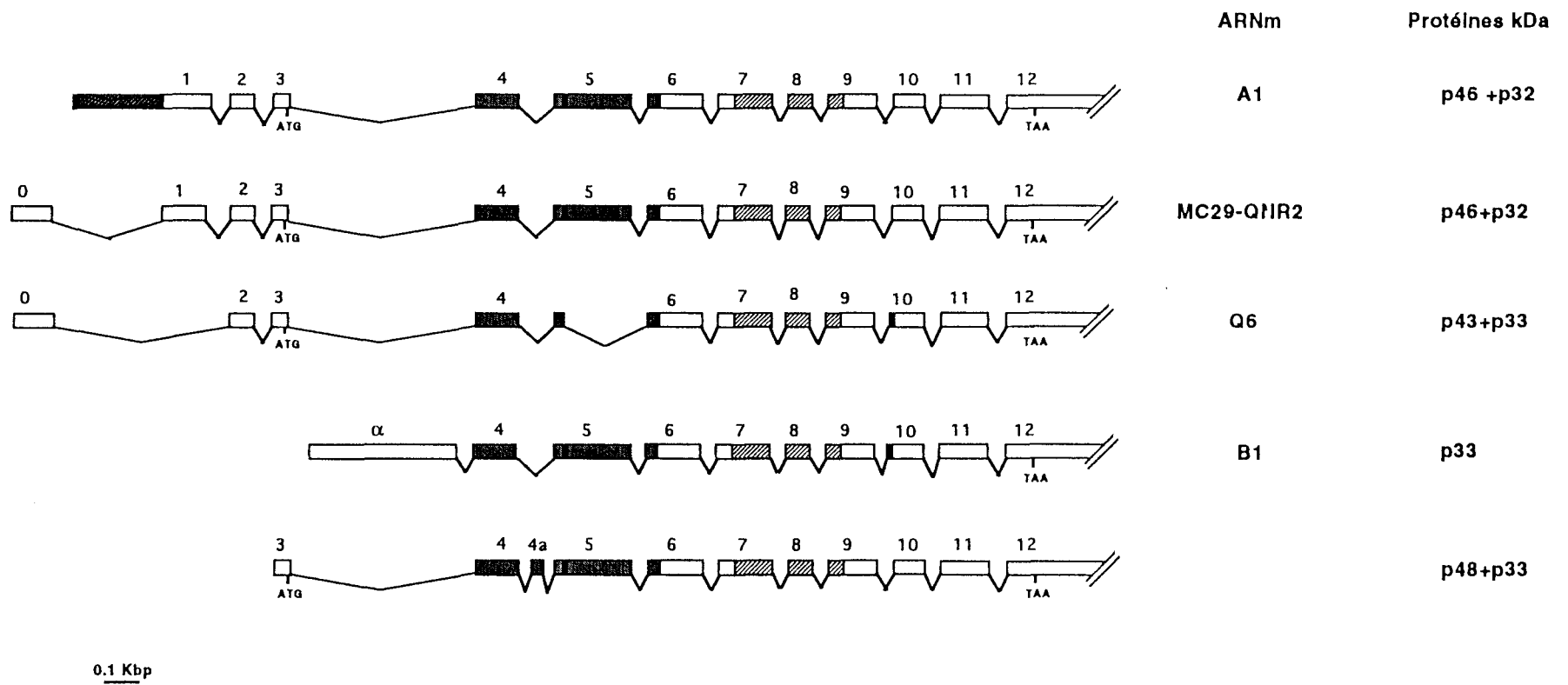
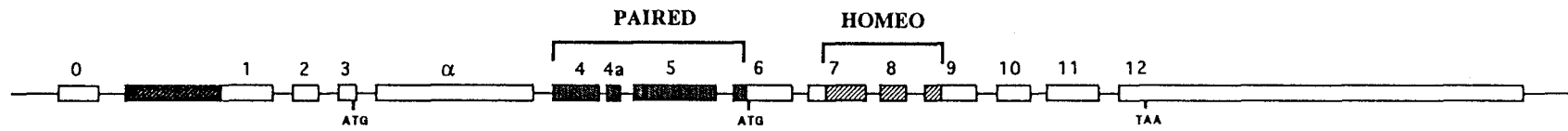


FIGURE 32 : Structure et expression du gène *Pax6* de caille

résulter de l'utilisation de la séquence additionnelle de 18 nucléotides présente dans l'exon 10 à la suite de l'utilisation d'un site accepteur d'épissage alternatif.

L'étude des propriétés de liaison à l'ADN des domaines paired et homéo de la protéine p46^{Pax-QNR} a permis de montrer d'une part que chacun des domaines était capable de lier l'ADN séparément d'autre part que la protéine p46 lie l'ADN par l'intermédiaire de ces deux domaines, suggérant un mécanisme de coopérativité des domaines paired et homéo pour la fixation à l'ADN (Dozier *et al.* 1993). Il est donc concevable que les différences structurales des protéines Pax-QNR leur confèrent des propriétés distinctes. De plus, chaque facteur de transcription doit être localisé dans le noyau des cellules pour pouvoir réguler ses gènes cibles, et nous avons vu que des séquences d'adressage cellulaire existent et sont requises pour le transport dans le compartiment nucléaire. Les différentes protéines ont ainsi été étudiées pour leur répartition sub-cellulaire, leurs capacités à lier l'ADN et à *trans*-activer. Les différentes protéines produites se distinguent :

- par des localisations subcellulaires différentes : les protéines de 32, 33 et 43 kDa présentent une localisation nucléaire et cytoplasmique alors que les protéines de 48 et 46 kDa, qui possèdent le domaine paired complet, sont nucléaires. Ces résultats montrent que ces différentes protéines sont transportées différemment dans le noyau et qu'il existe au moins deux séquences d'adressage dont l'une est localisée dans l'exon 5 du domaine paired (Carrière *et al.* 1993 et en préparation).

- par leurs capacités à se lier à l'ADN et à *trans*-activer : les protéines de 32, 33 et 43 kDa ne sont pas capables de fixer les séquences reconnues par les protéines de 46 et 48 kDa (Carrière *et al.* 1993 ; Carrière 1995). D'autres auteurs ont de plus montré que la protéine p48 ne possède pas les mêmes séquences de reconnaissance à l'ADN que la protéine p46 (Epstein *et al.* 1994b).

Ces résultats suggèrent que les différentes protéines Pax-QNR possèdent des séquences de reconnaissance à l'ADN distinctes et par conséquent ne devraient pas réguler les mêmes gènes.

3/ EXPRESSION

L'étude de l'expression du gène *Pax-QNR* réalisée au cours du développement embryonnaire chez la caille et le poulet a permis de déterminer :

- que ce gène est exprimé dans le tube neural, l'ampoule céphalique (Martin *et al.* 1992) ainsi que dans le bourgeon pancréatique (Turque *et al.* 1994).

- que son expression est transitoire dans le système nerveux dès les stades précoces du développement et constitutive dans la neurorétine .

- que dans la neurorétine, le gène *Pax-QNR* est exprimé dans la couche des neurones multipolaires ainsi que dans la couche des cellules amacrines (Martin *et al.* 1992), zones où sont localisés les corps neuronaux. De plus, deux phases d'expression du gène *Pax-QNR* peuvent être distinguées : une phase où l'expression de ce gène augmente (E5 à E8) suivie d'une phase où elle reste stable jusqu'à l'éclosion (Martin *et al.* 1992).

Aucune expression du gène *Pax-QNR* n'est décelée dans les autres tissus examinés. L'expression de ce gène est donc restreinte à quelques tissus. Plusieurs remarques peuvent être émises :

- l'existence de deux phases d'expression distinctes au cours du développement embryonnaire de la neurorétine suggère que des régulateurs transcriptionnels différents interviennent au cours du temps.

- le spectre restreint d'expression de ce gène suggère qu'il est régulé du moins en partie, par des facteurs de transcription exprimés spécifiquement dans la neurorétine ou le système nerveux.

Notre travail a consisté à identifier et à caractériser les régulateurs transcriptionnels de ce gène qui pourraient être responsables de sa restriction d'expression tissulaire. De plus, l'étude de ces régulateurs permettra l'identification de nouveaux gènes spécifiquement exprimés dans l'oeil et impliqués dans les processus de différenciation, de prolifération et/ou de migration cellulaires.

RESULTATS

Les figures indiquées dans ce chapitre correspondent aux figures des articles.

ARTICLE I

**"Quail *PAX-6* (*PAX-QNR*) Encodes a Transcription Factor
Able to Bind and *Trans* -activate Its Own Promoter."**

Serge Plaza, Christine Dozier et Simon Saule

Cell Growth & Differentiation, 4, 1041-1050, 1993

Le gène *Pax-QNR* code un facteur de transcription capable de fixer et de *trans*-activer son promoteur

1/ Caractérisation du promoteur P0

Pour étudier la régulation transcriptionnelle du gène *Pax-QNR* il est nécessaire de disposer des régions de promotion de ce gène. Initialement, trois ADNc distincts correspondant à trois ARNm transcrits à partir du gène *Pax-QNR* par un mécanisme d'épissage alternatif avaient été isolés. Ces ADNc possèdent des extrémités 5' non codantes divergentes qui correspondent à des exons distincts (voir FIGURE 32). Cette observation suggérait que ces messagers étaient initiés à partir de régions promotrices distinctes.

Dans un premier temps nous avons donc entrepris d'isoler et de caractériser le promoteur initiant la synthèse de l'ARNm MC29-QNR2. Par les expériences de protection à la RNase et d'extension d'amorce réalisées au niveau de l'exon situé le plus 5' du gène (exon 0, Figure 1A) les sites d'initiation de l'ARNm MC29-QNR2 ont été localisés quelques nucléotides en amont de l'ADNc cloné (Figures 1B, 2A et B).

Le séquençage de la région génomique située en amont des sites d'initiation a permis d'identifier une boîte TATA potentielle ainsi qu'une boîte CAAT situées respectivement à 30 et 54 paires de base en amont du site d'initiation (Figure 1B). L'insertion dans les deux orientations du fragment génomique correspondant en amont du gène rapporteur *CAT* (codant l'enzyme bactérienne Chloramphenicol Acetyl Tansferase) et la mesure de l'activité *CAT* obtenue après transfection des constructions résultantes dans des cellules de neurorétine de caille (QNR) montrent effectivement l'existence d'une région de promotion située en amont de l'exon 0 (appelée P0) (Figure 2C).

En vue de rechercher la présence d'éléments *cis* gouvernant la spécificité d'expression tissulaire, ce promoteur a été transfecté dans des cellules embryonnaires de caille (QEC) qui n'expriment pas le gène *Pax-QNR*, et son activité comparée à celle obtenue dans la neurorétine. Le promoteur P0 fonctionne également dans les QEC (Figure 3D), indiquant ainsi qu'il n'est pas



"verrouillé" dans des cellules n'exprimant pas le gène *Pax-QNR*. Ceci suggère que la séquence clonée ne contient pas d'éléments de régulation exclusifs pour l'expression dans la neurorétine.

2/ Mise en évidence d'un mécanisme d'autorégulation

Les protéines à homéodomaine sont souvent impliquées dans la régulation transcriptionnelle du promoteur de leur gène, générant ainsi une boucle d'autorégulation (Serfling, 1989). Nous avons donc entrepris d'étudier si la protéine p46^{Pax-QNR} (codée entre autre par l'ARNm MC29-QNR2, voir FIGURE 32) pouvait réguler son promoteur. Des expériences de co-transfections transitoires du promoteur P0 et d'un vecteur d'expression eucaryote produisant la protéine p46^{Pax-QNR} révèlent que cette protéine régule positivement son promoteur *in vitro* dans les QNR (résultats non publiés) et les QEC (Figure 3B, comparer canal 10 aux canaux 11 et 12). Ce résultat indique que la protéine p46^{Pax-QNR} ne nécessite pas de co-facteurs spécifiques de la neurorétine pour *trans*-activer son promoteur. En réalisant des délétions dans ce promoteur (Figure 3A) et en mesurant le taux d'induction par la protéine p46^{Pax-QNR} des constructions résultantes, nous avons localisé les séquences du promoteur requises pour l'autorégulation dans un fragment de 100 paires de base DraI-Asp718 (Figure 3B, comparer canaux 7, 8 et 9 aux canaux 10, 11 et 12). L'introduction de ces séquences en amont d'un promoteur non régulé par la protéine p46^{Pax-QNR} (promoteur du gène de la conalbumine) lui confère la capacité d'être régulé par cette protéine (Figure 4, comparer canaux 1 et 2 aux canaux 3 et 4). Cependant l'induction est plus faible que celle obtenue avec le promoteur P0 (canaux 11 et 12). La présence d'un motif ATTA, site de fixation pour les protéines à domaine homéo, en amont du site DraI, nous a incité à nous intéresser à cette région. L'introduction du fragment de 200 paires de bases ScaI-Asp718 (étendue de 100 paires de bases en 5' du site DraI) en amont du promoteur de la conalbumine confère à ce promoteur la capacité d'être stimulée par la protéine p46^{Pax-QNR} avec la même efficacité que le promoteur P0 (Figure 4, comparer les canaux 7 et 8 aux canaux 11 et 12). Nous avons alors montré par des expériences de retard de migration électrophorétique sur gel que la protéine p46^{Pax-QNR} se fixe effectivement sur la région de 100 paires de bases identifiée par délétion du promoteur (Figure 5B), cependant la

fixation est plus faible que celle obtenue avec le fragment de 200 paires de bases ScaI-Asp718 (Figure 5A, comparer canaux 3 et 6). Des expériences de protection à la nucléase chimique (orthophénanthroline) ont été réalisées pour déterminer précisément les séquences nucléotidiques reconnues par le domaine paired et le domaine homéo de la protéine p46^{Pax-QNR} : deux sites de fixation pour chacun des domaines ont été identifiés au sein du fragment ScaI-Asp718 (Figure 6).

Pour le domaine homéo, il apparaît que les séquences de fixation ressemblent à celles décrites pour d'autres homéoprotéines et se caractérisent par une richesse en bases A et T avec notamment un consensus de type ATTA (Figure 6B). Toutefois nous n'avons pas noté de sites palindromiques de fixation tels qu'ils ont été récemment décrits pour les homéodomains de type paired (Wilson *et al.* 1993).

En ce qui concerne les séquences de fixation du domaine paired (Figure 6B) : d'une part les deux régions protégées dans le promoteur sont étendues (40 et 51 bases), d'autre part ces régions ne présentent pas d'homologies de séquence entre elles, ce qui ne permet pas de définir un consensus pour la fixation de ce domaine. Nous en concluons que les séquences de reconnaissance du domaine paired sont étendues et dégénérées.

Les expériences réalisées précédemment montrent que la protéine p46^{Pax-QNR} fixe et ainsi *trans*-active plus efficacement lorsque les sites de fixation pour les domaines paired et homéo sont présents (comparer la fixation ainsi que la *trans*-activation des fragments ScaI-Asp718 et DraI-Asp718), ce qui suggère une coopérativité de ces sites pour la fixation. Cependant la présence du site de fixation PB2 pour le domaine paired est essentielle, puisque sa délétion abolit la *trans*-activabilité du promoteur P0 par la protéine p46^{Pax-QNR} (Figure 3B canaux 7 à 9). De plus, les protéines Pax-QNR p32/33, dépourvues de domaine paired mais contenant néanmoins le domaine homéo (Figure 7A et B), sont incapables de *trans*-activer le promoteur P0 (Figure 7C canaux 7 à 9). Ces résultats montrent que le domaine paired de la protéine p46^{Pax-QNR} est essentiel pour la *trans*-activation de son promoteur.

Ces résultats ont permis d'établir que le gène *Pax-QNR* code un facteur de transcription capable de réguler positivement son promoteur. et suggèrent que ce mécanisme de régulation est direct et nécessite la fixation de la protéine sur son promoteur.

La délétion au sein du promoteur d'une partie des séquences de fixation pour la protéine p46^{Pax-QNR} provoque une diminution de l'activité du promoteur dans les QNR (Figure 3C) mais pas dans les QEC (Figure 3B, comparer canaux 7 et 10). Ces résultats, alliés au fait que les séquences de fixation sont également reconnues par la protéine Pax-QNR présente dans des extraits nucléaires de neurorétine (Figure 5A canal 7 et 5C), suggèrent que la protéine p46^{Pax-QNR} participe directement au maintien de l'expression de son gène *in vivo*.

Quail *PAX-6* (*PAX-QNR*) Encodes a Transcription Factor Able to Bind and *Trans*-activate Its Own Promoter¹

Serge Plaza, Christine Dozier, and Simon Saule²

Laboratoire de Différenciation Cellulaire et Moléculaire, Centre National de la Recherche Scientifique E.P. J0056, Institut Pasteur, 1 Rue Calmette, 59019 Lille Cedex, France

Abstract

Proper growth and development of multicellular organisms requires precise regulation of developmental genes. One aspect of this regulation is at the level of transcription from the gene promoters. As an initial approach to understanding the regulation of the *Pax-6* gene, which plays an important role in eye development and perhaps in other developmental processes, we characterized a promoter region of the quail *Pax-6* (*Pax-QNR*) gene. Sequence analysis of the 5' flanking region revealed a TATA-like box and a CAAT box as well as several putative *cis*-regulatory elements. A 1.5-kilobase pair fragment, containing 1386 base pairs of 5' flanking sequence, the first exon, and a portion of the first intron, was able to efficiently promote expression of the bacterial *CAT* gene in quail neuroretina cells. Cotransfection of the *Pax-QNR* promoter with a vector expressing the 46 kilodalton *Pax-QNR* protein resulted in an increase in *Pax-QNR* promoter activity. By electrophoretic migration shift assay and immunoselection experiments, we showed that the *Pax-QNR* protein can interact directly with the *Pax-QNR* promoter. By footprinting experiments, we identified the binding sites for the *Pax-QNR* protein within the promoter region. These results show that *Pax-QNR* encodes a transcriptional activator and that it potentially *trans*-activates its own promoter.

Introduction

A large number of vertebrate developmental control genes have been identified by their homology to *Drosophila* genes that regulate pattern formation and contain conserved DNA binding domains, like the homeobox or the paired box (1-3). Through homology to the paired box sequences of *Drosophila*, nine paired box-containing genes, the *Pax* genes, have been isolated in vertebrates (4, 5). Each member of the family shows spatially and temporally restricted expression patterns during embryonic development (6). The paired box is present alone (in the murine genes *Pax-1*, *Pax-2*, *Pax-5*, and *Pax-8*) or together with the homeobox domain (*Pax-3*, *Pax-4*, *Pax-6*, and *Pax-7*) (6). The ability of the paired domain and homeodomain to bind specific DNA sequences suggests that the proteins containing such structures may be

involved in transcriptional control. Recently, this hypothesis has been verified by demonstrating that the murine *Pax-1* (7), *Pax-2* (8), *Pax-5* (9), and *Pax-8* proteins (10) are transcriptional activators.

The importance of these genes in development is demonstrated by the developmental alterations in the mouse associated with mutations in the *Pax* genes (6). Mutations in the *Pax-6* gene have been associated with the mouse mutant *small eye* (11). Moreover, the corresponding human gene (*AN*) has been found to be deleted or mutated in some cases of the human congenital disorder aniridia (12, 13). The *Pax-6* gene is expressed in the developing central nervous system, the optic cup, the lens, and the overlying epithelium prior to morphological differentiation, and later in the neuronal layer of the retina (14, 15). All of this strongly suggests that *Pax-6* may be involved in the regulation of some of the inductive events that occur during the formation of the eye. Moreover, the restricted expression of this gene suggests transcriptional regulation of expression, with sequence-specific DNA-binding proteins interacting with tissue-specific enhancer and promoter elements. However, to date, nothing is known about the regulation and the role of this gene.

We have recently characterized the quail *Pax-6* gene, named *Pax-QNR*³ (15), and elucidated its complete exon-intron organization (16). We have identified two mRNAs, named MC29-QNR2 and B1, differing by their 5' UTR and resulting from alternative splicing of the *Pax-QNR* gene. We now report the structural and functional analysis of the promoter region initiating the MC29-QNR2 mRNA, as a step toward elucidating the mechanisms involved in the control of its expression. We also show that the 46 Kda *Pax-QNR* protein is a transcriptional activator, able to *trans*-activate its own promoter. These results identify the first target for *Pax-6* gene product.

Results

Cloning and Sequencing of the *Pax-QNR* Promoter. We have previously determined the organization and structure of the quail *Pax-QNR* gene and showed that the 5' UTR of the MC29-QNR2 cDNA is organized in 4 exons (exons 0, 1, 2, and 3, the latter containing the initiation AUG) (16). The restriction map of the genomic region containing the upstream untranslated sequences of the MC29-QNR2 cDNA (exon 0 of the *Pax-QNR* gene) is shown in Fig. 1A. We determined the nucleotide sequence of a 1.5-kbp *Xba*I-*Asp*718 genomic fragment (Fig. 1B), which hybridized to sequences corresponding to the 5' terminus of the MC29-QNR2 cDNA.

Received 8/31/93; revised 9/27/93; accepted 10/1/93.

¹ This work was supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique, the Institut Pasteur de Lille, the Association de Recherche contre le Cancer, and the Association Française Retinitis Pigmentosa.

² To whom requests for reprints should be addressed.

³ The abbreviations used are: QNR, quail neuroretina cells; QEC, quail embryo cells; 5' UTR, 5' untranslated region; Kda, kilodalton(s); cDNA, complementary DNA; bp, base pair(s); kbp, kilobase pair(s); CAT, chloramphenicol acetyltransferase; RSV, Rous sarcoma virus; EMSA, electrophoretic migration shift assay; CRE, cyclic AMP response element; β -gal, β -galactosidase.

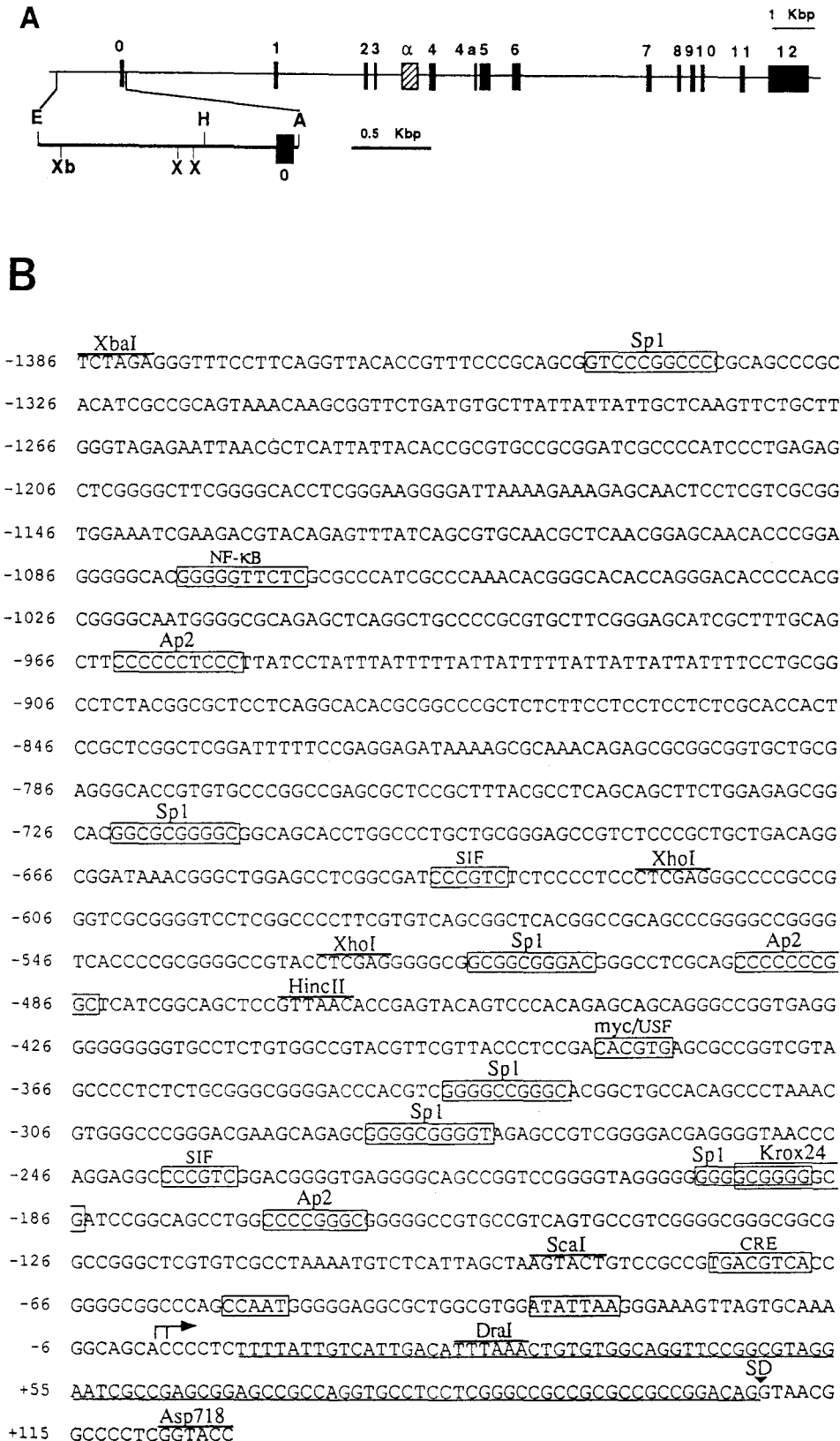


Fig. 1. A, exon structure and restriction map of the 5' end of the quail Pax-QNR gene. The 1.7-kbp EcoRI-Asp718 fragment from the 5' end of the Pax-QNR gene, which contains the sequences present in the 5' end of the cDNA MC29-QNR2 (exon 0), is enlarged. Black boxes, exons; hatched box, alternative exon forming the 5' UTR of the cDNA B1 (16). A, Asp718; E, EcoRI; H, HincII; Xb, XbaI; X, XhoI. B sequence of the Pax-QNR promoter. The sequence corresponds to the 1.5-kbp XbaI-Asp718 fragment of the Pax-QNR gene. Arrows, the transcriptional start sites. The sequence is numbered from the most 5' start site. The TATA box-like sequence, the canonical CAAT box, and the DNA sequence elements homologous to consensus sequences are boxed; the sequence of E0 present in the 5' end of the cDNA MC29-QNR2 (15) is underlined. SD, splice donor, indicating the E0/intron junction.

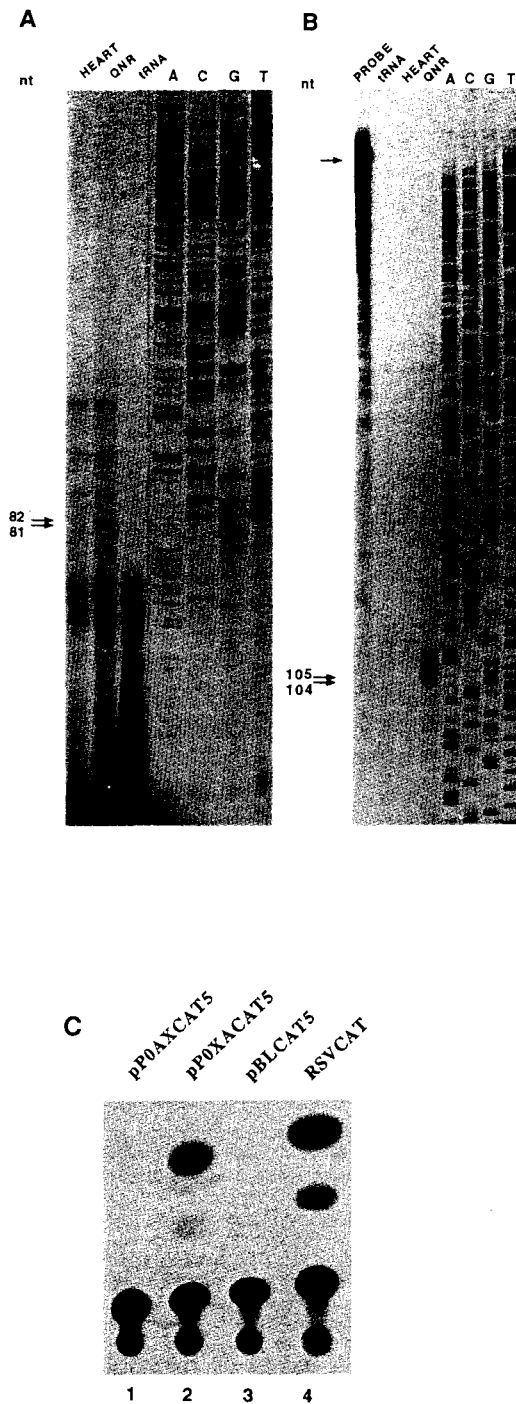


Fig. 2. Mapping of the transcription start sites of the *Pax-QNR* gene and functional analysis of the *Pax-QNR* promoter. **A**, primer extension analysis. Five μg of total quail RNA from neuroretina (QNR) and heart were hybridized to a 5' end-labeled 32-mer oligonucleotide primer. After reaction with reverse transcriptase, the products were analyzed on a 6% sequencing gel along with a sequencing ladder obtained by extending the same primer using cloned *Pax-QNR* genomic sequences as template. Arrows, positions of the transcriptional start sites. **B**, RNase protection analysis. Total RNA (20 μg) from QNR and heart was hybridized with an antisense RNA probe prepared from the 653-bp *XhoI-Asp718* genomic fragment. Following RNase digestion, the samples were analyzed on a 7% sequencing gel. The sequencing ladder (M13mp18 template using the 17-mer universal primer) was used to determine the number of nucleotides protected by the RNAs (arrows). **C**, CAT activities of the promoter region. Plasmids pXA and pAX (pPOXCAT5 and

Determination of the Transcriptional Start Site of the *Pax-QNR* Gene and Functional Analysis of the *Pax-QNR* Promoter. Primer extension and RNase protection were used to identify the transcriptional start site. For the primer extension experiment, a 5'-labeled 32-base primer complementary to cDNA sequences encoded by the first *Pax-QNR* exon (positions +51 to +82 in Fig. 1B) was hybridized to quail RNA isolated from either neuroretina cells, which are known to express *Pax-QNR* mRNAs, or heart, a tissue in which *Pax-QNR* mRNAs are not detected (16), and was extended by reverse transcription. By comparison to a DNA sequencing ladder generated using the same oligonucleotide as a primer for enzymatic DNA synthesis, two primer extension products of 82 and 81 nucleotides appeared when QNR RNA was used but not when heart RNA was used, suggesting that the products arise from specifically primed *Pax-QNR* mRNAs (Fig. 2A). This result was confirmed by a RNase protection assay. A 653-bp *XhoI-Asp718* (from -526 to +127 in Fig. 1B) genomic fragment containing the first exon (E0) was subcloned into the pGEM3 vector. A ^{32}P -labeled RNA probe was synthesized using T7 polymerase and hybridized to either QNR or heart RNA. Two protected fragments approximately 105 and 104 nucleotides in length were observed when QNR RNA was used but not when heart RNA was used (Fig. 2B). The pattern obtained by this method was completely consistent with that seen by the primer extension assay. Therefore, the nucleotide at the position of the upstream extension product was designated +1, the start of transcription initiation.

These results indicate that the 1.5-kbp *XbaI-Asp718* genomic fragment contains the initiation sites for *Pax-QNR* mRNA, located 7 and 6 nucleotides upstream from the beginning of the reported MC29-QNR2 E0 cDNA (underlined in Fig. 1B) (15).

In order to study the promoter activity of the *Pax-QNR* gene, the 1.5-kbp *XbaI-Asp718* fragment was inserted upstream of the bacterial *CAT* gene of pBLCAT5 in both orientations. The resulting plasmids (pXA and pAX) were then transfected into QNR in parallel with pRSVCAT as a positive control and pBLCAT5 as a negative control, and assayed for *CAT* activity. The results showed that the 1.5-kbp *XbaI-Asp718* fragment in the correct orientation (pXA), but not the antisense orientation (pAX), was able to drive the expression of *CAT* in the transiently transfected QNR (Fig. 2C, Lanes 1 and 2). This result confirms the presence of a *Pax-QNR* promoter within the 1.5-kbp *XbaI-Asp718* genomic fragment.

***Pax-QNR* Promoter Elements.** The sequence of the 5' flanking region (Fig. 1B) revealed the presence of a TATA box-like sequence (ATATTAA) and a canonical CAAT box, located respectively 30 and 54 nucleotides upstream of the transcriptional initiation sites, at positions consistent with those usually found in eukaryotes. A computer-assisted search revealed a number of potential regulatory elements: six putative Sp1 binding sites matching at least 9 bp of the consensus Sp1 binding sequence $\text{G}_T\text{GGGCGG}^{\text{G}}/\text{A}^{\text{G}}/\text{A}^{\text{C}}/\text{T}$ (17); a sequence GCGGGGCG (position -194), matching

pPOXCAT5, respectively, in the figure) contain the 1.5-kbp *XbaI-Asp718* fragment cloned in the pBLCAT5 reporter plasmid, upstream of the *CAT* gene in the sense or the antisense orientation, respectively. QNR were transfected with pAX (Lane 1) and pXA (Lane 2) (10 μg each). Ten μg of the promoterless vector (pBLCAT5, Lane 3) was used as a negative control. One μg of the pRSVCAT was used as a positive control (Lane 4), and 0.5 μg of plasmid RSV β -gal was cotransfected with the *CAT* constructs as an internal control of transfection efficiency. The *CAT* activities were assayed 48 h posttransfection.

exactly a binding site for the transcription factors Krox20 and Krox24 (18, 19) and overlapping the Sp1-like sequence at position -197; three potential binding sites for the transcription factor Ap2 (positions -963, -494, and -171) (20, 21); two sequences CCCGTC (positions -638 and -239), homologous to the c-sis/PDGF-responsive element also found in the human c-fos promoter (22); a potential binding site for the b/HLH/LZ nuclear factors, myc and USF, CACGTG (position -385) (for a review, see Ref. 23); a cyclic AMP response element, TGACGTCA (position -76) (24); and, finally, a NF- κ B-like sequence (position -1078), differing from the consensus sequence (GGGR^AC_TTYCC) (25) by only one nucleotide.

Autoregulation of the Pax-QNR Promoter by the Pax-QNR Protein. Many homeobox-containing genes in *Drosophila* regulate their own expression (for a review, see Ref. 26). In order to determine whether the Pax-QNR protein is able to regulate the Pax-QNR promoter, equal amounts of pXA were cotransfected together with increasing amounts of a vector carrying the quail Pax-QNR cDNA MC29-QNR2 (pJ3 Ω 103) into QEC, which are devoid of endogenous Pax-QNR (27) and therefore could provide a useful system to study Pax-QNR potential autoregulation. Cell lysates were collected 2 days after transfection, and the levels of CAT activity present in the lysates were determined. Cotransfection of the pXA with the vector expressing the Pax-QNR protein resulted in a 9-fold increase of CAT activity relative to the vector control (Fig. 3B, compare Lanes 10 and 12). Similar experiments performed in QNR cells showed identical results (data not shown). Thus, the 46 Kda Pax-QNR protein is a transcriptional activator acting positively on its own promoter.

To map the Pax-QNR-responsive element(s) in the Pax-QNR promoter, 5' and 3' deletion mutants of the promoter were tested for Pax-QNR sensitivity in transient cotransfection assays. The 5' deleted mutant containing the promoter sequences from the *HincII* site (position -467) to the *Asp718* site (position +127) (construct pHA; named pP0HACAT5 in Fig. 3A) was still increased by Pax-QNR in a cotransfection assay (Fig. 3B, Lanes 4-6), whereas a deletion of the 3' end from *DraI* (position +27) to *Asp718* (position +127) (constructs pHD and pXD; named pP0HDCAT5 and pP0XDCAT5, respectively, in Fig. 3A) eliminated the Pax-QNR sensitivity in a cotransfection assay (Fig. 3B, Lanes 1-3 and 7-9). This analysis delineated a region important for Pax-QNR transcriptional activation, to the 100-nucleotide fragment between +27 to +127 in the Pax-QNR 5' coding region.

We were interested to know whether Pax-QNR autoregulation takes place *in vivo*. To address this question, we compared the promoter activity of the pXA and pXD constructs transfected into QNR. The results of the CAT assay showed that pXD give CAT activity about 23% of that of the pXA construct (Fig. 3C), whereas no difference in promoter activity was observed between these two constructs in QEC (Fig. 3B; compare Lanes 7 and 10). These results indicate that the sequences between +27 and +127, previously shown to mediate Pax-QNR autoactivation, contribute to expression of the Pax-QNR gene in QNR. To further investigate this point, pXA was transfected into both QNR and QEC, and the promoter activity was compared. Results revealed that the pXA construct exhibited a 2.5-fold lower CAT activity in QEC than that obtained in QNR (Fig. 3D). To verify that the results obtained were not due to differences in transfection efficiency between the two cell types, we also

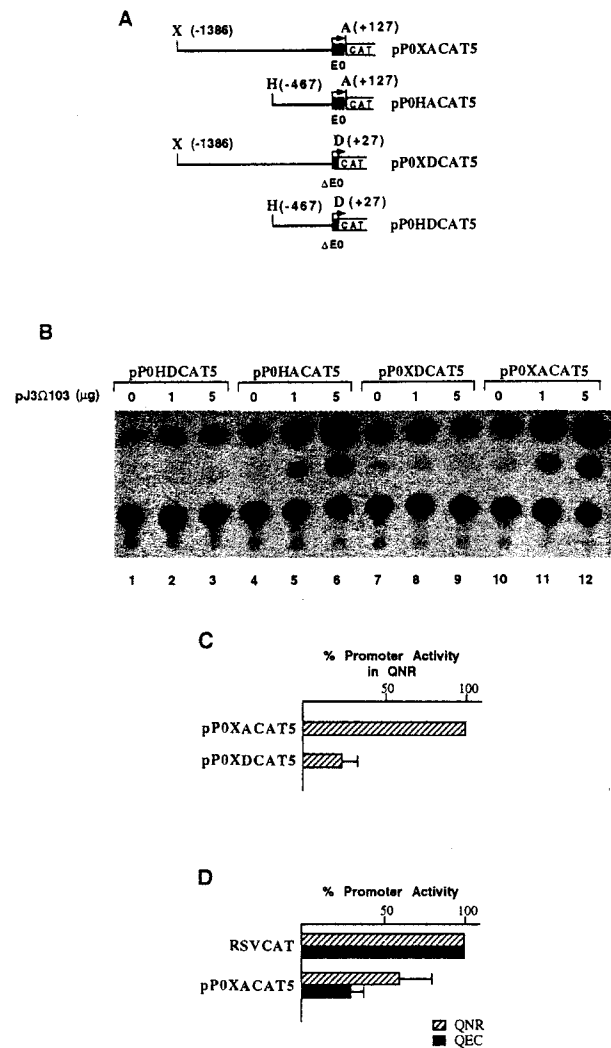


Fig. 3. Activation of the Pax-QNR promoter by the Pax-QNR protein. A, structure of the deleted CAT constructs. A, *Asp718*; D, *DraI*; H, *HincII*; X, *XbaI*. B, analysis of Pax-QNR promoter deletion constructs for activation by Pax-QNR. QEC were transfected with 1 μ g of CAT constructs and increasing amounts of the Pax-QNR expression plasmid, pJ3 Ω 103, containing the MC29-QNR2 cDNA insert. The total amount of DNA in the transfection was kept constant by addition of the vector control, pJ3 Ω . The CAT activities were performed using equal amounts of proteins. C, comparative expression of pXA and pXD (pP0XACAT5 and pP0XDCAT5, respectively, in the figure) in QNR cells. The plasmids (10 μ g) were cotransfected with 0.5 μ g of plasmid pRSV β -gal (as an internal control of transfection efficiency) into QNR. The CAT activity of the pXA construct was chosen as a reference and was arbitrarily set at 100. The CAT activities were normalized with respect to the β -galactosidase activity using equal amounts of total proteins. The results shown are the averages of three separate experiments, with SEM (bars) indicated. D, expression of Pax-QNR promoter in QNR and QEC cells. The pXA (10 μ g) and pRSVCAT (1 μ g) constructs were cotransfected with 0.5 μ g of pRSV β -gal into either QNR or QEC. The results obtained for the Pax-QNR promoter are compared directly with those for the pRSVCAT. The results shown are the averages of three separate experiments, with SEM (bars) indicated.

transfected pRSVCAT, as a control plasmid, which was expressed as efficiently in QNR as in QEC (Fig. 3D). These results demonstrate that Pax-QNR promoter activity is lower in cells which do not express the Pax-QNR protein. All of these data suggest that Pax-QNR autoactivation takes place *in vivo*.

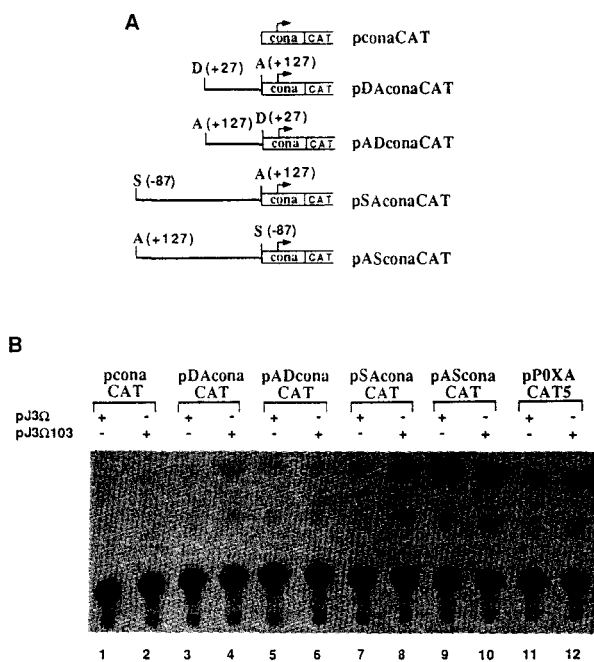


Fig. 4. A 214-bp fragment confers Pax-QNR-dependent activation on a heterologous promoter. **A**, structure of the CAT constructs. **A**, *Asp718*; **D**, *Dral*; **S**, *Scal*. Arrows, orientation of the Pax-QNR fragments cloned upstream of the conalbumin promoter. **B**, CAT activities of the constructs in the presence of the Pax-QNR protein. One μ g of CAT constructs was cotransfected into QEC with 5 μ g of Pax-QNR expression (pJ3 Ω 103) or control (pJ3 Ω) plasmids.

A 214-bp Fragment Derived from -87 to +127 Confers Full Pax-QNR Sensitivity on a Heterologous Promoter. To determine whether the 100-bp *Dral-Asp718* fragment (positions +27 to +127) could confer the Pax-QNR sensitivity on a heterologous promoter, this fragment was inserted in both orientations upstream of a minimal conalbumin promoter linked to the *CAT* reporter gene (pcona). The resulting constructs (*pDAcona* and *pADcona*; Fig. 4A) were transfected into QEC either with the control expression vector pJ3 Ω or with pJ3 Ω 103. Whereas expression from the conalbumin promoter is not affected by Pax-QNR (Fig. 4B, Lanes 1 and 2), the presence of the 100-bp *Dral-Asp718* fragment in the sense orientation upstream of this promoter (construct *pDAcona*; Fig. 4A) increased its CAT activity in the presence of Pax-QNR (Fig. 4B, Lanes 3 and 4, reproducible increase of 2-fold). Thus, the +27 to +127 region of the *Pax-QNR* promoter is sufficient to confer Pax-QNR sensitivity on a heterologous promoter. However, the Pax-QNR-mediated activation obtained is much lower compared to that obtained with the *Pax-QNR* promoter construct pXA (Fig. 4B, Lanes 11 and 12). This suggests that there are additional sequences in the *Pax-QNR* promoter that mediated full Pax-QNR activation.

The sequence extending 5' of the 100-bp *Dral-Asp718* fragment exhibits an ATTA motif, found in the e5 sequence from the *even skipped* promoter and described to bind the homeodomains of the *Drosophila* Paired (Prd), the murine Pax3, and the quail Pax-6 (Pax-QNR) proteins (3, 16, 28). To investigate a potential role of these sequences in the Pax-QNR-mediated activation of the *Pax-QNR* promoter, the 214-bp *Scal-Asp718* fragment (positions -87 to +127) was inserted in both orientations upstream of the conalbumin

promoter. The resulting constructs (*pSAcona* and *pAScona*; Fig. 4A) were tested for Pax-QNR sensitivity in transient cotransfection assays. Results show that the 214-bp *Scal-Asp718* fragment in the sense orientation (construct *pSAcona*; Fig. 4A) is able to promote Pax-QNR-responsive *trans*-activation (Fig. 4B, Lanes 7 and 8) with the same efficiency as that obtained with the *Pax-QNR* promoter construct pXA (Fig. 4B, Lanes 11 and 12). In the antisense orientation (*pAScona*), the basal level of CAT activity is unexpectedly high, but the construct is unresponsive to Pax-QNR (Fig. 4B, Lanes 9 and 10). Thus, the -87 to +127 region of the *Pax-QNR* promoter appears to mediate the full Pax-QNR responsiveness.

The Pax-QNR Promoter Binds the Pax-QNR Protein. To determine whether the Pax-QNR protein *trans*-activates its promoter by binding directly to the DNA sequences identified previously, the latter were tested for direct protein-DNA binding by EMSA. Purified 100-bp *Dral-Asp718* and 214-bp *Scal-Asp718* fragments were labeled and incubated with *in vitro* synthesized Pax-QNR protein. One DNA-protein complex was detected with the two probes (Fig. 5A, Lanes 3 and 6), but the intensity of the band obtained with the *Scal-Asp718* probe (Fig. 5A, Lane 3) was higher than that obtained with the *Dral-Asp718* probe (Fig. 5A, Lane 6), suggesting that the Pax-QNR protein binds more efficiently to this probe (see below). The formation of the complexes was completely blocked after the addition of a specific antiserum directed against the Pax-QNR protein (Fig. 5B, Lane 4) but not after the addition of preimmune serum (Fig. 5B, Lane 5) (identical results were obtained with the two probes; thus, only the results obtained with the 100-bp *Dral-Asp718* probe are presented). When the *Dral-Asp718* probe was incubated with nuclear extracts from either QNR or QEC, a DNA-protein complex, comigrating with the complex formed with *in vitro* synthesized Pax-QNR protein, was detected in extracts from QNR (Fig. 5A, Lane 7) but not in extracts from QEC (Fig. 5A, Lane 8), which are devoid of Pax-QNR products (27), suggesting that the endogenous Pax-QNR protein binds the *Dral-Asp718* fragment. The same assay performed with the *Scal-Asp718* probe revealed a large protein-DNA complex remaining at the top of the gel (data not shown). Therefore, to demonstrate that endogenous Pax-QNR binds to its promoter region, the *Scal-Asp718* probe was incubated with either the *in vitro* synthesized Pax-QNR protein (as a positive control) or nuclear extracts from QNR or QEC, and anti Pax-QNR serum was added. The DNA probe that was immunoprecipitated as a result of its association with the Pax-QNR protein was visualized on a polyacrylamide gel. As shown in Fig. 5C, the probe was immunoprecipitated by the anti Pax-QNR serum when *in vitro* synthesized Pax-QNR protein or QNR nuclear extracts were used (Fig. 5C, Lanes 1 and 3) but not when QEC nuclear extracts were used (Fig. 5C, Lane 2). These results clearly demonstrate a physical binding of the Pax-QNR protein to the *Pax-QNR* promoter sequences shown to mediate the Pax-QNR activation.

Analysis of the Promoter Sequences Interacting with the Pax-QNR Protein. To map the sequences recognized by Pax-QNR within the 214-bp *Scal-Asp718* fragment, footprinting experiments were performed. Since we have previously shown that the Pax-QNR homeodomain and paired domain can bind to DNA when separated from each other (16), a scaled-up band shift experiment was performed using bacterially expressed paired, homeo, or the fusion peptide MS2 (as a negative control) peptides (described in Ref. 16).

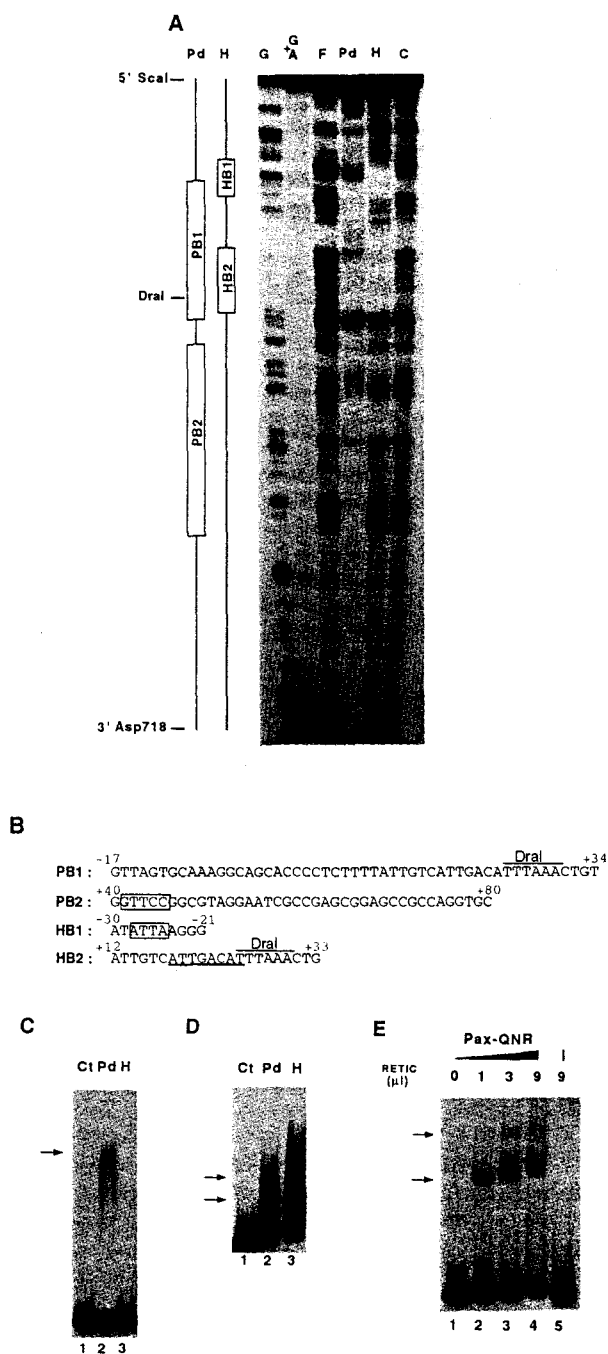


Fig. 6. The *Pax-QNR* promoter contains multiple paired and homeodomain binding sites. **A**, orthophenanthroline footprinting of the *Pax-QNR* promoter region. The *Scal-Asp718* fragment was ³²P labeled at the 5' end and incubated alone (*Lane F*) or with the bacterially expressed fusion protein containing either the paired domain (*Lane Pd*), the homeodomain (*Lane H*), or the fusion peptide MS2 as control (*Lane C*). Orthophenanthroline footprints of the free and bound DNA were analyzed on a denaturing gel; the regions protected by the paired domain (*PB1* and *PB2*) and the homeodomain (*HB1* and *HB2*) are shown at left. **B**, summary of the footprinting results. The consensus ATTA and GTTC motifs are boxed. The sequence showing homology with the consensus sequence for the Prd homeodomain is underlined. **C**, the 100-bp *Dral-Asp718* probe was incubated in a binding assay with the bacterially expressed fusion proteins containing either the paired (*Pd*; *Lane 2*), the homeo (*H*; *Lane 3*), or the carboxy-terminal (negative control, *Ct*; *Lane 1*) domains of the *Pax-QNR* protein. **D**, the 214-bp *Scal-Asp718* probe was incubated in a binding assay with either the bacterially expressed paired, homeo, or carboxy-terminal domains of the *Pax-QNR* protein. **E**, multiple *Pax-QNR* proteins can

Discussion

As a first step toward elucidating the mechanisms involved in the control of the expression of the quail *Pax-6* (*Pax-QNR*) gene, we have isolated and characterized the promoter region initiating the synthesis of the MC29-QNR2 mRNA (15). A combination of primer extension analysis and RNase protection experiments has been used to map the transcription initiation site for the *Pax-QNR* gene. We found this site 108/107 nucleotides upstream of the 3' end of exon 0. The sequence of the 5' flanking region reveals the presence, at the positions expected, of promoter elements typical of RNA polymerase II-transcribed genes: a TATA-like box (position -30) and a canonical CAAT box (position -54). A number of sequences previously shown to function as regulatory elements in other systems are found within the *Pax-QNR* 5' flanking region. These include potential Ap2 and Krox20/Krox24 binding sites, CRE, and an E box sequence, potential binding sites for the b/HLH/LZ nuclear factors, myc and USF. Interestingly, the zinc finger factor Krox20 binds the mouse homeobox-containing gene *Hox-1.4*; this transcription factor has been implicated in early central nervous system development and, like *Pax-6*, is expressed in rhombomeres of the developing hindbrain (19). Similarly, USF has been involved in the transcriptional regulation of the murine homeobox-containing gene *Hox-2.3* (29). Moreover, it has been suggested that protein binding to an E box sequence plays an important role in the early development of the mouse embryo (30). On the other hand, CRE binds a family of transcription factors, which, like Ap2, can mediate the regulation of gene expression in response to extracellular signaling. These sites provide potential targets for factors that may participate in the mitogenic or differentiation events. It will be of interest to determine which of these elements actually regulate *Pax-QNR* gene expression during retinal development.

The 1.5-kbp *XbaI-Asp718* fragment was able to drive the expression of the *CAT* gene in quail *Pax-QNR*-expressing (QNR) and *Pax-QNR*-nonexpressing (QEC) cells, although to a lesser extent. Our data indicate that tissue-specific expression of the *Pax-QNR* promoter does not reside within the sequences located between -1386 and +127 (with respect to the transcription start site), since this promoter also functions in fibroblast cells. This suggests that cell-specific expression of *Pax-QNR* requires additional upstream or downstream unidentified sequences or is the result of posttranscriptional regulation, as for the *N-myc* gene (31).

Numerous homeobox-containing genes in *Drosophila* control their own expression (26). We show here that positive autoregulation is also a property of the *Pax-QNR* gene. Indeed, the *Pax-QNR* promoter is *trans*-activated in the presence of overexpressed *Pax-QNR* protein. This result indicates that the 46 Kda *Pax-QNR* protein is a transcriptional activator, a property demonstrated for Pax-1 (7), Pax-2 (8), Pax-5 (9), and Pax-8 proteins (10). Deletion analysis showed that a 100-nucleotide region in the *Pax-QNR* promoter (fragment *Dral-Asp718*, positions +27 to +127) was necessary for *Pax-QNR* autoactivation. However, a 214-bp *Scal-Asp718* fragment (positions -87 to +127) encompassing the

interact simultaneously with the *Pax-QNR* promoter. The 214-bp *Scal-Asp718* probe was incubated in a binding assay with increasing amounts of *in vitro* translated *Pax-QNR* protein (*Lanes 2-4*); *Lane 5*, anti *Pax-QNR* serum was added to the DNA-binding reaction to confirm the specificity of the complexes obtained (arrows at left).

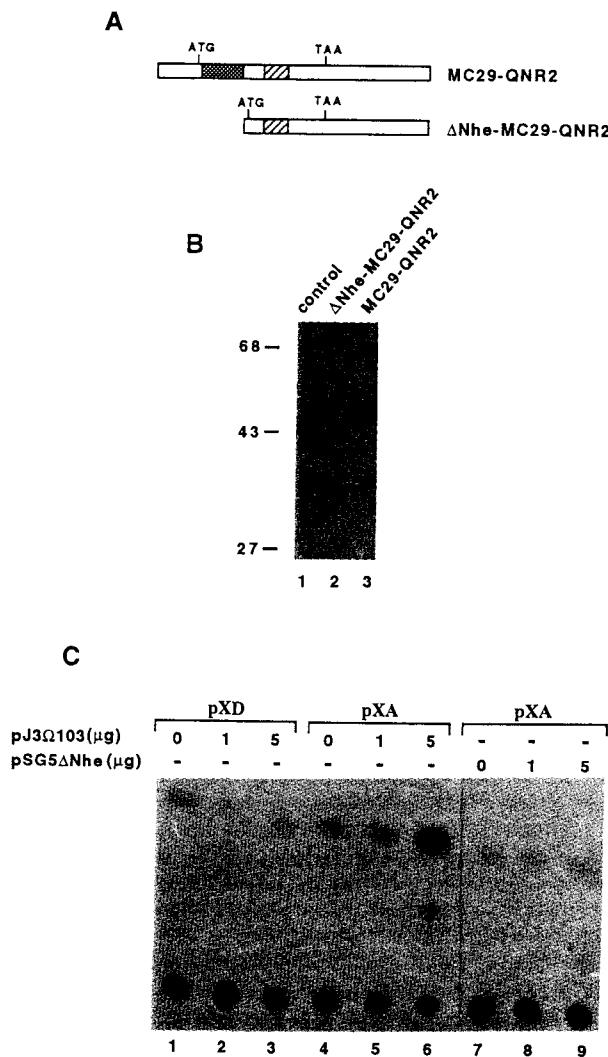


Fig. 7. Trans-activation of the Pax-QNR promoter by the Pax-QNR protein requires DNA binding. **A**, schematic representation of the MC29-QNR2 cDNA and of the paired-deleted Pax-QNR mutant, ΔNhe-MC29-QNR2. Gray box, paired domain; hatched boxes, homeodomain. **B**, proteins produced by the Pax-QNR constructs. The MC29-QNR2 and ΔNhe-MC29-QNR2 expression vectors were transiently transfected into Cos-1 cells and analyzed for protein expression by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis after immunoprecipitation with an anti Pax-QNR serum. The molecular weight markers are indicated at left. **C**, analysis of trans-activating capacity of the ΔNhe-MC29-QNR2 construct. QEC were transfected with 1 μg of CAT constructs and increasing amounts of the Pax-QNR expression vectors pJ3Q103 (containing the MC29-QNR2 cDNA insert) or pSG5ΔNhe (containing the ΔNhe-MC29-QNR2 cDNA insert). The total amount of DNA in the transfection was kept constant by addition of the vector control, pJ3Q or pSG5. The CAT activities were performed using equal amounts of proteins.

Dral-Asp718 fragment was needed to confer full Pax-QNR activation to a heterologous promoter. A promoter reporter construct deleted of the *Dral-Asp718* fragment (pXD) exhibited a basal 4-fold lower CAT activity in QNR cells than the undeleted promoter construct (pXA), strongly suggesting that Pax-QNR autoregulation takes place *in vivo*. The Pax-QNR protein can regulate expression from its promoter by binding directly to the *Scal-Asp718* fragment of the Pax-QNR promoter, as demonstrated by EMSA and immunoselection assays. Moreover, a paired domain-deleted Pax-

QNR protein, unable to bind to DNA, was also unable to trans-activate the Pax-QNR promoter, indicating that the trans-activation of the Pax-QNR promoter by the 46 Kda Pax-QNR protein requires DNA binding.

Footprinting experiments revealed two homeodomain binding regions (HB1 and HB2) and two paired domain binding regions (PB1 and PB2) within the *Scal-Asp718* fragment. HB1 and PB2 contain the consensus ATTA and GTTCC motifs, respectively. Since ATTA is found in the homeodomain binding sites of numerous homeodomain proteins (3, 28, 32), this suggests that other homeodomain-containing proteins might regulate the Pax-QNR promoter. The consensus motifs are not found in the PB1 and HB2 regions, a situation already found for the e4 site in the *even-skipped* promoter, also described to bind Prd (3). Lack of consensus sequence has already been demonstrated for Pax-8 in the Tg and TPO promoters (10). However, the HB2 region contains the sequence ATTGACAT, very close to the sequence TTTGACGT described to bind the Prd homeodomain (32).

The paired and homeodomains of Pax-QNR can bind to the Pax-QNR promoter independently. However, the Pax-QNR protein was shown to bind better to the *Scal-Asp718* fragment than to *Dral-Asp718* fragment. The latter contains only a paired domain binding site, whereas the former contains both homeo and paired domain binding sites. This suggests that the efficient binding of Pax-QNR may require both the homeo and the paired domains and could be interpreted as an indication of cooperativity between the two protein domains, as it has been proposed for the binding of Prd on the e4 site of the *even-skipped* promoter (4). It is interesting to note in this regard that putative paired and homeodomain binding sites (such as the sequences ATTGACAT in HB2 and GTTCC in PB2) of the Pax-QNR promoter are spaced by two helix turns like the imperfect paired and homeodomain binding stretches of the e4 sequence. In the case of the e5 sequence, where no cooperativity between the two domains was demonstrated for the binding of Prd, only one helix turn separates the two consensus ATTA and GTTCC motifs.

The importance of the paired binding region PB2, present in the *Dral-Asp718* fragment, was emphasized by the lack of Pax-QNR responsiveness of the *Dral-Asp718*-deleted constructs (pXD and pHD). However, PB2 alone was not sufficient to mediate the full Pax-QNR responsiveness on a heterologous promoter. Therefore, a cooperativity between PB2 and homeodomain binding sites may explain the increased Pax-QNR responsiveness observed with a fragment containing both PB2 and homeodomain binding sites.

Materials and Methods

Cloning and DNA Sequencing. The isolation of phage λPax-QNR3 has been described previously (16). Appropriate subclones of genomic DNA were ligated into M13 vectors mp18 and mp19. Nucleotide sequence was determined in both orientations by the dideoxy sequencing method using an Applied Biosystem 370A automatic sequencer. To construct the pJ3Q103, a vector expressing the 46 Kda Pax-QNR protein, the 1.5-kbp *Sst*I-*Hind*III fragment of Pax-QNR cDNA MC29-QNR2 (15) was blunt ended and cloned into the *Sma*I site of the pJ3Q vector. The construction of pSG5ΔNhe, the vector expressing a paired deleted Pax-QNR protein, has been described previously (27).

Mapping of Transcription Initiation Sites. Total RNA was isolated from quail embryonic day 10 neuroretina (QNR) or heart by the guanidine isothiocyanate method. For the

RNAse protection assay, a 653-bp *XhoI*-*Asp718* genomic fragment (from -526 to +127) was subcloned into the *Sall*-*Asp718* sites of the pGEM3 vector. The antisense RNA probe was transcribed *in vitro* from the *HindIII*-linearized plasmid using T7 polymerase in the presence of [α - 32 P]CTP under conditions provided by the riboprobe system (Promega). RNAse protections were performed with 20 μ g of RNA from QNR and heart as described previously (34), except that the unhybridized RNAs were digested with 2-fold the concentrations of RNases A and T1 indicated. The protected fragments were separated on a 7% sequencing gel. For the primer extension analysis, a 32-base synthetic oligonucleotide (5'-AGGCACCTGGCGGCTCCGCTCGGCGATT-CCTA-3') complementary to bases +51 to +82 of the *Pax-QNR* promoter, was end labeled with T4 polynucleotide kinase. Five μ g of total RNA from QNR and heart were hybridized to 10^6 cpm of labeled primer in 10 μ l of reverse transcriptase buffer 1 \times (from BRL). The samples were placed for 10 min in a 85°C water bath, which was allowed to cool to 65°C, and then incubated for 30 min at 65°C. Subsequently, 15 μ l of primer extension mixture were added to the annealing mixture. The labeled primer was extended using 300 units of murine leukemia virus reverse transcriptase (BRL) for 45 min at 45°C. After phenol-chloroform extraction, the reaction mixture was precipitated with ethanol. The products were analyzed on a 6% sequencing gel.

Construction of CAT Reporter Plasmids. The 1.5-kbp *XbaI*-*Asp718* genomic fragment was blunt ended and cloned in both orientations into the blunt-ended *XbaI* site of pBLCAT5. The resulting constructs, which contain the promoter sequence in the sense or antisense orientation with respect to the *CAT* gene, were named pXA and pAX, respectively. To obtain the 5' deleted *CAT* construct, pHA, the 594-bp *HincII*-*Asp718* fragment was blunt ended and cloned into the blunt-ended *XbaI* site of pBLCAT5. To obtain the 3' deleted *CAT* constructs, pXD and pHD, the 1413-bp *XbaI*-*DraI* and 494-bp *HincII*-*DraI* fragments, respectively, were blunt ended and cloned into the blunt-ended *XbaI* site of pBLCAT5. The promoter constructs pDAcona and pSAcona were constructed by subcloning, respectively, the 109-bp *DraI*-*BamHI* and 223-bp *Scal*-*BamHI* fragments, excised from pHA, into the blunt-ended *SphI*- and *BamHI*-digested pcona. The promoter constructs pADcona and pAScona were constructed by subcloning, respectively, the 121-bp *SphI*-*DraI* and 235-bp *SphI*-*Scal* fragments, excised from p0AHCAT5, into the *SphI* and blunt-ended *BamHI*-digested pcona. The pRSCAT plasmid contains the *CAT* gene under the control of the Rous sarcoma virus long terminal repeat.

Cell Culture and Transfection. Quail neuroretina cells, prepared from 7-day-old quail embryos, and quail embryo cells were seeded at 5×10^5 cells/60-mm dish in Dulbecco's modified Eagle's medium-10% fetal calf serum, 24 h prior transfection. Transfections were performed by the calcium phosphate method. Cells were cotransfected with 1 or 10 μ g of *CAT* constructs and 0.5 μ g of plasmid RSV β -gal, used as an internal control of transfection efficiency. For the experiments with the vector expressing the *Pax-QNR* protein, cells were cotransfected with 1 μ g of the *CAT* construct and increasing amounts (1 or 5 μ g) of pJ3 Ω 103. The total amount of transfected DNA was kept constant by the addition of vector control pJ3 Ω . For the analysis of the proteins expressed by the *Pax-QNR* constructs, Cos-1 cells were transfected with 10 μ g of *Pax-QNR* expression vectors and as-

ayed for immunoprecipitation procedure 48 h later, as described previously (27).

β -Galactosidase Assays and CAT Assays. Forty-eight h after transfection, the cells were harvested, and cell extracts were prepared as described by Suen and Hung (35). Twenty μ l of the extract were tested for β -galactosidase activity according to Herbomel *et al.* (36). CAT assays were performed on cell extracts as described by Gorman *et al.* (37), using equal amounts of total proteins, which were determined by the Bradford method (Bio-Rad).

In Vitro Transcription and Translation. To synthesize the 46 kDa *Pax-QNR* protein *in vitro*, the 1.5-kbp *SstII*-*HindIII* fragment of *Pax-QNR* cDNA MC29-QNR2 (15) was blunt ended and cloned into the pSP64 and pSP65 vectors. One μ g of plasmid DNA was transcribed and translated in a rabbit reticulocyte lysate in the presence of SP6 polymerase according to the manufacturer's specifications (Promega).

EMSA and Orthophenanthroline Footprinting. The DNA probes used were the 100-bp *DraI*-*Asp718* and 214-bp *Scal*-*Asp718* fragments [32 P]dCTP labeled with the Klenow fragment of DNA polymerase I (Boehringer Mannheim). Nuclei were prepared from QEC and QNR essentially as described previously (38). Nuclear extracts were prepared essentially according to Dignam *et al.* (39). Gel retardation assays were performed with 1 μ g of nuclear extracts or reticulocyte lysates or bacterially expressed paired, homeo, and carboxy-terminal domains, as described previously (16). For band shift assays with antibodies, reticulocyte lysates were incubated for 1 h at 0°C in binding buffer supplemented with 1 μ l of antiserum directed against the carboxy-terminal part of the *Pax-QNR* protein products (described in Ref. 27) or 1 μ l of preimmune serum, prior to introduction of the probe. Orthophenanthroline-copper (Cu^{2+}) footprinting was carried out essentially as described by Kuwabara and Sigman (40), using the 214-bp *Scal*-*Asp718* probe and bacterially expressed paired and homeodomain peptides or fusion peptide MS2.

***Pax-QNR* DNA Immunoprecipitation Assay.** The immunoprecipitation procedure was carried out as described previously (41) using the 214-bp *Scal*-*Asp718* probe, one-fifth of the reticulocyte lysates or nuclear extracts (40 μ g) from QEC or QNR, and 1 μ l of antiserum directed against the carboxy-terminal part of the *Pax-QNR* protein. The labeled DNA was recovered by phenol-chloroform extraction and loaded on a 6% polyacrylamide gel in Tris-borate-EDTA buffer.

Acknowledgments

We thank M. Bailly and B. Quatannens for technical assistance, R. Lafyatis, F. Denhez, and J. Caboche for critical reading of the manuscript, and M. Perros for helpful discussions.

References

- Gehring, W. J., Müller, M., Affolter, M., Percival-Smith, A., Billeter, M., Quian, Y., Otting, G., and Wüthrich, K. The structure of the homeodomain and its functional implications. *Trends Genet.*, 6: 323-329, 1990.
- Kissinger, C., Liu, B., Martin-Blanco, E., Kornberg, T., and Pabo, C. O. Crystal structure of an engrailed homeodomain-DNA complex at 2.8 Å resolution: a framework for understanding homeodomain-DNA interactions. *Cell*, 63: 579-590, 1990.
- Treisman, J., Harris, E., and Desplan, C. The paired box encodes a second DNA-binding domain in the paired homeodomain containing protein. *Genes & Dev.*, 5: 594-604, 1991.
- Walther, C., Guenet, J.-L., Simon, D., Deutch, U., Jostes, B., Goulding, M. D., Plachov, D., Balling, R., and Gruss, P. *Pax*: a murine gene family of paired box containing genes. *Genomics*, 11: 424-434, 1991.

5. Stapleton, P., Weith, A., Urbanek, P., Kozmik, Z., and Busslinger, M. Chromosomal localization of seven PAX genes and cloning of a novel family member, PAX-9. *Nature Genet.*, 3: 292-298, 1993.
6. Gruss, P., and Walther, C. Pax in development. *Cell*, 69: 719-722, 1992.
7. Chalepakis, G., Fritsch, R., Fickenscher, H., Deutsch, U., Goulding, M., and Gruss, P. The molecular basis of the *undulated/Pax-1* mutation. *Cell*, 66: 873-884, 1991.
8. Fickenscher, H. R., Chalepakis, G., and Gruss, P. Murine Pax-2 protein is a sequence-specific trans-activator with expression in the genital system. *DNA & Cell Biol.*, 12: 381-391, 1993.
9. Adams, B., Dörfler, P., Aguzzi, A., Kozmick, Z., Urbanek, P., Maurer-Fogy, I., and Busslinger, M. Pax-5 encodes the transcription factor BSAP and is expressed in B lymphocytes, the developing CNS and adult testis. *Genes & Dev.*, 6: 1589-1607, 1992.
10. Zannini, M., Francis-Lang, H., Plachov, D., and Di Lauro, R. Pax-8, a paired domain-containing protein, binds to a sequence overlapping the recognition site of a homeodomain and activates transcription from two thyroid-specific promoters. *Mol. Cell. Biol.*, 12: 4230-4241, 1992.
11. Hill, R. E., Favor, J., Hogan, B., Ton, C. C., Saunders, G., Hanson, I., Prosser, J., Jordan, T., Hastie, N., and Heyning, V. V. Mouse *small eye* results from mutations in a paired-like homeobox-containing gene. *Nature (Lond.)*, 354: 522-525, 1991.
12. Ton, C. C., Hirvonen, H., Miwa, H., Weil, M., Monaghan, P., Jordan, T., Van Heyning, V., Hastie, N., Meijers-Heijboer, H., Drechsler, M., Royer-Pokora, B., Collins, F., Swaroop, A., Strong, L. C., and Saunders, G. F. Positional cloning and characterization of a paired box- and homeobox-containing gene from the aniridia region. *Cell*, 67: 1059-1074, 1991.
13. Glaser, T., Walton, D. S., and Maas, R. L. Genomic structure, evolutionary conservation and aniridia mutations in the human Pax-6 gene. *Nature Genet.*, 2: 232-239, 1992.
14. Walther, C., and Gruss, P. Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development*, 113: 1435-1449, 1991.
15. Martin, P., Carriere, C., Dozier, C., Quatannens, B., Mirabel, M., Vandebunder, B., Stehelin, D., and Saule, S. Characterization of a pairedbox- and homeobox-containing quail gene (*pax-QNR*) expressed in the neuroretina. *Oncogene*, 7: 1721-1728, 1992.
16. Dozier, C., Carrière, C., Grévin, D., Martin, P., Quatannens, B., Stéhelin, D., and Saule, S. Structure and DNA-binding properties of Pax-QNR, a pairedbox- and homeobox-containing gene. *Cell Growth & Differ.*, 4: 281-289, 1993.
17. Dynan, W. S., Sazer, S., Tjian, R., and Schimke, R. T. Transcription factor Sp1 recognizes a DNA sequence in the mouse dihydrofolate reductase promoter. *Nature (Lond.)*, 319: 246-248, 1986.
18. Christy, B., and Nathans, D. DNA binding site of the growth factor-inducible protein Zif268. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 8737-8741, 1989.
19. Chavrier, P., Vesque, C., Galliot, B., Vigneron, M., Dollé, P., Duboule, D., and Charnay, P. The segment-specific gene *Krox-20* encodes a transcription factor with binding sites in the promoter region of the *Hox-1.4* gene. *EMBO J.*, 9: 1209-1218, 1990.
20. Imagawa, M., Chiu, R., and Karin, M. Transcription factor AP-2 mediates induction by two different signal-transduction pathways: protein kinase C and cAMP. *Cell*, 51: 251-260, 1987.
21. Mitchell, P. J., Wang, C., and Tjian, R. Positive and negative regulation of transcription *in vitro*: enhancer-binding protein AP-2 is inhibited by SV40 T antigen. *Cell*, 50: 847-861, 1987.
22. Wagner, B., Hayes, T. E., Hoban, C. J., and Cochran, B. H. The SIF binding element confers sis/PDGF inducibility onto the *c-fos* promoter. *EMBO J.*, 9: 4477-4484, 1990.
23. Prendergast, G. C., and Ziff, E. B. A new bind for myc. *Trends Genet.*, 8: 91-96, 1992.
24. Montminy, M., Sevarino, K., Wagner, J. A., Mandel, G., and Goodman, R. H. Identification of a cyclic-AMP-responsive element within the rat somatostatin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 6682-6686, 1986.
25. Lenardo, M., and Baltimore, D. NF- κ B: a pleiotropic mediator of inducible and tissue-specific gene control. *Cell*, 58: 227-229, 1989.
26. Serfling, E. Autoregulation—a common property of eukaryotic transcription factors. *Trends Genet.*, 5: 131-292, 1989.
27. Carriere, C., Plaza, S., Martin, P., Quatannens, B., Stehelin, D., and Saule, S. Characterization of quail Pax-6 (Pax-QNR) proteins expressed in the neuroretina. *Mol. Cell. Biol.*, in press, 1993.
28. Goulding, M., Chalepakis, G., Deutsch, U., Erselius, J. R., and Gruss, P. Pax-3, a novel murine DNA binding protein expressed during early neurogenesis. *EMBO J.*, 10: 1135-1147, 1991.
29. Zwartkruis, F., Hoeijmakers, T., Deschamps, J., and Meijlink, F. Characterization of the murine *Hox-2.3* promoter: involvement of the transcription factor USF (MLTF). *Mech. Dev.*, 33: 179-190, 1991.
30. Blangy, A., Léopold, P., Vidal, F., Rassoulzadegan, M., and Cuzin, F. Recognition of the CDE1 motif GTCACATG by mouse nuclear proteins and interference with the early development of the mouse embryo. *Nucleic Acids Res.*, 19: 7243-7250, 1991.
31. Babiss, L. E., and Friedman, J. M. Regulation of N-myc gene expression: use of an adenovirus vector to demonstrate posttranscriptional control. *Mol. Cell. Biol.*, 10: 6700-6708, 1990.
32. Desplan, C., Theis, J., and O'Farrell, P. H. The sequence specificity of homeodomain-DNA interaction. *Cell*, 54: 1081-1090, 1988.
33. Treisman, J., Göncsy, P., Vashishtha, M., Harris, E., and Desplan, C. A single amino acid can determine the DNA binding specificity of homeodomain proteins. *Cell*, 59: 553-562, 1989.
34. Dozier, C., Ansieau, S., Ferreira, E., Coll, J., and Stehelin, D. An alternatively spliced *c-mil/raf* mRNA is predominantly expressed in chicken muscular tissues and conserved among vertebrate species. *Oncogene*, 6: 1307-1311, 1991.
35. Suen, T.-C., and Hung, M.-C. Multiple *cis*- and *trans*-acting elements involved in regulation of the *neu* gene. *Mol. Cell. Biol.*, 10: 6306-6315, 1990.
36. Herbolme, P., Bourachot, B., and Yaniv, M. Two distinct enhancers with different cell specificities coexist in the regulatory region of polyoma. *Cell*, 39: 653-662, 1984.
37. Gorman, C. M., Moffat, L. F., and Howard, B. H. Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyl-transferase. *Mol. Cell. Biol.*, 2: 1044-1051, 1982.
38. Spegelaere, P., Van Hille, B., Spruyt, N., Faisst, S., Cornelis, J. J., and Rommelaere, J. Initiation of transcription for the minute virus of mice P4 promoter is stimulated in rat cells expressing a c-Ha-ras oncogene. *J. Virol.*, 65: 4919-4928, 1991.
39. Dignam, J. D., Lebovitz, R. M., and Roeder, R. G. Accurate transcription initiation by polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res.*, 11: 1475-1489, 1983.
40. Kuwabara, M. D., and Sigman, D. S. Footprinting DNA-protein complexes *in situ* following gel retardation assays using 1,10-phenanthroline-copper ion: *Escherichia coli* RNA polymerase-*lac* promoter complexes. *Biochemistry*, 26: 7234-7238, 1987.
41. Hay, N., Takimoto, M., and Bishop, J. M. A FOS protein is present in a complex that binds a negative regulator of MYC. *Genes & Dev.*, 3: 293-303, 1989.

ARTICLE II

**"C-Myb acts as transcriptional activator of the quail PAX6 (PAX-QNR)
promoter through two different mechanisms."**

Serge Plaza, Nathalie Turque, Christine Dozier, Manuella Bailly et Simon Saule

Oncogene, 10, 329-340, 1995

C-Myb agit comme un activateur transcriptionnel du gène *Pax-QNR* par l'intermédiaire de deux mécanismes d'activation différents

En possession d'une région de promotion du gène *Pax-QNR*, nous nous sommes intéressés à identifier les régulateurs de ce gène. La séquence nucléotidique du promoteur P0 révèle la présence de plusieurs sites de fixation potentiels pour la protéine c-Myb (appelés MRE pour Myb responsive element). Le proto-oncogène *c-myb* code un facteur de transcription qui a recombinaison avec des rétrovirus leucémogènes aviaires E26 et AMV. Ces virus sont capables d'induire la prolifération des cellules de neurorétine (Garrido *et al.* 1992a, b). Des études d'expression des gènes *c-myb* et *Pax-QNR*, réalisées par hybridation *in situ* au cours du développement de la neurorétine aviaire (Figure 9), démontrent une co-expression des ARNm *c-myb* et *Pax-QNR* jusqu'au 5^{ème} jour du développement embryonnaire (E5), stade de prolifération des cellules de neurorétine. A des stades plus tardifs, E7 et E9, l'expression du proto-oncogène *c-myb* se régionalise et diverge de celle de *Pax-QNR*. Lorsque la neurorétine est différenciée (E13) ce gène n'est plus que faiblement exprimé. Nous nous sommes donc demandés si la protéine c-Myb intervient dans la régulation transcriptionnelle du gène *Pax-QNR* dans les stades précoces du développement de la neurorétine.

En réalisant des expériences de co-transfections transitoires du promoteur P0 et d'un vecteur d'expression eucaryote produisant la protéine c-Myb, nous avons montré que cette protéine est capable de stimuler l'activité du promoteur P0 du gène *Pax-QNR* dans les QEC (Figure 1A) et les QNR (Figure 1 C). Cependant, dans les QEC le promoteur P0 est stimulé uniquement à faible concentration de protéine c-Myb, à forte concentration de cette protéine le promoteur n'est pas *trans*-activé (Figure 1 A et B) alors que dans les QNR, le taux d'activation du promoteur est proportionnel à la quantité de protéine c-Myb (Figure 1D). Ces résultats suggèrent que, contrairement aux QEC, il n'existe pas d'événements cellulaires régulant négativement l'activité de la protéine c-Myb dans la neurorétine.

Des expériences de protection à la DNase I, réalisées avec le domaine de liaison à l'ADN de la protéine Myb produit dans un système procaryote, ont permis de définir de nombreux sites

de fixation de cette protéine sur le promoteur P0 (Figure 5) : des sites de basse affinité identifiés à forte concentration de protéine Myb utilisée et des sites de haute affinité révélés à faible concentration de cette protéine. Les différents sites protégés présentent des homologies de séquence avec le consensus de fixation pour la protéine Myb (Table 1). De plus des extraits nucléaires de rétine prélevés à E5 contiennent la protéine c-Myb et leur utilisation dans des expériences de protection à la DNase I révèle des zones de protection sur le promoteur P0 identiques à celles révélés avec le peptide bactérien Myb purifié (résultats non publiés).

L'introduction des séquences contenant des sites de fixation pour la protéine c-Myb en amont d'un promoteur non régulé par cette protéine (promoteur du gène *c-mil* de poulet), confère à ce promoteur la capacité de répondre à la protéine Myb (Figure 3B comparer canaux 4 et 5 à 7 et 8). La protéine c-Myb dépourvue de son domaine de liaison à l'ADN (construction CCC(dDBD)) est incapable de réguler positivement ce promoteur (Figure 3B comparer canaux 7 et 9). De plus la fusion du domaine de liaison à l'ADN de la protéine c-Myb au domaine *trans*-activateur du virus VP16 (construction VVP) résulte en une construction chimérique capable de réguler positivement le promoteur P0 (Figure 4B, Comparer canaux 3 et 4) alors qu'une construction chimérique GAL4-VP16 (possédant le domaine de liaison à l'ADN de la protéine de levure GAL4) est incapable de *trans*-activer P0 (Figure 4B, comparer canaux 1 et 2). Ces résultats suggèrent que la régulation du promoteur P0 par la protéine c-Myb implique la fixation de cette protéine sur les séquences promotrices.

Nous avons également montré que la protéine Myb peut réguler le promoteur P0 suivant un mécanisme indépendant de son activité de liaison à l'ADN : une protéine Myb dépourvue de domaine de liaison à l'ADN (construction CCC(dDBD), Figure 2) est encore capable de stimuler le promoteur P0 (Figure 3B comparer canaux 1 et 3). Ce mécanisme d'action de la protéine Myb, décrit initialement pour le promoteur du gène humain *HSP70* (Klempnauer *et al.* 1989) implique la boîte TATA comme dans le cas de ce promoteur (Foos *et al.* 1993). En effet la conversion de la boîte "TATA" du promoteur P0 en boîte "TATA" d'un promoteur non régulée par la protéine c-Myb dépourvue de son domaine de liaison à l'ADN (promoteur SV40) (Figure

6A), rend le promoteur P0 non stimuable par cette protéine (Figure 6B comparer canaux 8 et 10 à 11 et 13).

Bien que les sites de fixation pour les protéine p46^{Pax-QNR} et c-Myb soient proches nous n'avons pas pu mettre en évidence de synergie entre ces facteurs de transcription sur ce promoteur, seul un effet additif de l'activation de chacune des protéines est observé (Figure 7).

Enfin, l'expression constitutive du gène *c-myb* dans des cellules de neurorétine cultivées *in vitro* permet le maintien d'un haut niveau d'expression de la protéine Pax-QNR (Figure 8 panneaux E et F) contrairement au vecteur contrôle (Figure 8 panneaux C et D).

De ces résultats nous en concluons que le proto-oncogène *c-myb* est un régulateur potentiel de l'expression du gène *Pax-QNR* aux stades précoces du développement de la neurorétine, ce qui élargit le spectre d'activité de cette protéine, jusque là restreint au système hématopoïétique.



C-Myb acts as transcriptional activator of the quail PAX6 (PAX-QNR) promoter through two different mechanisms

Serge Plaza, Nathalie Turque, Christine Dozier, Manuella Bailly and Simon Saule

Laboratoire de Differentiation Cellulaire et Moléculaire, CNRS EP56 Institut Pasteur - 1 Rue Calmette 59019 LILLE Cedex France

To understand the regulation of the *Pax-6* gene, which plays an important role in eye development, we have characterized the promoter region of the quail *Pax-6* (*Pax-QNR*) gene. In addition to TATA and CAAT boxes, sequence analysis revealed several putative cis-regulatory elements among which three myb-responsive elements (MRE). C-myb encodes a nuclear, DNA-binding phosphoprotein that functions as transcriptional regulator. Co-transfection in quail embryo cells of the *Pax-QNR/pax-6* promoter with a vector expressing the 75 kDa c-myb protein resulted in an increase in *Pax-QNR* promoter activity. By footprinting experiments we identified multiple binding sites for the myb protein within the promoter region. Protein containing the myb DNA-binding domain fused to the VP16-transactivation domain was fully efficient in *Pax-QNR* promoter transactivation, demonstrating that myb can transactivate through a direct binding on DNA. However, a myb truncated protein devoid of DNA-binding domain was also able to transactivate the *Pax-QNR* promoter. These results show that this promoter can be transactivated by the myb protein directly as well as indirectly. Finally we show by *in situ* hybridization that c-myb is strongly expressed in the developing neuroretina, simultaneously with *Pax-QNR*. These observations suggest that the c-myb protein may be a regulator of *Pax-QNR/pax-6*.

Keywords: c-myb; Pax-6-regulation; neuroretina

Introduction

Transcriptional regulation by the homeobox proteins is thought to coordinate the precise spatial and temporal sequence of growth and differentiation, and previous studies of *Drosophila* homeobox-containing genes have shown that these genes are involved in the process of pattern formation (see Akam, 1987; Ingham, 1988; for reviews). A large number of vertebrate developmental control genes have been identified by their homology to *Drosophila* sequences. Through homology to the paired-box (specifying a DNA-binding sequence, Treisman *et al.*, 1991) nine paired-box containing genes, the *Pax* gene family, have been isolated in vertebrates (Walther *et al.*, 1991; Stapleton *et al.*, 1993). Each member shows spatially and temporally restricted expression patterns during embryonic development (Kessel and Gruss, 1990). The importance of the *Pax* genes in development is demonstrated by the

developmental alterations in the mouse associated with mutations in these genes. Mutations in the *Pax-6* gene have been associated with the mouse mutant *small eye* (Hill *et al.*, 1991). Moreover, the corresponding human gene (AN) has been found deleted or mutated in some cases of the human congenital disorder aniridia (Ton *et al.*, 1991). The *Pax-6* gene is expressed in the developing central nervous system, the optic cup, lens and overlying epithelium prior to morphological differentiation, and later in the neuronal layers of the retina (Walther and Gruss, 1991; Martin *et al.*, 1992). All of this strongly suggests that *Pax-6* is involved in the regulation of some of the inductive events that occur during the formation of the eye. Moreover, the restricted expression of this gene suggests transcriptional regulation of expression by tissue-specific factors. However, to date nothing is known about the regulation of *Pax-6*.

We have recently characterized the quail *Pax-6* gene, named *Pax-QNR* (Martin *et al.*, 1992), and defined its complete exon-intron organization (Dozier *et al.*, 1993). As a step toward elucidating the mechanisms involved in the control of *Pax-QNR/pax-6* expression, we isolated the promoter region of this gene (Plaza *et al.*, 1993). To identify the factors possibly involved in *Pax-QNR/pax-6* regulation, we examined the promoter region for the presence of already identified DNA-binding sequences for known transactivators. We located three myb responsive elements (PyAAC^G_TG as defined by Biedenkapp *et al.*, 1988) in the *Pax-QNR* promoter region. The chicken c-myb is the progenitor of the v-myb oncogene, which is a truncated and mutated form of the 75kDa c-myb protein product (Klempnauer *et al.*, 1984; Gerondakis and Bishop, 1986). The myb product is present within the cell nucleus, has short half-life, and possesses an intrinsic sequence-specific DNA-binding activity (Boyle *et al.*, 1984; Biedenkapp, *et al.*, 1988; Klempnauer *et al.*, 1984; Moëlling *et al.*, 1984; Howe *et al.*, 1990). Several lines of evidence suggested that myb or myb-related genes may control cellular differentiation through a direct regulation of gene expression. The level of c-myb decreases dramatically upon differentiation of immature myeloblasts, erythroleukemic cells and neuroblastoma cells (Coll *et al.*, 1983; Ramsay *et al.*, 1986; Thiele *et al.*, 1988). In addition, constitutive expression of c-myb prevented the differentiation of erythroleukemic cells (Clarke *et al.*, 1988) and induced cell growth and bFGF responsiveness of chicken neuroretina cells (Garrido *et al.*, 1992b). In transient transfection assays p48^{v-myb} can function as a transactivator of gene expression (Ibanez and Lipsick, 1990; Ness *et al.*, 1989; Weston and Bishop, 1989). To date, three functional domains have been identified in the c-myb product: an amino terminal DNA-binding

domain, a central transcriptional activation domain and a carboxy-terminal negative regulatory region (Sakura *et al.*, 1989; Dubendorff *et al.*, 1992). In addition to the DNA-binding site dependent transactivation, exemplified by the *mim-1* gene whose promoter contains three myb binding sites (Ness *et al.*, 1989; Burk and Klempnauer, 1991), v-myb can transactivate the HSP70 promoter by a DNA-binding independent mechanism (Klempnauer *et al.*, 1989). This mechanism is likely to involve the TATA-box sequence of the promoter (Foos *et al.*, 1993). In addition to *c-myb*, two myb-related genes encoding DNA-binding proteins termed A-myb and B-myb have been identified (Nomura *et al.*, 1988; Bouwmeester *et al.*, 1992; Foos *et al.*, 1992; Lam *et al.*, 1992). B-myb has been shown to be unable to transactivate a myb binding-site containing promoter (Foos *et al.*, 1992) but exhibits the capacity to transactivate the HSP70 promoter (Foos *et al.*, 1993).

Here we show that *Pax-QNR/pax-6* promoter expression is inducible by *c-myb*. By footprinting analysis, we demonstrated multiple myb binding sites scattered in the promoter sequence. Using a fusion protein containing the myb DNA-binding and the VP16 transactivation domain, we demonstrate that *Pax-QNR/pax-6* promoter expression is inducible by *c-myb* by a direct mechanism. Using a myb mutant deleted in the DNA-binding domain, we found that myb can also activate this promoter by an indirect mechanism. Since, as demonstrated by *in situ* hybridization, myb and Pax-QNR are simultaneously expressed in the neuroretina, these results suggest that the *c-myb* protein may be involved in *Pax-QNR/pax-6* transcriptional regulation.

Results

The *Pax-QNR/pax-6* promoter is transactivated by *c-myb*

We have previously characterized the promoter region of the quail *pax-6* (Plaza *et al.*, 1993), initiating the synthesis of the MC29-QNR2 mRNA. A computer-assisted search revealed the presence in the 1.5 Kbp XbaI-Asp718 genomic promoter fragment of a number of potential regulatory elements among which three putative myb binding sites (MRE) matching the consensus myb binding sequence PyAAC^G/rG (Biedenkapp *et al.*, 1988) (MRE1, CAACGG, nucleotides -1105 to -1100; MRE2, CCGTTA, nucleotides -472 to -467; MRE3, TAACGG, nucleotides +110 to +115, see Figure 3 for schematic representation).

In order to determine if the *c-myb* protein is able to regulate the *Pax-QNR* promoter, we co-transfected into quail embryo cells (QEC) equal amounts of plasmid pXA (the 1.5 Kbp XbaI-Asp718 genomic promoter fragment linked to the gene encoding the Chloramphenicol Acetyl Transferase, Plaza *et al.*, 1993) together with increasing amounts of a *c-myb* expression vector. We used a vector encoding the chicken p75^{c-myb}, CCC (Grasser *et al.*, 1991), directing the synthesis of the protein under the control of the retroviral long terminal repeat. Another expression vector, pSG5c-myb was also used. This vector allows p75^{c-myb} expression under the early SV40 promoter. Cell

lysates were collected two days after transfection, and the levels of CAT activity present in the lysates were determined. Co-transfection of the pXA with 1 μ g of the vector expressing the myb protein resulted in a 16-fold increase of CAT activity relative to the vector control (Figure 1A, compare lanes 1 and 2), but when 5 μ g of expression vector was used the level of Pax-QNR promoter transactivation was reduced (compare lanes 2 and 3). Figure 1B shows the results obtained when increasing amounts of pSG5c-myb DNA were

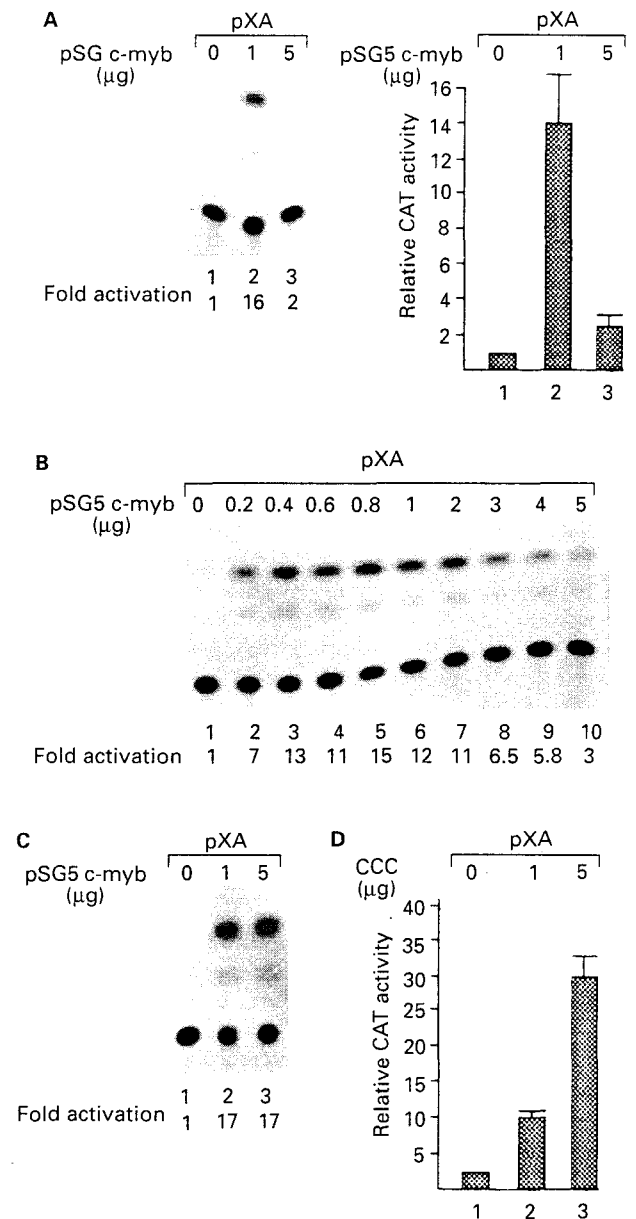


Figure 1 Activation of the *Pax-QNR* promoter by the p75^{c-myb} protein. (A) and (B) QEC were transfected with 1 μ g of CAT construct (pXA) and increasing amounts of the pSG5c-myb encoding the chicken p75^{c-myb}, as indicated on the top of the Figure. The total amount of DNA in the transfection was kept constant by the addition of the vector control, pSG5. (C) QNR cells expressing endogenous *Pax-QNR/pax6* were transfected as in A. Fold activation is indicated on the bottom of the Figure. (D) CNR cells expressing endogenous *Pax-QNR/pax6* were transfected as in A, but the vector encoding the p75^{c-myb} protein is the retroviral vector CCC. The CAT activity of the pXA construct in the absence of exogenous transactivator was arbitrarily designated as 1. Thin lines indicate standard deviations calculated from two transfections performed with two distinct DNA preparations

used. Clearly, the level of Pax-QNR promoter transactivation decreased after a plateau value. The reduced transactivation observed when higher amount of expression vector was used is not a simple quenching effect induced by the vector sequences since the amount of vector is kept constant in each lane by the addition of the empty pSG5 DNA. However, similar experiments performed in quail neuroretina (QNR) or chicken neuroretina (CNR) cells expressing Pax-QNR (Carrière *et al.*, 1993) showed transcriptional activation of the Pax-QNR promoter with a c-myb encoding vector without the reduction of transactivation observed at 5 µg of expression vector (Figure 1C, compare lanes 2 and 3, and Figure 1D). Thus, the 75 kDa c-myb protein is a transcriptional activator of Pax-QNR/pax-6 promoter.

Domain analysis of c-myb using the Pax-QNR/pax-6 promoter

Transcriptional activation studies using murine and human c-myb have shown that deletions in the carboxy-terminal region can greatly increase their transcriptional stimulation capacity (Sakura *et al.*, 1989; Dubendorff *et al.*, 1992). We tested the transactivating properties of deleted c-myb constructs on the Pax-QNR promoter by transient transfection assays in QEC. We tested deletions of c-myb removing either carboxy-terminal sequences (CCd), both amino and carboxy-terminal sequences corresponding approximately to the truncations present in v-myb (dCd), and the DNA-binding domain (CCC(dDBD), Dubendorff *et al.*, 1992, and Figure 2). As shown in Figure 2, the clones encoding the deleted proteins (0.5 µg of transfected DNA) transactivate the pXA reporter with similar efficiency (these clones produced comparable amount of proteins in the transfected cells, data not shown, and Dubendorff *et al.*, 1992). When 5 µg of DNA were used, a reduction in Pax-QNR promoter transactivation was found with all the clones, excepted with the dCd mutant. Therefore, deletions in the carboxyl-terminus do not increase the transcriptional capacities of the deleted myb-protein on the Pax-QNR promoter region.

To map the MRE in the Pax-QNR promoter responsible for myb-induced transactivation, 5' and 3' deletion mutants of the promoter were tested for myb

response by transient transfection assays in QEC. As shown in Figure 3A, all the deleted promoter constructs tested were responsive to c-myb, even when the promoter fragment tested was devoid of classical MRE (compare the response of pXA and pHD reporter constructs). However, when the XbaI-SauI fragment containing the MRE1 was inserted upstream the c-myb unresponsive c-mil minimal promoter (pXSa-mil, Figure 3B), this construct become CCC (lane 8), but not CCC(dDBD) lane 9, inducible. In contrast, a clone containing the HincII-ScaI fragment upstream the c-mil minimal promoter (pHcSca-mil) was found mostly unresponsive to either the CCC or the CCC(dDBD) expression vectors (lanes 11 and 12). Therefore, at least the Pax-QNR genomic fragment containing the MRE1, was found able to confer the c-myb responsiveness to an unresponsive promoter.

Transactivation of the Pax-QNR/pax-6 promoter sequences by the DNA-binding deleted c-myb mutant (CCC (dDBD), Figure 2) and the observation that a Pax-QNR promoter fragment devoid of classical MRE was myb-transactivated, prompted us to determine whether myb product was able to transactivate through a direct binding to the DNA. We therefore tested by transient transfection assays in QEC the transactivating properties of a chimeric protein (VVP protein) containing the DNA-binding domain of v-myb fused to the VP16 carboxy-terminal transactivation domain. This protein is fully active on the neuroretina cells

DBD	ACTIV	CONSERV	Fold activation		
			0,5µg	5µg	
[R1 R2 R3]	[ACTIV]	[CONSERV]	CCC	17,5	3,4
[R1 R2 R3]	[ACTIV]	[CONSERV]	CCC(dDBD)	1,1	3,5
[R1 R2 R3]	[ACTIV]	[CONSERV]	CCd	15,5	4,3
[R2 R3]	[ACTIV]	[CONSERV]	dCd	13,2	10
[R2 R3]	[ACTIV]	[CONSERV]	LX2	1	1

Figure 2 Activation of the Pax-QNR promoter by c-myb and truncated c-myb proteins. QEC were transfected with 1 µg of pXA construct and 0.5 or 5 µg of retroviral constructions expressing myb proteins. The pmil plasmid containing the CAT gene under the control of the minimal chicken c-mil promoter from nucleotides +1 to +298 (Ansieau *et al.*, 1993) was used as a control and was not expressed over the background level. On the left part of the Figure a schematic diagram of the proteins is presented. Three independent transfections performed with two distinct DNA preparations gave similar results

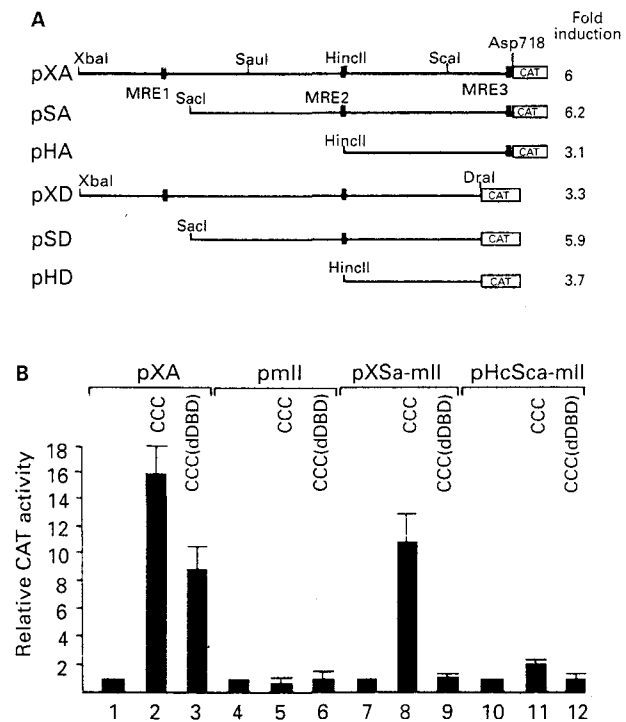


Figure 3 Analysis of Pax-QNR promoter deletion constructs for activation by c-myb. (A) QEC were transfected with 1 µg of CAT constructs and 1 µg of pSG5c-myb DNA expression vector. On the left part of the Figure, a schematic diagram of the different deleted promoter constructs is presented. (B) Activation of a myb-unresponsive c-mil promoter after fusion with parts of the Pax-QNR promoter sequences. The expression vectors used (CCC and CCC(dDBD)) are described in Figure 2. The CAT activity of the different constructs in the absence of exogenous transactivator was arbitrarily designated as 1. Thin lines indicate standard deviations calculated from at least two transfections performed with two distinct DNA preparations

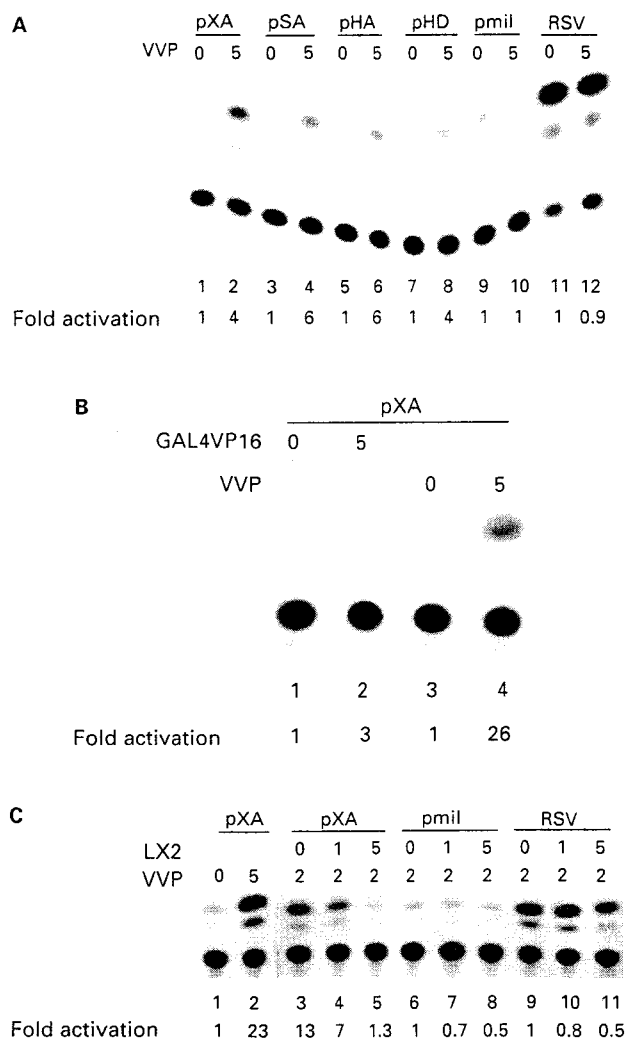


Figure 4 Activation of the Pax-QNR promoter by the VVP protein. (A) QEC were co-transfected with 1 μ g of Pax-QNR promoter CAT constructs following the nomenclature presented in the diagram of Figure 3 and 5 μ g of vector control pnoMAV or, when indicated on the top of the Figure, retroviral constructions expressing the VVP protein. Pmil and RSV CAT constructs were included as negative controls. (B) QEC were co-transfected with 1 μ g of pXA construct and as indicated on the top of the Figure, 5 μ g of retroviral constructions expressing GAL4VP16 or VVP proteins. DNA was kept constant at 5 μ g by the addition of pnoMAV vector. (C) Competition of VVP induced activation by LX2 protein. 1 μ g of pXA construct, 2 μ g of retroviral construction expressing VVP protein, and when indicated, 1 or 5 μ g of LX2 encoding retroviral vector were co-transfected in QEC. Pmil and RSV CAT constructs were included as negative controls

(Garrido *et al.*, 1992a) and when expressed from a proviral vector, VVP stimulated high levels of transcription from a reporter plasmid containing MRE but not from a reporter plasmid without myb-binding sites (Grasser *et al.*, 1992; Ibanez and Lipsick, 1990). Figure 4A shows that transcriptional activation by VVP was found with all Pax-QNR deletion constructs tested, even when no classical MRE were detected (see clone pHD) but no transactivation was obtained with the pmil or RSV CAT constructs, containing two heterologous myb-unresponsive promoters (compare lanes 1 and 2 with lanes 9 and 10 or 11 and 12). Transfection of an expression vector encoding a fusion protein containing the GAL4 DNA binding

domain and the VP16 carboxyl-terminus transactivation domain (GAL4VP16) was unable to transactivate the pXA reporter efficiently (Figure 4B, compare lanes 2 and 4), while this vector is a strong transactivator of a reporter construct containing four GAL4 binding sites (data not shown). This indicates that the transcriptional activation of Pax-QNR promoter obtained with VVP is dependent on the presence of the myb-DNA binding domain. This conclusion is emphasized by the fact that co-transfection of the VVP vector with an expression vector (LX2) encoding the DNA-binding domain and devoid of transactivating activity, (Chen and Lipsick, 1993 and Figure 2) strongly reduced the VVP induced transactivation of pXA (Figure 4C, compare lanes 3 and 5). These results suggest that c-myb can transactivate the Pax-QNR promoter through direct binding on the DNA and that non consensus myb-binding sites must be present in the Pax-QNR/pax-6 promoter.

Analysis of the DNA sequences in the Pax-QNR promoter interacting with the c-myb protein

To map the sequences recognized by c-myb within the 1.5 Kbp XbaI-Asp718 promoter fragment, DNase I footprinting experiments were performed on DNA fragments responsive to myb-induced transactivation (Figure 5) using the R2R3 myb-DNA binding polypeptide (Gabrielsen *et al.*, 1991). Examination of the sequences protected (Table 1) reveals a total of 22 binding sites, 8 almost completely protected by 200 ng of peptide (high-affinity sites including all three MRE consensus sequences) and 14 protected by 1000 ng of peptide (low affinity sites). As already found for other myb-responsive promoter regions (Sureau *et al.*, 1992), the binding affinity of the MREs was not correlated with the length of the protected regions. Only 13 out of 22 protected sites contain the AAC core motif sequence. However, all the high-affinity sites contained this sequence (Table 1), and the low-affinity sites were, as expected, more divergent from the consensus (Weston, 1992) than the high-affinity sites. These results show that multiple binding sites for the c-myb protein are present within the XbaI-Asp718 fragment. The total number of myb-binding sites within this fragment is expected to be over 22, since the sequence between SauI (nucleotide -891) and XhoI (nucleotide -522) was not investigated in footprint. Ten protected sites were found in the HincII-DraI promoter fragment devoid of consensus MRE but still responsive to c-myb (construct pHD, Figure 3A and Figure 4A lanes 7 and 8).

As demonstrated for the human HSP70 promoter (Klempnauer *et al.*, 1989), the Pax-QNR promoter can be transactivated by a myb protein devoid of DNA-binding domain (Figure 2, clone CCC (dDBD)). In the HSP70 promoter, this effect is mediated, in part, by the TATA-box, since the replacement of its TATA-box by the SV40 early promoter TATA-box abolished this myb-induction (Foos *et al.*, 1993). As shown in Figure 3B, the Pax-QNR promoter fragment upstream the ScaI site, is unable to confer a myb DNA-binding independent transactivation response to an heterologous promoter. Therefore, in order to define the role of the Pax-QNR/pax-6 TATA-box in the response to the myb protein devoid of DNA-binding domain, we

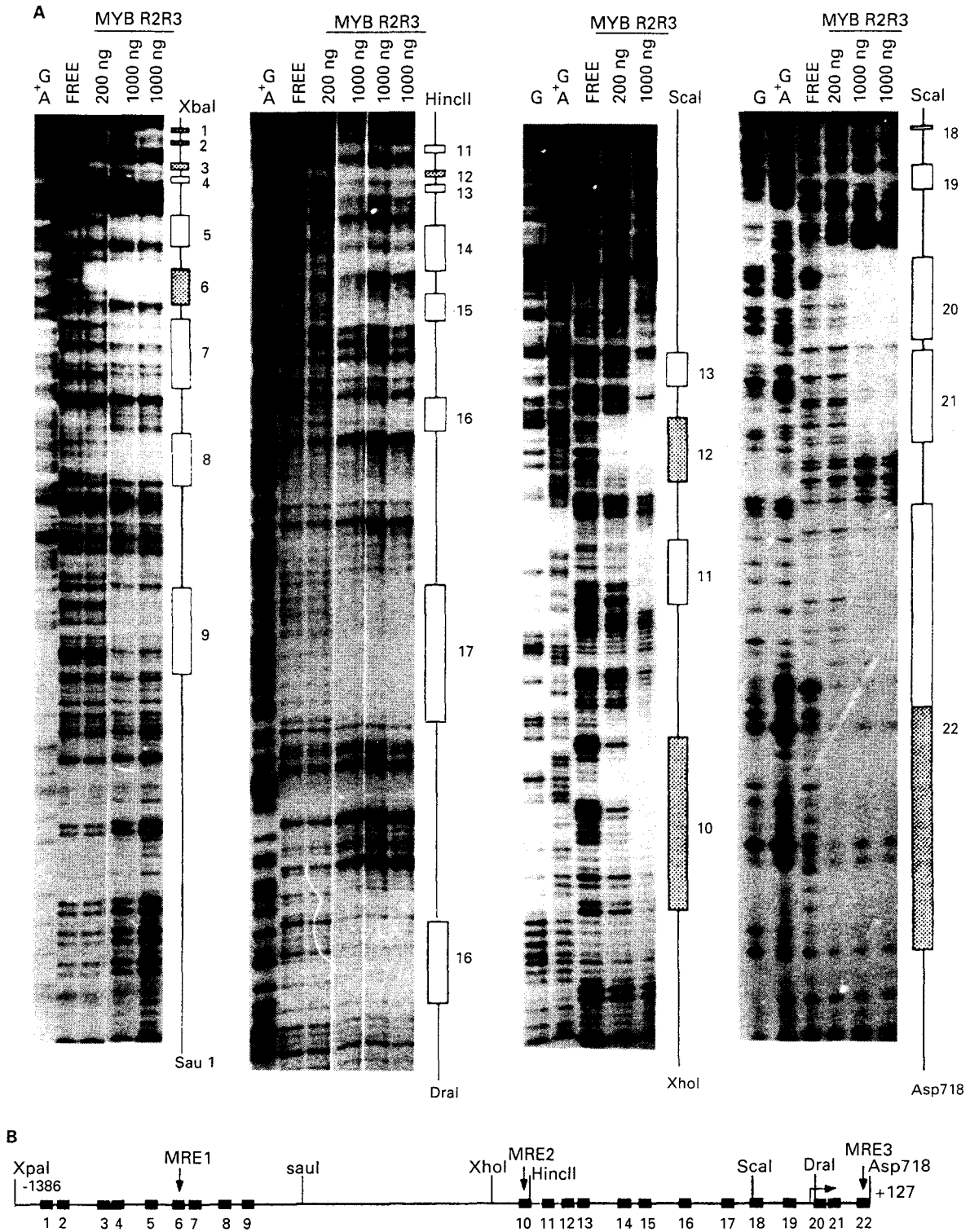


Figure 5 Footprinting analysis of the *Pax-QNR* promoter region. (A) Asymmetrically labelled probes were incubated without (lanes FREE) or with 200 ng or 1 μ g of R2R3 myb DNA-binding polypeptide and then subjected to DNaseI degradation. Sequence ladders (G,A +G) were obtained by the Maxam & Gilbert chemical cleavage of the same end-labelled DNA. Position and length of the protected regions are indicated by vertical boxes on the right of each autoradiogram. Hatched boxes represent high affinity protected sites. Restriction enzymes used to prepare the probes are indicated on the Figure. (B) Schematic drawing of the *Pax-QNR* promoter and summary of footprinting analysis. Note that DNA located between endonuclease restriction sites *Sau*I and *Xho*I (384bp) was not investigated in footprinting experiments

replaced by site directed mutagenesis the *PaxQNR/pax-6* TATA-box (GATATTAAG) by the SV40 early promoter TATA-box (CTTATTTAT) (Figure 6A). Co-transfection experiments in QEC of myb expression vectors (CCC or CCC(dDBD)) and wild type or mutant *Pax-QNR* promoter followed by the analysis of the

transfected QEC RNA by RNAase protection assays show that the specific RNA initiation (127 nt protected fragment, see Figure 6A) is increased by the CCC but not by the CCC (dDBD) expressing vector (compare Figure 6B, lanes 12 and 13). We tested the *Pax-QNR/pax-6* promoter activity by RNAase protection assays

Table 1 Comparison of c-Myb binding sites with the *pax6* (*Pax-QNR*) promoter

protected sites	5'	3'	consensus	C AAC ^G T T T AAC ^G T AA	TT AA
1	TACACCGTTTCCCGCAGCGGTCCCGGCCCGCAGC		1	AAACGGTG	(-1363,-1356)
2	ATCGCCGAGTAAACAAGCGTTCT		2	GAAACGGCT	(-1208,-1201)
3	TAGAGAATTAACGCTCCATTATTA		3	TAACGGTC	(-1255,-1248)
4	GCGTCCCGCGGATCG		6	CAACGGAG	(-1105,-1098)
5	GAAAGAGCAACTCCCTCGTCGC		10	TAACGGAG	(-474,-467)
6	GTGCAACGCTCAACGGAGCAACACC		12	TAACGAAAC	(-401,-394)
7	TTCTCGCGCCATCGCCCAAACACGGG		20	AAACTGTG	(+28,+35)
8	CAATGGGGCGCAGAG		22	TAACGGCC	(+110,+117)
9	ATCGCTTTGCAG				
10	GGCTCATCGGCAGCTCCGTTAACACCGAGT		4	CCCGGGCA	(-1243,-1236)
11	CAGCAGGGCCGGTGAGGGG		5	CAACTCCT	(-1162,-1155)
12	TCTGTGGCCGTACGTTTCGTTACCC		7	CATCGCC	(-1063,-1056)
13	GAGCGCCGGTCGTAG		8	CAATGGG	(-1021,-1014)
14	CGGGCACGGCTGCCACAGCCCTAAACGTGGGCCGGGA		9	CAAAGCGA	(-977,-970)
15	GGGGTAGAGCCGTCGGGA		11	CACCGGCC	(-437,-430)
16	AGCCGGTCCGGG		13	GACCGGG	(-377,-370)
17	GCCGTCAGTCCCGTCGGGGCGGGCGGGCCGGCT		14	AAACGTGG	(-310,-303)
18	TACTGTCCGCCGTA		15	CGACGGCT	(-271,-264)
19	AAGGGAAAGTTAGTGCA		16	GACCGGCT	(-217,-210)
20	ATTTAAACTGTGTGGCAGGTTCCGGCGTAGG		17	CGACGGCA	(-146,-139)
21	GCCGAGCGGAGCCGACAGGTG		18	TCACGGGG	(-81,-74)
22	CCGGACAGGTAACGGCCCTCG		19	TAACGTTT	(-21,-14)
			21	CACCTGGC	(+72,+79)

The nucleotide sequence of the consensus site is from Weston (1992). Numbers, base pairs defined from the *Pax-QNR* promoter sequence (Plaza et al., 1993)

to avoid possible CAT activity background due to non specific RNA initiations. Indeed, all mutated constructs showed a protected fragment of 149 nt, in addition to the expected 127 nt protected fragment. The former protected fragment is most probably due to an additional RNA initiation site located 3 nucleotides downstream of the mutated TATA-box (this fragment is not observed with the wild type promoter, see lanes 3,4 and 8 to 10). Lane 13 shows that the amount of the 127 nt fragment is not increased in the CCC(dDBD) transfected cells when compared with the vector control cells RNA (lane 11). This suggests that, as for HSP70 TATA-box, the transactivation of *Pax-QNR/pax-6* promoter by myb in an indirect way may also requires a peculiar TATA-box, even if the HSP70 and *Pax-QNR/pax-6* TATA-boxes are not identical (TTATAAAA and ATATTAAG respectively).

The *p46^{Pax-QNR}* and *p75^{c-myb}* do not cooperate in *Pax-QNR* promoter transactivation

We were interested to know whether *Pax-QNR/pax-6* autoregulation (Plaza et al., 1993) can be modulated by c-myb, because of the close proximity of the different binding sites. To address this question we compared the promoter activity of the pXA construct co-transfected into QEC with pJ3Q103 vector encoding the *p46^{Pax-QNR}* alone or together with the CCC vector. The result of the CAT assay (Figure 7) showed that the

CAT activity was only additive, showing no synergistic effect between *p46^{Pax-QNR}* and *p75^{c-myb}* in the *Pax-QNR* promoter transcriptional activation (Figure 7, compare lanes 2 and 4).

p75^{c-myb} maintains *Pax-QNR* expression in CNR cells in vitro and c-myb is expressed in the developing neuroretina in vivo

From previous experiments, it was not possible to demonstrate an increase in *Pax-QNR* mRNA after *p75^{c-myb}* expression, and G418 selection, when compared to the unselected neuroretina expression level (Garrido et al., 1992b). Therefore, by indirect immunofluorescence we studied *Pax-QNR* expression in primary CNR cells, as well as in CNR cells expressing the neo^R gene alone, or in addition to the *p75^{c-myb}*. To detect the *Pax-QNR* products, we used two distinct rabbits serums prepared against the paired (serum 11) and carboxyl-terminus domains (serum 14) of the *p46^{Pax-QNR}* (Carrière et al., 1993). Figure 8 demonstrates that *Pax-QNR* found in the normal, unselected, neuroretina (A and B) is only barely detected in control cells expressing the neo^R gene (C and D). In contrast, CCC expressing cells selected after G418 treatment shows labelled nuclei with the two serums (E and F). That the *p75^{c-myb}* selects in an heterogeneous population *Pax-QNR* expressing cells is unlikely, because cells are selected by a G418

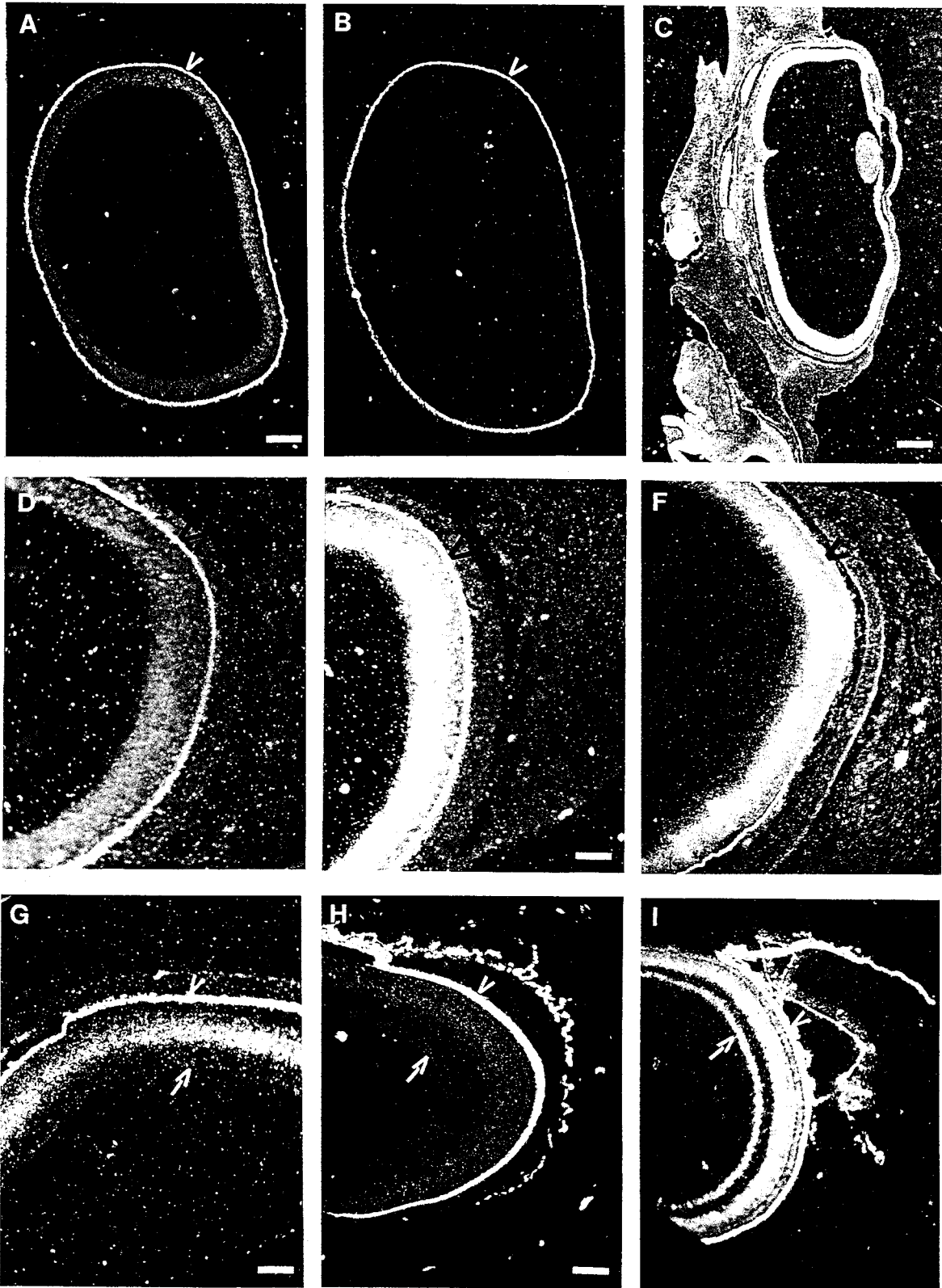


Figure 9 Detection of *Pax-QNR* and *c-myb* RNA by *in situ* hybridization in quail and chicken. (A) Hybridization of E5 chicken eye section with a ^{35}S -labelled myb antisense probe. Arrow head, pigmented retina. Bars: $330\ \mu\text{m}$. (B) Hybridization of E5 chicken eye section with a ^{35}S -labelled myb sense probe (control). (C) Hybridization of E5 chicken eye section with a ^{35}S -labelled *Pax-QNR/pax-6* antisense probe. Bars: $930\ \mu\text{m}$. A, B, C are stereomicroscope views. (D) Hybridization of E5 chicken eye section with a ^{35}S -labelled myb sense probe. No signal over the background is detected. Nuclei were Hoechst 3358 labelled. (E) Hybridization of E5 chicken eye section with a ^{35}S -labelled myb antisense probe. Bars: $300\ \mu\text{m}$. (F) Hybridization of E7 chicken eye section with a ^{35}S -labelled myb antisense probe. (G) Hybridization of E9 quail eye section with a ^{35}S -labelled myb antisense probe. Arrow indicates the ganglionic cell layer. (H) Hybridization of E13 quail eye section with a ^{35}S -labelled myb antisense probe. Bars: $300\ \mu\text{m}$. (I) Hybridization of E13 quail eye section with a ^{35}S -labelled *Pax-QNR/pax-6* antisense probe

entiated neuroretina at E5 (compare A, antisense and B, sense probes). Figure 9 C demonstrates that *Pax-QNR* mRNA detected with the probe used in the Figure 6B (lane 14) and *c-myb* are simultaneously expressed in the neuroretina at E5. Later, when the different cell layers can be differentiated, *c-myb* appears also in *Pax-QNR/pax-6* negative cells (compare G and H with I). These results show that the cells expressing *Pax-QNR* also express *c-myb* at least in the undifferentiated neuroretina.

Discussion

As a first step toward elucidating the mechanisms involved in the control of the expression of the quail *Pax-6* (*Pax-QNR*) gene, we have isolated and characterized the promoter region initiating the synthesis of the MC29-QNR2 mRNA (Plaza et al., 1993). The sequence of *Pax-QNR* promoter region contains several DNA binding sites for transcription factors, among which three canonical myb-responsive elements (MRE, PyAAC_TG, Biedenkapp et al., 1988) -1105/-1100; -472/-467 and +110/+115. The *Pax-QNR* promoter was able to drive the expression of the CAT gene in quail *Pax-QNR* expressing (QNR) and *Pax-QNR* non-expressing (QEC) cells, and can be transactivated by the p46^{Pax-QNR} product *in vitro*. *Pax-QNR/pax-6* products are expected to be involved both in proliferation and differentiation processes. During eye formation, this gene is expressed in the optic cup, lens, overlying epithelium prior to morphological differentiation and later in the neuronal layers of the retina. Three periods in the neuroretina development are defined: (1) cell division from E2 to E8; (2) cell migration and lamination of cell strata from E8 to E10, and (3) terminal differentiation from E10 to hatching. *Pax-QNR/pax-6* can be involved in all of these events, and the amount of *Pax-QNR/pax-6* mRNA increased by a factor 3 between E5 and E8 (Martin et al., 1992). Implication of *Pax-QNR/pax-6* in cellular proliferation is expected, since this gene is able to transform immortalized murine cells when over-expressed (Maulbeck and Gruss, 1993). The *c-myb* protein is a transcriptional activator that is predominantly expressed in hemopoietic cells and can cause leukemia in its virally-activated form (Lüscher and Eisenman, 1990; Graf, 1992). The *c-myb* protein also plays a role outside the hemopoietic system, since *c-myb* decreases dramatically upon differentiation of neuroblastoma cells (Thiele et al., 1988) and antisense myb-oligonucleotides inhibit smooth muscle cells proliferation (Simons, et al., 1992). We found by *in situ* hybridization that *c-myb* is expressed in the developing neuroretina, specially when the neuroretina cells are proliferating.

To test the possible involvement of *c-myb* in *Pax-QNR/pax-6* regulation, we co-transfected *c-myb* expression vectors (we used two different expression vectors with similar results) with *Pax-QNR-CAT* reporter DNA. *C-myb* is able to efficiently transactivate the *Pax-QNR/pax-6* promoter. Based on the evolutionary conservation of specific residues within the myb repeats, an arrangement of 3 α -helices in each repeat is suggested to be homologous to that seen in homeodomains (Frampton et al., 1991; Gabrielsen et

al., 1991). Despite these similarities, transactivation of *Pax-QNR/pax-6* promoter by p46^{Pax-QNR} (which contain a DNA-binding homeodomain) and p75^{c-myb} is only additive.

Two features should be noted:

-First, we found by footprinting experiments that the number of myb binding sites in the promoter region is much higher than 3. At least 22 R2R3 binding sites were identified in the 1.5 Kbp XbaI-Asp718 genomic fragment. Numerous myb binding sites were often observed in myb responsive promoters. For the *myc* gene (Nakagoshi et al., 1992), 15 sites were identified in a 862 bp promoter region, and for the PR264 gene, 11 MREs were located in a 1.1 Kbp region (Sureau et al., 1992). Some MREs observed were far from the canonical myb-binding site described (Weston, 1992). It is difficult to know if these sequences are *in vitro* relaxed-binding sites, or represent functional *c-myb* binding sites. Using 100 μ g of cell nuclear extracts from E5 QNR and the 494bp XbaI-SauI fragment as a probe, we were able to protect MREs 3,5,6,7,8 and 9, but not the MRE4 (data not shown). This suggest that high- and low-affinity myb-binding sites can be occupied with only limited protein amount synthesized *in vivo*. By western blot experiments, we were able to demonstrate p75^{c-myb} in E5 QNR cells (data not shown). In addition, *c-myb* is able to transactivate through sequences devoid of any canonical MREs (Nakano and Graf, 1992). However, we found that MREs 1 to 9, but not MREs 11 to 17 were able to confer the myb-responsiveness to an heterologous promoter. This indicate that all MREs do not allow myb transactivation with a similar efficiency.

-Second, the myb protein can transactivate the *Pax-QNR/pax-6* promoter without DNA-binding domain. This has been previously observed for the HSP70 promoter (Klempner et al., 1989). Mutational analysis of the HSP70 promoter showed that myb-inducibility was dependent on the presence of a particular TATA box (Foos et al., 1993). Replacement in the pScA or pHA reporter constructs of the *Pax-QNR/pax-6* TATA box by the unresponsive SV40E TATA box (Foos et al., 1993) still allows transactivation by the complete *c-myb* but no longer by the DNA-binding deleted protein. Other transcription factors, like the homeodomain-containing *fushi tarazu*, are also able to co-transactivate without DNA-binding domain (Ananthan et al., 1993) and the estrogen receptor devoid of DNA binding domain is functional in the ovalbumin gene co-activation with *c-fos* and *c-jun* (Gaub et al., 1990).

That DNA-binding dependent transactivation is also operative is suggested by the use of the VVP protein (myb DNA-binding domain fused to the VP16 acidic transactivation domain). Since the LX2 construct devoid of transactivating domain (Chen and Lipsick, 1993) but encoding the myb-DNA binding domain, is able to compete the VVP induced transactivation suggests that binding of the transactivating protein on myb binding sites allows transactivation. However, we could not rule out the possibility that the myb-DNA binding domain binds to another protein which itself binds directly the DNA. We do not favor this hypothesis because the R2R3 DNA-binding peptide is able to footprint the *Pax-QNR/pax-6* promoter DNA with high affinity, at least for some sites. Anyway, both

DNA-binding dependent and independent mechanisms are expected to take place in *Pax-QNR/pax-6* promoter transactivation by myb.

An important question is to know whether or not *Pax-QNR/pax-6* is regulated *in vivo* by *c-myb* (or myb-related genes, since we know that the myb family contains at least three members). No obvious abnormalities in the tissues where *pax-6* is expressed (i.e. neural tube, brain, eye, pancreas) have been reported in mice bearing a homozygous disruption of *c-myb* (Mucenski *et al.*, 1991). However, since these embryos died very early, it is not known if these tissues would have differentiated normally. In addition, we were unable to demonstrate *Pax-QNR/pax-6* RNA increase in QEC culture following *c-myb* expression (data not shown). In CCC infected CNR cells, after neomycine selection, *Pax-QNR/pax-6* expression is found in almost all the cells, whereas only few positive cells can be identified in control cells expressing only the neo gene, suggesting that *c-myb* plays a role in the maintenance of *Pax-QNR/pax-6* expression. Also, *c-myb* is found *in vivo* in proliferating neuroretinal cells expressing *pax-6*. Two observations may explain why endogenous *Pax-QNR/pax-6* expression does not follow *c-myb* expression *in vitro*:

First, in transient transfection experiments in QEC, an increase in *c-myb* vector results in a decrease in *Pax-QNR/pax-6* promoter transactivation. This could be explained both by the negative autoregulation of *c-myb* activity by homodimer formation through the leucine zipper (Nomura *et al.*, 1993), or by the negative regulatory carboxy-terminal elements (Dubendorff *et al.*, 1992) and may impair detection of the endogenous *Pax-QNR/pax-6* activation. However, in QNR cells the negative regulation of *c-myb* activity is not observed. In fact, this lack of regulation may explain why in the neuroretina, *c-myb* is biologically active (Garrido *et al.*, 1992b). In this respect, it is interesting to note that a simultaneous deletion of the *c-myb* amino and carboxyl terminus (protein encoded by the dCd vector) resulted in a protein still active at high level in QEC. Since a myb protein only deleted from the carboxyl terminus (protein encoded by the CCD vector), remain negatively regulated at high level on QEC, this suggest that a regulator present in QEC in limited amount and subject to a squelching effect with high amount of *c-myb*, contact the *c-myb* amino terminus and suppress the negative effect of the carboxyl terminus. In fact, truncation of the first DNA-binding repeat of *c-myb* is sufficient to confer a transforming potential to the shortened protein (Dini & Lipsick, 1993) suggesting a regulatory function for this part of the protein.

Second, activation of the first known cellular target gene directly regulated by *c-myb*, *mim-1*, requires the presence of another factor NF-M (or C/EBP) in order to induces *mim-1* in heterologous cells (Ness *et al.*, 1993; Burk *et al.*, 1993). Such factors, yet unknown, may also be required in order to see increased *Pax-QNR/pax-6* expression.

Finally, these results question about the hemopoietic restriction of *c-myb* functions. The role of this transcription factor is clearly broader than previously expected (Thiele *et al.*, 1988; Garrido *et*

al., 1992b; Simons *et al.*, 1992). The expression of *c-myb* during the neuroretina development and its effect on *Pax-QNR/pax-6* expression may be critical for the regulation of this gene, and more generally for the central nervous system development.

Materials and methods

Cell culture and transfection

Quail neuroretina (QNR) or chicken neuroretina (CNR) cells, prepared from 7-day-old embryos, and quail embryo cells (QEC) were seeded at 5×10^5 cells per 60 mm dish in DMEM 10% FCS, 24 h prior transfection. Transfections were performed by the calcium phosphate method. For the experiments with the vector expressing the *c-myb* or Pax-QNR proteins, cells were co-transfected with 1 μ g of the CAT construct and increasing amounts (1 μ g or 5 μ g usually) of expression vector. The total amount of transfected DNA was kept constant by the addition of empty vector DNA: pJ3 Ω for Pax-QNR, pSG5 or NCl α for *c-myb*, *c-myb* and myb mutants expression vectors were described in Dubendorff *et al.*, 1992. For stable transfection experiments, transfected cells selected in medium containing geneticin (400 μ g ml⁻¹) were passaged twice on gelatin-coated dishes before testing.

Immunofluorescence study Normal or transfected cells cultured on collagen-coated 12 mm microscope cover slips were fixed for 20 min with 3.7% paraformaldehyde in PBS. Cells were treated as previously published with sera 11 and 14 (Carrière *et al.*, 1993).

Construction of CAT reporter plasmids The *Pax-QNR* promoter construct pXA contains the 1.5 Kbp XbaI-Asp718 genomic fragment cloned upstream the CAT gene of pBLCAT5 vector (Plaza *et al.*, 1993). To obtain the 5' deleted CAT constructs, pSA and pHA, the 1.1Kbp SacI-Asp718, and 594 bp HincII-Asp718 fragment were blunt-ended and cloned into the blunt-ended XbaI site of pBLCAT5. To obtain the 3' deleted CAT construct, pXD the 1.4Kbp XbaI-DraI was blunt-ended and cloned into the blunt-ended XbaI site of pBLCAT5. To obtain the 5' and 3' deleted CAT constructs pSD and pHD, the 1.0Kbp SacI-DraI and 494 bp HincII-DraI fragments respectively were blunt-ended and cloned into the blunt-ended XbaI site of pBLCAT5. To obtain the pXSa-mil CAT construct, the minimal chicken *c-mil* promoter from nucleotides +1 to +298 (Ansieau *et al.*, 1993) was inserted after appropriate treatments into the pXA vector, in order to replace in the pXA the *Pax-QNR* promoter sequence from SauI to the BamHI site in the polylinker sequence just upstream the CAT gene. Similarly, to obtain the pHcSca-mil CAT construct, the minimal chicken *c-mil* promoter was inserted after appropriate treatments into the pHA vector, in order to replace in this construct, the *Pax-QNR* promoter sequence from ScaI to the BamHI site in the polylinker sequence, just upstream the CAT gene. The pRSVCAT plasmid contains the CAT gene under the control of the Rous sarcoma virus long-terminal repeat (RSV-LTR). The pmil plasmid contains the CAT gene under the control of the minimal chicken *c-mil* promoter from nucleotides +1 to +298 (Ansieau *et al.*, 1993).

CAT assays, luciferase assays and RNAase protection CAT assays were performed as described in Plaza *et al.*, 1993, on cell extracts using equal amounts of total proteins, which were determined by the Bradford method (Bio-Rad). CAT assays were quantified with a Packard Instant Imager.

RNAase protection was performed as previously published (Plaza *et al.*, 1993) with the RNA probe prepared



from the 653 bp XhoI-Asp718 genomic fragment cloned in pGEM3. In some experiments, 1 µg of pSVluc plasmid DNA was co-transfected with CCC(dDBD) clone and Pax-QNR/pax-6 promoter-CAT. Luciferase activity assay was performed as described in Crépieux *et al.*, 1993 on 1% of the cells and RNAase protection performed on the remaining lysate.

In vitro mutagenesis and DNA sequencing The mutagenesis of Pax-QNR TATA box conducted in order to transform the Pax-QNR TATA box (GATATTAAG) into the SV40E TATA box, (CTTATTTAT) have been made on the HincII-Asp718 fragment inserted in the M13 mp19 vector. The single stranded directed mutagenesis was conducted with an Amersham oligonucleotide-directed *in vitro* mutagenesis system, using a mutated oligonucleotide complementary to the Pax-QNR sequence located between nucleotides -37 to -10 (Plaza *et al.*, 1993). Oligonucleotide used is as follow: 5'GCACTAACTTTCCATAAATAAGCACGCC3'. In bold letters are the mutated nucleotides. Nucleotide sequence of the mutated clones was determined by the dideoxynucleotide chain-termination method using a ³⁵S sequencing kit (Pharmacia).

DNAaseI footprinting The DNA probes used were the 494 bp XbaI-SauI, the 594 bp HincII-Asp718, the 439 bp XhoI-ScaI included in the former fragment and the 214 bp ScaI-Asp178 fragments, [³²P] dCTP and dATP labeled with the Klenow fragment of DNA polymerase I (Boehringer). Binding reactions were performed using 5 ng of end-labeled DNA, variable amount of R2R3 peptide (200 ng to 1 µg) in 30 µl of 20% Glycerol, 60 mM KCl, 20 mM Hepes pH 7.9, 0.25 mM EDTA, 0.12 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF,

5 mM MgCl₂, 2.5 mM CaCl₂ with 1 µg of poly dI-dC. Binding was performed 1 h at 4°C and digested for 30 s at 20°C by 20 ng of DNAaseI. Reaction was then stopped by 30 µl of 50 mM EDTA and 0.5 mg ml⁻¹ of proteinase K, phenol extracted, and EtOH precipitated. The recovered DNA was then loaded on a 6% sequencing gel.

In situ hybridization RNA probes were prepared from the 653 bp XhoI-Asp718 genomic fragment cloned in pGEM3 (Plaza *et al.*, 1993). This clone was used to prepare high specific activity ³⁵S-labeled RNA sense and antisense Pax-QNR probes. Chicken *c-myc* probe was prepared from the CCC vector. The 2.0 Kbp ClaI fragment containing the coding sequence was inserted in the pGEM3 vector. Sense and antisense probes were processed and used as described in Quéva *et al.*, 1992.

Acknowledgements

We thank O Gabrielsen and J Lipsick for generous gift of material, and J Lipsick and HJ Chen for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique, Institut Pasteur de Lille, Association pour la Recherche contre le Cancer and the Association Francaise Retinitis Pigmentosa.

References

- Akam M. (1987). *Development*, **101**, 1–22.
- Ananthan J, *et al.* (1993). *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 1599–1609.
- Ansieau S, *et al.* (1993). *Genomics*, **18**, 537–545.
- Biedenkapp H, Borgenmeyer U, Sippel AE and Klempnauer K-H. (1988). *Nature* (London), **335**, 835–837.
- Bouwmeester T, *et al.* (1992). *Mech. Dev.*, **37**, 57–68.
- Boyle W, Lampert A, Lipsick JS, and Baluda MA. (1984). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 4265–4269.
- Burk O and Klempnauer K-H. (1991). *EMBO J.*, **10**, 3713–3719.
- Burk O, Mink S, Ringwald M and Klempnauer K-H. (1993). *EMBO J.*, **12**, 2027–2038.
- Carrière C, *et al.* (1993). *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 7257–7266.
- Chen R-H and Lipsick J. (1993). *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 4423–4431.
- Clarke MF, *et al.* (1988). *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 884–892.
- Coll J, *et al.* (1983). *Exp. Cell. Res.*, **149**, 151–162.
- Crépieux P, *et al.* (1993). *Gene Expression*, **3**, 215–225.
- Dini P and Lipsick J. (1993). *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 7334–7348.
- Dozier C, *et al.* (1993). *Cell Growth and Differentiation*, **4**, 281–289.
- Dubendorff JW, Whittaker LJ, Eltman JT and Lipsick JS. (1992). *Genes Dev.*, **6**, 2524–2535.
- Foos G, Grimm S and Klempnauer K-H. (1992). *EMBO J.*, **11**, 4619–4629.
- Foos G, Natour S and Klempnauer K-H. (1993). *Oncogene*, **8**, 1775–1782.
- Frampton J, *et al.* (1991). *Protein Eng.*, **4**, 891–901.
- Gabrielsen OC, Sentenac A and Fromageot P. (1991). *Science*, **253**, 1140–1143.
- Garrido C, *et al.* (1992a). *J. Virol.*, **66**, 160–166.
- Garrido C, *et al.* (1992b). *J. Virol.*, **66**, 6773–6776.
- Gaub M-P, *et al.* (1990). *Cell*, **63**, 1267–1276.
- Gerondakis S and Bishop JM. (1986). *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 3677–3684.
- Graf T. (1992). *Current Opinion in Genetics and Development*, **2**, 249–255.
- Grässer F, Graf T and Lipsick J. (1991). *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 3987–3996.
- Grässer F, *et al.* (1992). *Oncogene*, **7**, 1005–1009.
- Hill RE, *et al.* (1991). *Nature*, **354**, 522–525.
- Howe KM, Reakes CF and Watson R. (1990). *EMBO J.*, **9**, 161–169.
- Ibanez CE and Lipsick JS. (1990). *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 2285–2293.
- Ingham PW. (1988). *Nature*, **335**, 25–34.
- Kessel M and Gruss P. (1990). *Science*, **249**, 374–379.
- Klempnauer KH, Arnold H and Biedenkapp H. (1989). *Genes Dev.*, **3**, 1582–1589.
- Klempnauer KH, Symonds G, Evan GI and Bishop JM. (1984). *Cell*, **37**, 537–547.
- Lam EW-F, Robinson C and Watson RJ. (1992). *Oncogene*, **7**, 1185–1190.
- Lüscher B and Eisenman R. (1990). *Genes Dev.*, **4**, 2235–2241.
- Martin P, *et al.* (1992). *Oncogene*, **7**, 1721–1728.
- Maulbecker C and Gruss P. (1993). *EMBO J.*, **12**, 2361–2367.
- Moelling K, *et al.* (1984). *Cell*, **40**, 983–9.
- Mucenski M, *et al.* (1991). *Cell*, **65**, 677–689.
- Nakagoshi H, *et al.* (1992). *Oncogene*, **7**, 1233–1240.
- Nakano T and Graf T. (1992). *Oncogene*, **7**, 527–534.
- Ness SA, Marknell A and Graf T. (1989). *Cell*, **59**, 1115–1125.
- Ness SA, *et al.* (1993). *Genes Dev.*, **7**, 749–759.
- Nomura T, *et al.* (1993). *J. Biol. Chem.*, **268**, 21914–21923.
- Nomura T, *et al.* (1988). *Nucleic Acids Res.*, **16**, 11075–11089.
- Plaza S, Dozier C and Saule S. (1993). *Cell Growth and Differentiation*, **4**, 1041–1050.

- Quéva C, et al. (1992). *Development*, **114**, 125–133.
- Ramsay RG, Ikeda K, Rifkind A and Marks PA. (1986). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 6849–6853.
- Sakura H, et al. (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 5758–5762.
- Simons M, et al. (1992). *Nature*, **359**, 67–70.
- Stapleton P, et al. (1993). *Nature Genetics*, **3**, 292–298.
- Sureau A, et al. (1992). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 11683–11687.
- Thiele C, Cohen P and Israel A. (1988). *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 1677–1683.
- Ton CC, et al. (1991). *Cell*, **67**, 1059–1074.
- Treisman J, Harris E and Desplan C. (1991). *Genes Dev.*, **5**, 594–604.
- Walther C, et al. (1991). *Genomics*, **11**, 424–434.
- Walther C and Gruss P. (1991). *Development*, **113**, 1435–1449.
- Weston K and Bishop JM. (1989). *Cell*, **58**, 85–93.
- Weston K. (1992). *Nucleic Acids. Res.*, **20**, 3043–3049.

ARTICLE III

**"Identification and Characterization of a Neuroretina-Specific
Enhancer Element in the Quail *Pax-6* (*Pax-QNR*) Gene"**

Serge Plaza, Christine Dozier, Marie-Claire Langlois et Simon Saule

Molecular and Cellular Biology, 15, 892-903, 1995

Identification et caractérisation d'un activateur du gène *Pax-QNR*, spécifique de la neurorétine.

Dans un deuxième temps, nous avons cherché à définir les mécanismes gouvernant la spécificité tissulaire de l'expression du gène *Pax-QNR*. Des expériences de "run on/off" réalisées avec de la neurorétine embryonnaire de 7 jours, des QEC et des cellules de rétine pigmentaire (RPE, qui n'expriment pas les ARNm initiés au promoteur P0) nous révèlent que le taux de transcription du promoteur P0 est beaucoup plus élevé dans la neurorétine que dans les QEC ou la rétine pigmentaire (Figure 1). Ceci signifie qu'un contrôle transcriptionnel du gène *Pax-QNR* est en partie responsable de la différence d'expression observée entre la neurorétine (*Pax-QNR* exprimé) et le fibroblaste (*Pax-QNR* non exprimé). Nous avons donc entrepris d'isoler les séquences génomiques responsables de la restriction de l'expression du gène *Pax-QNR*. La construction d'un minigène (grand fragment d'ADN génomique cloné en amont du gène rapporteur *CAT*) ainsi que des délétants successifs de ce minigène, et la mesure de l'activité *CAT* des différentes constructions obtenues après transfections transitoires dans des QNR prélevées à 7 jours de développement embryonnaire (E7) ont abouti à l'identification d'une région activatrice située à 7.5 Kbp en aval du promoteur P0 (Figure 2A). L'insertion de cette région, appelée activateur α , en aval du gène *CAT* dans des constructions où ce gène rapporteur est sous la direction des promoteurs P0 ou TK (thymidine kinase), et la transfection transitoire des constructions résultantes dans des QNR E7, des QEC et des RPE, montrent que l'activateur α est spécifique de la neurorétine et active aussi bien le promoteur P0 que le promoteur TK (thymidine kinase) (Figure 2B). L'activateur α est localisé dans un fragment génomique de 210 paires de base (Figure 2C).

La fonction de l'activateur α est régulée au cours du développement puisqu'il est actif sur le promoteur P0 dans des QNR E7 alors qu'il est peu actif dans des QNR E5 (Figure 3B). Ces résultats sont en corrélation avec l'expression des ARNm initiés au promoteur P0 dans la neurorétine *in vivo* : l'expression de ces ARNm, étudiée par des expériences de protection à la RNase, est très faible à E5 et augmente progressivement pour atteindre un plateau à E8 (Figure 3A).

Nous avons ensuite poursuivi la caractérisation structurale et fonctionnelle de l'activateur α . Des expériences de protection à la DNase I réalisées avec des extraits nucléaires de neurorétine, de rétine pigmentaire et de QEC révèlent quatre sites de protection spécifiques de la neurorétine (DF1, DF2, DF3 et DF4) (Figure 4). La délétion de l'un ou l'autre des sites DF au sein de la séquence α réduit son activité ce qui suggère que chacun des sites coopère à l'activité de la séquence α (Figure 6 A). Des expériences de retard de migration électrophorétique sur gel effectuées avec des oligonucléotides correspondant à chacun des sites DF montrent que des facteurs protéiques spécifiques de la neurorétine se fixent sur ces sites (Figure 7A). La détermination du poids moléculaire de ces facteurs par des expériences de "Southwestern", ainsi que des expériences de compétition croisées réalisées à l'aide d'expériences de retard sur gel avec les oligonucléotides DF révèlent que des facteurs apparentés fixent chacun des sites protégés (Figures 7B et 8). Par exemple, la formation du complexe retardé ADN-protéines formé sur le site DF2 est inhibé par l'ajout d'un excès molaire de chacun des quatre oligonucléotides DF non marqués dans le milieu réactionnel (voir figure 8B).

Les données indiquant que l'activateur est constitué d'une multimérisation de sites fixant les mêmes protéines sont confirmées par le fait que la concatémérisation de l'un des sites (DF4) est suffisante pour restituer l'activité de la séquence α (Figure 6B).

Enfin l'activateur α est conservé phylogénétiquement chez la souris (séquence et fonction, Figure 10), suggérant un rôle fonctionnel maintenu au cours de l'évolution.

Identification and Characterization of a Neuroretina-Specific Enhancer Element in the Quail *Pax-6* (*Pax-QNR*) Gene

SERGE PLAZA, CHRISTINE DOZIER, MARIE-CLAIRE LANGLOIS, AND SIMON SAULE*

Laboratoire de différenciation cellulaire et moléculaire, Centre National de la Recherche Scientifique EP 56, Institut Pasteur, 59019 Lille Cedex, France

Received 29 September 1994/Returned for modification 27 October 1994/Accepted 21 November 1994

Using nuclear run-on assays, we showed that the tissue-specific expression of quail *Pax-6* (*Pax-QNR*) P0-initiated mRNAs is due in part to regulation of the gene at the transcriptional level. Regulatory sequences governing neuroretina-specific expression of the P0-initiated mRNAs were investigated. By using reporter-based expression assays, we characterized a region within the *Pax-QNR* gene, located 7.5 kbp downstream from the P0 promoter, that functions as an enhancer in neuroretina cells but not in nonexpressing P0-initiated mRNA cells (quail embryo cells and quail retinal pigment epithelial cells). This enhancer element functioned in a position- and orientation-independent manner both on the *Pax-QNR* P0 promoter and the heterologous thymidine kinase promoter. Moreover, this enhancer element exhibited a developmental stage-specific activity during embryonic neuroretina development: in contrast to activity at day E7, the enhancer activity was very weak at day E5. This paralleled the level of expression of P0-initiated mRNAs observed at the same stages. Using footprinting, gel retardation, and Southwestern (DNA-protein) analysis, we demonstrated the existence of four neuroretina-specific nuclear protein-binding sites, involving multiple unknown factors. In addition we showed that the quail enhancer element is structurally and functionally conserved in mice. All of these results strongly suggest that this enhancer element may contribute to the neuroretina-specific transcriptional regulation of the *Pax-6* gene in vivo.

A large number of vertebrate developmental control genes have been identified by their homology to *Drosophila* genes that regulate pattern formation and contain conserved DNA binding domains, like the homeobox or the paired box (for a review, see reference 14). The *Pax* family, identified in the vertebrate genome by their homology to the paired box sequences of the *Drosophila* segmentation gene *paired*, consists of nine unlinked genes (36, 44) highly conserved during evolution, in various distantly related species such as nematodes, zebra fish, *Drosophila* species, mice, humans, quails, and chickens (25, 27, 33; for a review, see reference 8). The paired box is present alone (in the genes *Pax-1*, *Pax-2*, *Pax-5*, and *Pax-8*) or together with the homeobox domain (*Pax-3*, *Pax-4*, *Pax-6*, and *Pax-7*) (for a review, see reference 41). The predicted structure, nuclear localization, and in vitro binding strongly indicate that *Pax* proteins are transcriptional activators, and this has been directly demonstrated for the *Pax-1* (7), *Pax-2* (16), *Pax-5* (1), *Pax-6* (31), and *Pax-8* (46) proteins.

The *Pax* genes are expressed in a spatially and temporally restricted pattern during embryonic development (for a review, see reference 41), indicating that these genes may be involved in the control of morphogenesis and pattern formation. Indeed, the importance of these genes in development is demonstrated by the developmental alterations in mice associated with mutations in the *Pax* genes (for a review, see reference 41). Mutations in the *Pax-6* gene have been associated with the mouse mutation *small eye* (21), and the corresponding human gene (*AN*) has been found deleted or mutated in many cases of the human disorder aniridia (17; for a review, see reference 38). Moreover, this gene is the homolog of the *eyeless* gene of *Drosophila* species, which is also involved in eye morphogen-

esis (33). The *Pax-6* gene is expressed in the developing central nervous system, the optic cup, the lens, and the overlying epithelium prior to morphological differentiation, and later in the neuronal layer of the retina (25, 27, 43). All of this strongly suggests that *Pax-6* may be involved in the regulation of some of the inductive events that occur during the formation of the eye. In addition, *Pax-6* is also expressed in the endocrine pancreas, where the cells have some traits in common with neurons, despite their distinct embryological origin (42). Thus, the restricted expression of this gene suggests transcriptional regulation of expression, with sequence-specific DNA-binding proteins interacting with tissue-specific enhancer and promoter elements. However, the *cis*-acting elements and *trans*-acting factors for directing the tissue-specific expression of the *Pax-6* gene have not yet been identified.

Our research focuses on the regulatory elements involved in the tissue-specific expression of the quail *Pax-6* gene (termed *Pax-QNR*). This gene expresses at least two mRNAs, named MC29-QNR2 and B1, differing by their 5' untranslated region and resulting from alternative splicing (13). We have recently characterized the promoter region initiating the MC29-QNR2 mRNA (termed P0), and we have shown that the promoter sequences located between positions -1386 and +127 (with respect to the transcription start site) function in *Pax-QNR*-expressing cells (quail neuroretina cells [QNR]) and *Pax-QNR*-nonexpressing cells (quail embryo cells [QEC]) (31). This finding suggested that tissue-specific expression of *Pax-QNR* requires additional upstream or downstream unidentified sequences or is the result of posttranscriptional regulation, as for the *N-myc* gene (2).

In this report, we show that neuroretina-specific expression of P0-initiated mRNAs is, in part, the result of transcriptional control. We have analyzed further the molecular mechanisms responsible for this neuroretina-specific regulation. We have identified a neuroretina-specific 3' enhancer in the quail *Pax-6* gene, located 7.5 kbp downstream from the P0 promoter. In

* Corresponding author. Mailing address: Laboratoire de différenciation cellulaire et moléculaire, CNRS EP 56, Institut Pasteur, 1 rue Calmette, 59019 Lille Cedex, France. Phone: 33 20 87 77 86. Fax: 33 20 87 79 08.

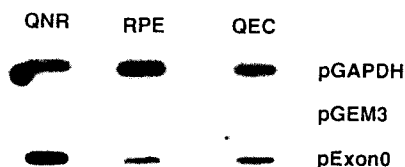


FIG. 1. Nuclear run-on experiments. Shown is an autoradiograph of the hybridization of in vitro transcripts from embryonic E7 QNR (left panel), RPE (middle panel), and QEC (right panel) nuclei. pExon0 contains the 653-bp *XhoI-Asp 718 Pax-QNR* gene fragment (from -526 to +127 [31]) subcloned into the pGEM3 vector. pGAPDH, containing part of the quail GAPDH cDNA, was included as a positive control, while pGEM3 was used as control for nonspecific hybridization signal.

Nucleotide sequence accession number. The nucleotide sequence data of the quail enhancer are included in the sequence appearing in the EMBL nucleotide sequence database under accession number X68168. The nucleotide sequence of the *Mus musculus* enhancer appears in the EMBL nucleotide sequence database under accession number X82150.

RESULTS

Nuclear run-on experiments. In order to determine whether neuroretina-specific expression of *Pax-QNR* P0-initiated mRNAs is due to transcriptional control, in vitro nuclear run-on assays were performed. We compared embryonic day 7 QNR with QEC and embryonic RPE; cells of the latter two types do not express these mRNAs. Thus, nuclei isolated from these cells were incubated with nucleoside triphosphates in the presence of [³²P]UTP, and the nuclear RNA was extracted. An equivalent amount of labeled nuclear RNA from each cell type was hybridized to filters containing the first exon of the *Pax-QNR* gene (exon 0, [13]) cloned in the plasmid vector pGEM3 (pExon0). The controls used included plasmid vector pGEM3 and a plasmid containing a fragment of the quail GAPDH cDNA. The results (Fig. 1) show a higher level of transcripts of the *Pax-QNR* gene in E7 QNR nuclei than in QEC or RPE nuclei, whereas transcription of the GAPDH gene was similar in all three cells. No significant hybridization to a probe upstream of the transcription initiation site (data not shown) was found. Therefore, these data demonstrate that transcriptional regulation takes place in the neuroretina-specific expression of MC29-QNR2 mRNA.

Identification of a neuroretina-specific 3' enhancer within the *Pax-QNR* gene. Previous studies have shown that the -1386 to +127 promoter sequences function relatively equally in both QNR and QEC (31). Thus, additional upstream and/or downstream regulatory elements might be responsible for up-regulating the transcription of the *Pax-QNR* gene in neuroretina cells. To locate potential *cis* control regions regulating the neuroretina-specific transcription of the P0-initiated mRNAs, we tested 5'- and 3'-flanking promoter DNAs for their ability to enhance transcription from the promoter in neuroretina cells. Among the 3'-flanking promoter DNA CAT constructs tested (data not shown), two retained our attention: the pHP and pHE constructs (shown in Fig. 2A), which contain about 8 and 7.5 kbp, respectively, of 3'-flanking promoter sequences upstream of the CAT gene. After transient transfection of these constructs into E7 QNR cells, pHP showed CAT activity (about 8-fold) higher than that observed for the deletion construct pHE (Fig. 2A). This suggests that the 460-bp *EcoRV-PstI* fragment, located 7.5 to 8 kbp 3' to the *Pax-QNR* P0 promoter and deleted in the pHE construct, contains DNA sequences that may increase expression of the reporter gene.

To determine whether this region contains a neuroretina-specific transcriptional enhancer element, the 460-bp *EcoRV-*

PstI fragment was subcloned, in its normal genomic orientation, 3' to the CAT gene in the pP0CAT and pTKCAT vectors, in which the CAT reporter gene is driven by the *Pax-QNR* P0 promoter (31) or the minimal TK promoter (vector pBLCAT5 [5]), respectively (Fig. 2B). The resulting constructs (pP0CAT EP and pTKCAT EP; Fig. 2B) and their parental plasmids pP0CAT and pTKCAT were transiently transfected into E7 QNR, QEC, and RPE and assayed for CAT activity. In this case, the CAT activities of the chimeric CAT constructs were expressed relative to the values for the parental plasmids. The results show (Fig. 2B) that in E7 QNR, the 460-bp *EcoRV-PstI* fragment enhanced CAT activity by the *Pax-QNR* P0 and TK promoters by about 6-fold above the levels of the vectors without enhancer. However, in QEC and RPE, which do not express the P0-initiated mRNAs, the *EcoRV-PstI* fragment failed to enhance CAT activity by the *Pax-QNR* P0 or TK promoters above basal levels (Fig. 2B). The enhancer activity of the 460-bp *EcoRV-PstI* fragment was observed to be slightly lower (about twofold) when assayed in the opposite orientation (data not shown). No enhancer activity was detectable when this fragment was inserted 3' to the CAT gene in the promoterless pBLCAT6 vector (data not shown). These results demonstrate that the 460-bp *EcoRV-PstI* fragment contains a functional neuroretina-specific enhancer element. The activity of this 3' enhancer is not restricted to the *Pax-QNR* P0 promoter and is orientation independent.

In order to characterize more precisely the enhancer element, deletions from the 5' and 3' ends of the *EcoRV-PstI* enhancer fragment were generated and tested for enhancer activity after transient transfection into E7 QNR. The results show (Fig. 2C) that the 5' portion of the *EcoRV-PstI* fragment (construct pTKCAT ED containing the 210-bp *EcoRV-DraI* fragment) retained the full enhancer activity of the *EcoRV-PstI* fragment (compare constructs pTKCAT ED and pTKCAT EP). In contrast, the 3' portion of the *EcoRV-PstI* fragment (construct pTKCAT DP containing the 250-bp *DraI-PstI* fragment) had no enhancer activity (compare pTKCAT DP and pTKCAT). Thus, the enhancer element is located more precisely in a 210-bp *EcoRV-DraI* fragment.

The neuroretina-specific 3' enhancer functions in a developmental stage-dependent manner. We have previously shown that the level of *Pax-QNR* mRNAs, monitored by Northern (RNA) blot analysis, varied during the development of the embryonic avian neuroretina, increasing from day 5 to day 8, when it reaches a plateau (27). Since the *Pax-QNR* gene expresses multiple mRNAs differing by their 5' untranslated region (13), we examined the pattern of expression of the P0-initiated mRNAs during the embryonic quail neuroretina development by RNase protection assays. An antisense labeled RNA probe encompassing exon 0 (described in reference 31 and used to determine the P0 transcriptional start site) was hybridized to total RNAs extracted from embryonic quail neuroretina at day 5 (E5) until day 14 (E14) of development. Results show (Fig. 3A) that the level of P0-initiated mRNAs (indicated by a bracket) was very low in E5 neuroretina, increased markedly from E5 until E8, and remained constant until E14. As a control, the levels of GAPDH mRNA were monitored and were similar among these samples (Fig. 3B). These data are reminiscent of those obtained previously by Northern blot analysis (27).

The low level of P0-initiated mRNAs detected in E5 neuroretina, followed by a marked increase until E8, prompted us to investigate whether the enhancer activity varies with development. Thus, the enhancer constructs described in Fig. 2B and their parental plasmids were transiently transfected into E5 and E7 QNR and assayed for CAT activity. The CAT activities

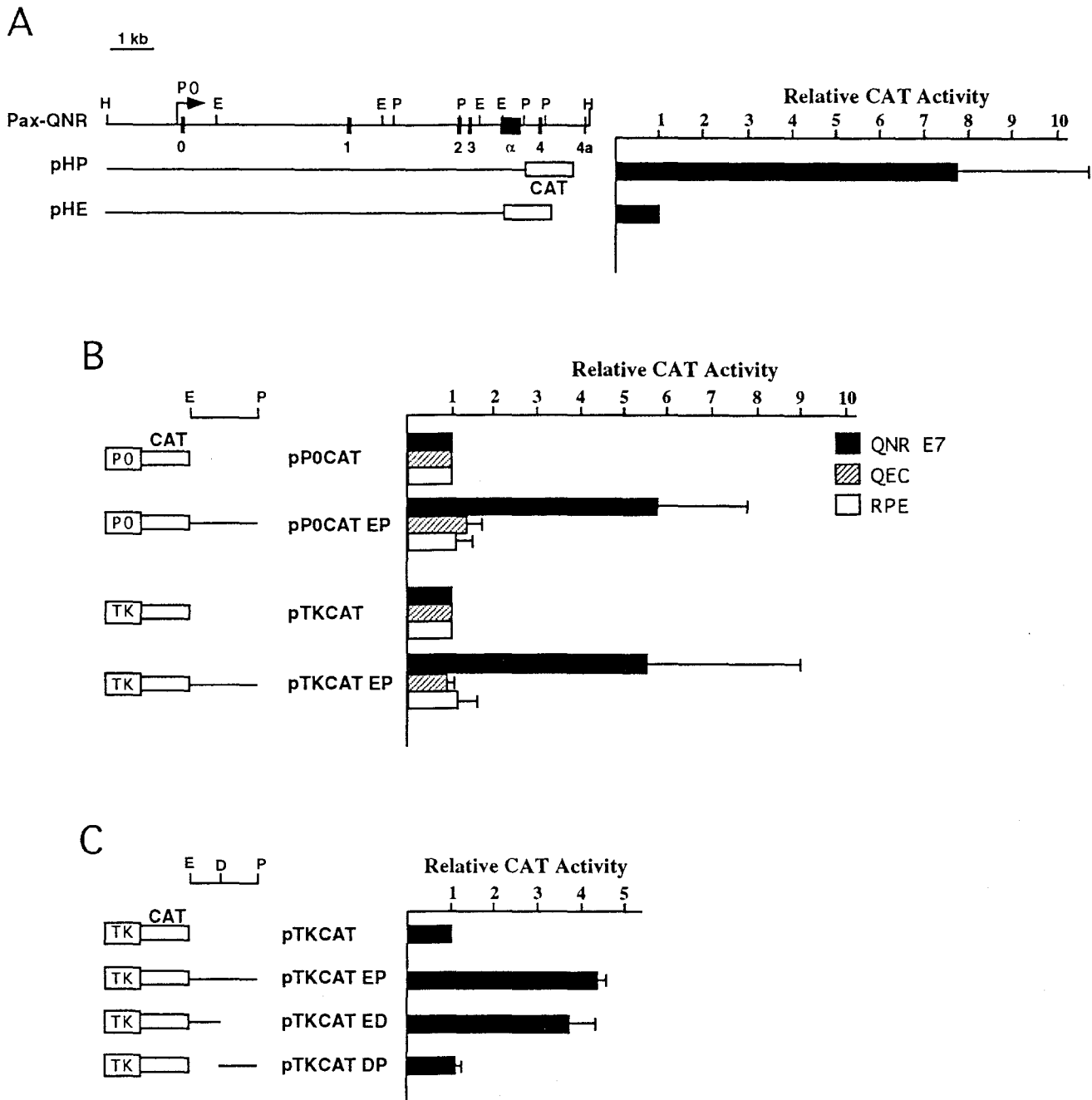


FIG. 2. Identification of a neuroretina-specific 3' enhancer element within the *Pax-QNR* gene. (A) Test of *Pax-QNR* 3' regions for the presence of *cis* regulatory regions. The top line shows a partial map of the *Pax-QNR* gene with the exons boxed. The positions of the *Hind*III (H), *Pst*I (P), and *Eco*RV (E) restriction enzyme sites used to generate the CAT constructs are marked. pHP and pHE CAT constructs contain the 9.5-kbp partial *Hind*III-*Pst*I and the 9-kbp partial *Hind*III-*Eco*RV fragments, respectively, cloned upstream of the CAT gene. These constructs were transiently transfected into E7 QNR cells, and levels of CAT activity were quantitated after exposure of the thin-layer chromatograms to a PhosphorImager screen. CAT activity is expressed relative to that of the pHE construct, chosen as a reference and arbitrarily set at 1. (B) The *Pax-QNR* 3' region contains a neuroretina-specific enhancer functional on the *Pax-QNR* P0 or TK promoter. pP0CAT EP and pTKCAT EP contain the 460-bp *Eco*RV-*Pst*I fragment inserted in the natural orientation, 3' to the CAT gene in plasmids pP0CAT and pTKCAT, respectively. These plasmids were transiently transfected into E7 QNR, QEC, and RPE, and CAT activities were measured with an Instant Imager (Packard). CAT activities of the enhancer constructs are expressed relative to those of the parental plasmids. (C) Delineation of the minimum enhancer element. The position of the *Dra*I (D) restriction enzyme site used to generate the deletion constructs is marked. pTKCAT ED and pTKCAT DP contain the 210-bp *Eco*RV-*Dra*I (5' portion of the *Eco*RV-*Pst*I sequence) and the 250-bp *Dra*I-*Pst*I (5' portion of the *Eco*RV-*Pst*I sequence) fragments, respectively, cloned in the natural orientation 3' to the CAT gene in plasmid pTKCAT. After transient transfection of these constructs into E7 QNR cells, CAT activities were quantified as for panel A. CAT activities of the constructs are expressed relative to that of the pTKCAT plasmid. The results shown in all three panels are the averages of at least two independent transfection experiments performed in duplicate with two different DNA preparations, with the standard deviations indicated by error bars.

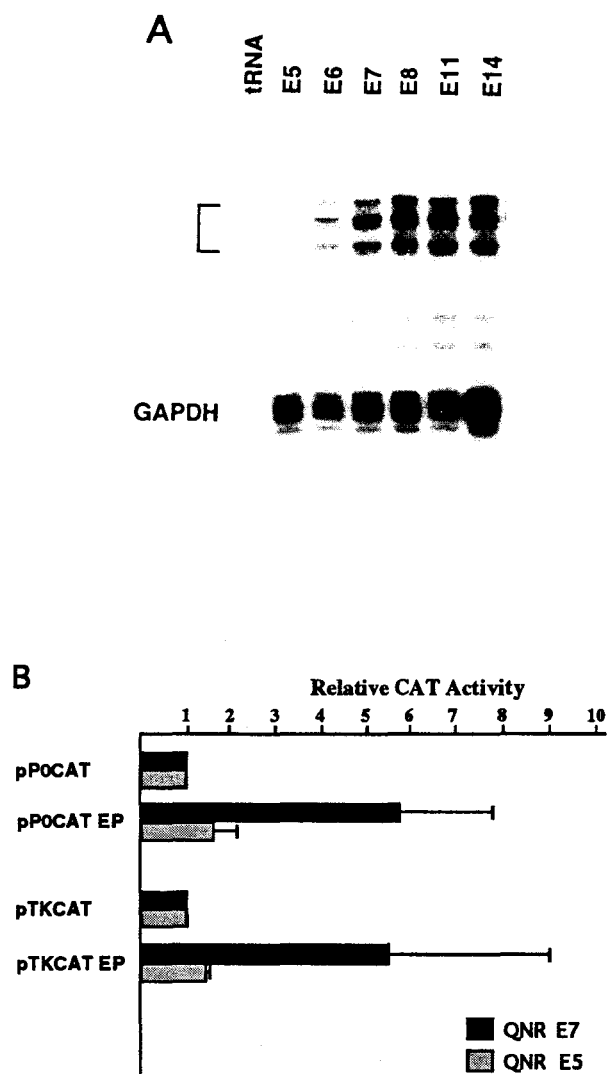


FIG. 3. Developmental analysis of the P0-initiated mRNAs and of the 3' enhancer activity. (A) RNase protection analysis. Total RNA (20 μ g) from QNR at stages E5 to E14 was hybridized with an antisense RNA probe encompassing exon 0 (described in reference 31). Following RNase digestion, the samples were analyzed on a sequencing gel. The *Pax-QNR* mRNAs initiated at the P0 promoter and protected by the probe are indicated by a bracket. The probe (top of the gel) is not shown. tRNA was included as a negative control. As a control, hybridization of the mRNAs with an antisense GAPDH RNA probe is shown (bottom panel). (B) Functional analysis of the 3' enhancer in neuroretina at different developmental stages. The CAT constructs were transiently transfected into E5 and E7 QNR, and CAT activities were measured with an Instant Imager (Packard). CAT activities of the enhancer constructs are expressed relative to those of the parental plasmids. The results shown are the averages of three independent transfection experiments performed in duplicate with two different DNA preparations, with the standard deviations indicated by error bars.

of the enhancer CAT constructs were expressed relative to the values for the parental plasmids. The results show (Fig. 3B) that, in contrast to E7 QNR in E5 QNR the enhancer element increased CAT activity by the *Pax-QNR* P0 or TK promoters very weakly above basal levels. These data indicate that the activity of the 3' enhancer in embryonic neuroretina is developmentally controlled and suggest that its increase between E5 and E7 could be responsible for the variation in the level of P0-initiated mRNAs observed between these two stages.

Footprinting studies. The neuroretina-specific 3' enhancer was located to a 210-bp *EcoRV-DraI* fragment (Fig. 2C). In

DNase I footprinting experiments, we investigated whether this sequence could be specifically recognized in vitro by *trans*-acting factors. The *EcoRV-PstI* fragment, end labeled on the noncoding strand, was incubated with either E7 QNR, QEC, or RPE nuclear extracts and subjected to moderate DNase I digestion. With E7 QNR nuclear extracts, four protected regions, named DNase I footprints (DF) DF1, DF2, DF3, and DF4, were observed in the *EcoRV-DraI* fragment (Fig. 4). The footprints were faint when 30 μ g of nuclear extracts was used (lanes 1) but were much more visible when 100 μ g of nuclear extracts was used (lanes 2). The 5' border of DF1 is not clearly visible in Fig. 4; however, this footprint was much more delineated in other experiments (data not shown). Footprint locations and sequences are shown in Fig. 5. With QEC and RPE nuclear extracts, the four footprints observed with E7 QNR nuclear extracts were not found (Fig. 4B). It is noteworthy that with QEC nuclear extracts a protected region extending 5' of and partially overlapping DF4 was observed (Fig. 4B), suggesting that a different factor binds this region. A footprinting experiment performed with a probe overlapping the *EcoRV* site failed to reveal any further protected region between DF1 and this site (data not shown). These results demonstrate the presence of four neuroretina-specific nuclear protein-binding sites in the 3' enhancer element.

Deletional analysis of the neuroretina-specific enhancer. To test directly the role of these protein-binding sequences in the neuroretina-specific enhancer activity, we constructed DF deletion mutants of the 210-bp *EcoRV-DraI* fragment by PCR amplification (summarized in Fig. 6A). The constructs were transiently transfected into E7 QNR cells and assayed for enhancer function. In this case, the enhancer activities of the constructs were expressed relative to the value for the full-size enhancer construct pTKCAT ED (set at a value of 100). Results show (Fig. 6A) that a 163-bp fragment extending through the four footprints, construct pTKCAT 1234, retained the full enhancer activity. Deletion of site DF1 (construct pTKCAT 234) or DF4 (construct pTKCAT 123) strongly reduced the enhancer activity. However, a single copy of either DF1 (construct pTKCAT 1) or DF4 (pTKCAT 4) mediated a very weak enhancer activity, if any. Additional deletion of DF2 (pTKCAT 34 and pTKCAT 1) or DF3 (pTKCAT 12 and pTKCAT 4) also decreased the enhancer activity, suggesting that these binding sites contribute to the enhancer activity. We cloned multiple copies of the individual DF sites, 3' to the CAT gene in the pTKCAT vector (summarized in Fig. 6B). After transient transfection in E7 QNR, the CAT activities of the constructs were expressed relative to the value for the pTKCAT vector. Results show (Fig. 6B) that when multiple copies of either the DF1, DF2, or DF3 site were fused with the TKCAT [pTKCAT (DF1)3, pTKCAT (DF2)4, and pTKCAT (DF3)4], a weak enhancement, if any, was observed. In contrast, whereas a single copy of the DF4 site (pTKCAT 1) had no enhancer activity, multiple copies of the DF4 site [pTKCAT (DF4)2 and pTKCAT (DF4)3] mediated enhancer activity, which increased with the number of the copies cloned. Thus, multimerization of the DF4 site mimics the enhancer activity, suggesting that, in this context, DF4 binds *trans*-acting factors able to mediate the enhancer activity. Since, in the natural enhancer element, maximal enhancing occurs when the four binding sites are present, we conclude that the DF sites cooperate to mediate full enhancer activity.

Characterization of nuclear protein binding to individual DF within the neuroretina enhancer. To further characterize individual protein-binding sites within the neuroretina-specific enhancer, EMSA was performed with double-stranded labeled oligonucleotides corresponding to DF1, DF2, DF3, and

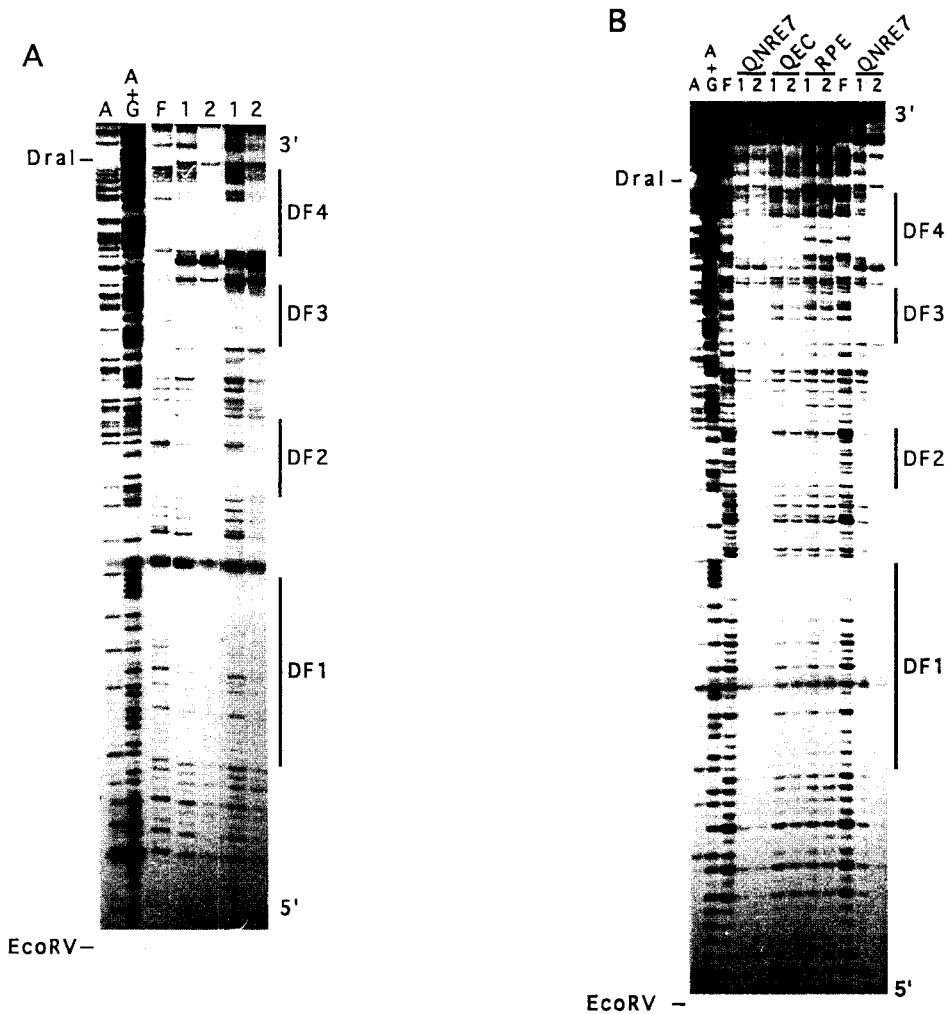


FIG. 4. Footprinting studies. (A) DNase I footprinting analysis of the *EcoRV-PstI* fragment in the absence (F) or presence of 30 μ g (lanes 1) or 100 μ g (lanes 2) of E7 QNR nuclear extracts. (B) DNase I footprinting analysis of the *EcoRV-PstI* fragment in the absence (F) or presence of 30 μ g (lanes 1) or 100 μ g (lanes 2) of nuclear extracts from E7 QNR, QEC, or RPE. For both panels, the positions of the *EcoRV* and *DraI* restriction sites, delineating the 5' and 3' borders, respectively, of the enhancer element, are indicated. The positions of the DF referred to in the text are also marked. Lanes A and A+G, sequencing reactions on the probe.

DF4 (defined in Fig. 5; also see Materials and Methods) and with nuclear extracts from E7 and E5 QNR, as well as from QEC and RPE (Fig. 7A). When the oligonucleotides were incubated with E7 QNR nuclear extracts, multiple complexes were formed (Fig. 7A, lanes 1, and Fig. 8, lanes 2), some of which were discrete (indicated by small arrows). The competition experiments presented in Fig. 8 show that these complexes were specific, since their formations were inhibited or strongly reduced by the presence of a 100-fold excess of the corresponding unlabeled oligonucleotide (for probe DF1, see Fig. 8A, lane 4; for probe DF2, see Fig. 8B, lane 6; for probe DF3, see Fig. 8C, lane 8; and for probe DF4, see Fig. 8D, lane 10), but not by the presence of a similar excess of a nonspecific competitor corresponding to the Sp1 consensus binding site (Fig. 8, lanes 12). These complexes were also detected, albeit at lower levels, with E5 QNR nuclear extracts (Fig. 7A, lanes 4). This might suggest that the factors binding to the oligonucleotides are less abundant in neuroretina at day E5 of development or that the affinity of these factors to their sequences is lower. These results might explain the differential enhancer activity observed between E5 QNR and E7 QNR (Fig. 3B). These complexes were not detected with the QEC or RPE



FIG. 5. Nucleotide sequence of the 3' enhancer element. The sequence of the 216-bp *EcoRV-DraI* fragment is given, with the four neuroretina-specific protein-binding sites (DF) boxed. Restriction sites used for subcloning are indicated. Nucleotide numbers are shown on the left.

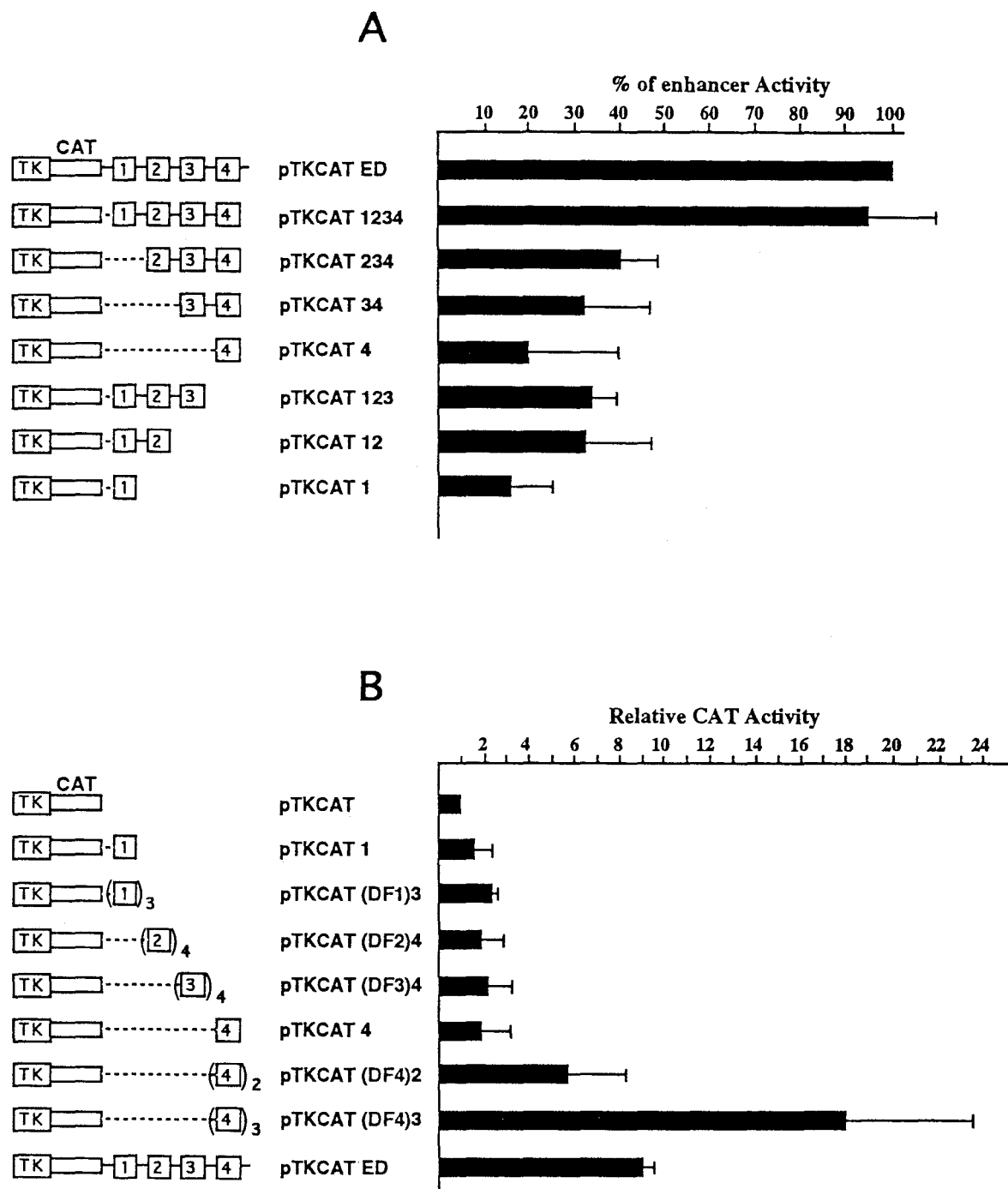


FIG. 6. Role of the four neuroretina-specific protein-binding sequences in the enhancer activity. (A) Deletional analysis of the neuroretina-specific enhancer. The DF deletion constructs, listed in the center of the panel, were transiently transfected into E7 QNR cells, and CAT activities were measured as for Fig. 2A. The CAT activities of the DF deletion constructs were expressed relative to that of the full-size enhancer construct pTKCAT ED (set at a value of 100). (B) Biological activity of each protein-binding site. Multiple copies of either DF1, DF2, DF3, or DF4 were cloned, 3' to the CAT gene, in the pTKCAT vector. The resulting constructs, listed in the center of the panel, were transiently transfected into E7 QNR cells, and CAT activities were measured as for Fig. 2A. CAT activities of the constructs are expressed relative to that of the parental plasmid pTKCAT. The results shown in both panels are the averages of at least three independent transfection experiments performed in triplicate with three different DNA preparations, with the standard deviations indicated by error bars.

nuclear extracts (except with the DF2 probe, in which faint complexes were observed with RPE nuclear extracts; see Fig. 7A). Incubation of QEC or RPE nuclear extracts with oligonucleotides containing consensus binding sites for Ap1 or upstream stimulatory factor indicated that these nuclear extracts

were fully functional (data not shown). These results are consistent with the footprinting experiments and confirm the binding of neuroretina-specific factors to the enhancer element.

To identify the nuclear proteins that interact with the neuroretina-specific enhancer, Southwestern analyses were per-

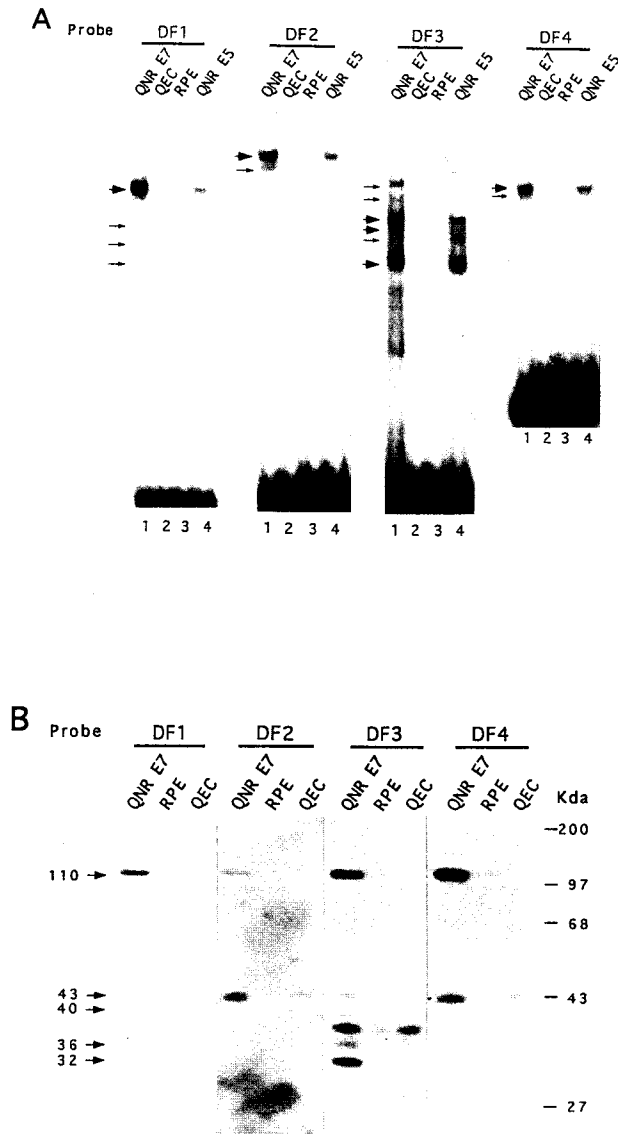


FIG. 7. Characterization of nuclear protein binding to individual DF within the neuroretina enhancer. (A) EMSA analysis of the four protein-binding sites. EMSAs were performed with the radiolabeled DF1, DF2, DF3, and DF4 oligonucleotides, and 1 μ g of nuclear extracts from E7 QNR (lanes 1), QEC (lanes 2), RPE (lanes 3), or E5 QNR (lanes 4). The arrows indicate bands of altered mobility representing specific protein-DNA complexes. Big arrows, major complexes; small arrows, minor complexes. (B) Identification of nuclear proteins interacting with the four DF by Southwestern analysis. Nuclear extracts (100 μ g) from E7 QNR, QEC, or RPE were subjected to SDS-PAGE. After protein transfer, the labeled DF1, DF2, DF3, and DF4 oligonucleotides were incubated with the renatured nuclear proteins. The potential proteins interacting with the probes are indicated by arrows.

formed. E7 QNR, QEC, or RPE nuclear proteins were fractionated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), immobilized onto nylon membrane, and probed with equal radiospecific activity probes of DF1, DF2, DF3, and DF4. Results show (Fig. 7B) that the four probes bound multiple neuroretina nuclear proteins, albeit with different affinities (if we compare the differences in the intensities of the multiple proteins detected with one probe considered). These results are consistent with the EMSA data showing multiple complexes formed when these probes were incubated with QNR nuclear extracts (Fig. 7A). Two proteins, of 110 and 43 kDa,

were bound by all four nucleotides, whereas DF1 and DF3 bound additional proteins of equal molecular masses. These proteins were essentially detected in neuroretina and very faintly in RPE (see Discussion for explanation) and could correspond to the proteins bound to the enhancer element. These results suggest that the four nuclear protein-binding sites detected in the neuroretina-specific enhancer bind a set of proteins, some of which are identical.

To investigate whether identical proteins are present in the complexes detected by EMSAs with probe DF1, DF2, DF3, or DF4 and E7 QNR nuclear extracts (Fig. 7A), we performed competition studies. Competition results are presented in Fig. 8. The major complex formed with the DF1 probe (Fig. 8A, lane 2) was unexpectedly increased by a 100-fold molar excess of either DF2 (lane 6) or DF3 (lane 8), whereas it was partially inhibited by a similar excess of DF4 (lane 10); however, the minor complexes formed with this probe were inhibited by an excess of either DF2, DF3, or DF4. The two complexes formed with the DF2 probe (Fig. 8B, lane 2) were inhibited totally by a 100-fold molar excess of DF4 (lane 10) but only partially by a similar excess of either DF1 (lane 4) or DF3 (lane 8). Likewise, the complexes obtained with the DF3 probe (Fig. 8C, lane 2) were partially inhibited by a 100-fold molar excess of either DF1 (lane 4), DF2 (lane 6), or DF4 (lane 10). Finally, only the minor complex formed with the DF4 probe (Fig. 8D, lane 2) was inhibited by a 100-fold molar excess of either DF1 (lane 4), DF2 (lane 6), or DF3 (lane 8). The specificity of these competition experiments was demonstrated by the fact that the Sp1 oligonucleotide failed to compete with DF1, DF2, DF3, or DF4 for binding (Fig. 8, lanes 11 and 12). The competition results demonstrate that the four DF oligonucleotides are able to modulate the binding among them. These data are consistent with the Southwestern blot results and indicate that some protein-DNA complexes visualized by EMSAs involved a set of identical neuroretina factors. However, these common factors are expected to bind to the four DF with different affinities, as suggested by the partial or total competition obtained.

Our gel retardation assays revealed a complex pattern of protein-DNA interactions involving different as well as common factors, prompting us to compare the sequences of the four neuroretina protein-binding sites. Results show (Fig. 9) that these AT-rich oligonucleotides exhibited some stretches of homologies, but these do not correspond to already described protein-binding sites. However, as pointed out by a referee, octamer-like and CREB-like proteins (binding sites ATGCAAT and TGACGTA/CA/G, respectively) may be involved.

Nucleotide sequence and enhancer activity of the 3'-flanking homologous region of the mouse *Pax-6* gene. To help determine whether the 3' quail enhancer is phylogenetically conserved, we isolated a mouse *Pax-6* clone from a genomic library using the quail *EcoRV-PstI* fragment as a probe. The sequence of the mouse homologous region was determined and compared with the sequence of the quail *Pax-6* enhancer determined above (Fig. 5). The two noncoding regions exhibited very high nucleotide sequence identity (89.8%) (Fig. 10A), with the four protein-binding sites identified previously on the quail *Pax-6* enhancer being extremely well conserved: DF3 and DF4 exhibited 100% nucleotide identity, whereas DF1 and DF2 exhibited 88.5 and 92.3% nucleotide identities, respectively. It is striking that of the 22-bp differences between the quail and the mouse sequences, most of them (16) are outside the four binding sites described in the quail *Pax-6* enhancer, suggesting a functional role for these motifs. These results suggest that there could be an active enhancer within the mouse *Pax-6* gene.

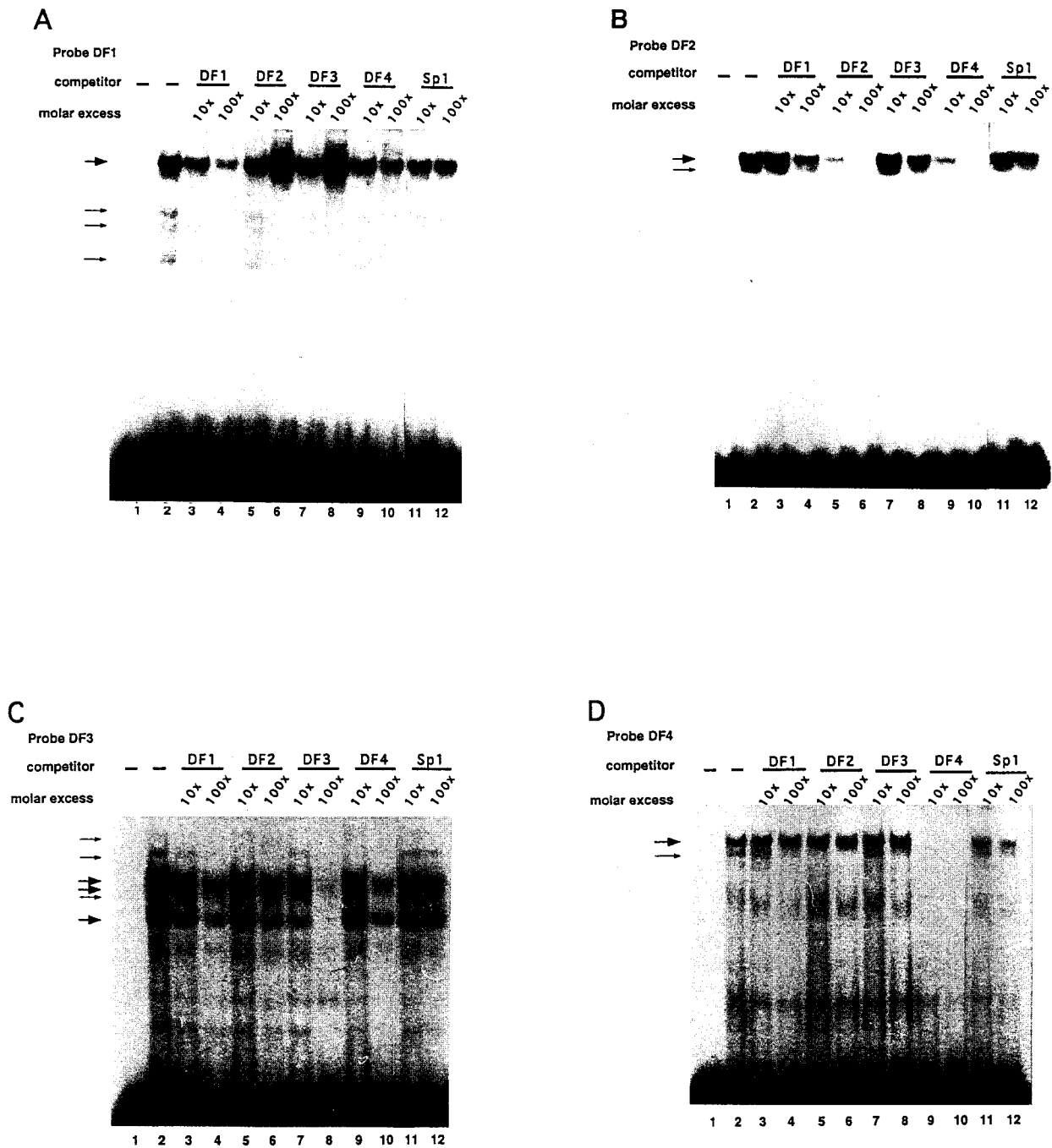


FIG. 8. EMSA analysis of the four neuroretina protein-binding sites. Labeled oligonucleotides DF1 (A), DF2 (B), DF3 (C), and DF4 (D) were incubated either alone (lanes 1) or with 1 μ g of E7 QNR nuclear extracts (lanes 2 to 12) in the absence (lanes 2) or in the presence (lanes 3 to 12) of the indicated (fold) molar excess of various unlabeled competitors: DF1 (lanes 3 and 4), DF2 (lanes 5 and 6), DF3 (lanes 7 and 8), DF4 (lanes 9 and 10), and Sp1 (lanes 11 and 12).

To test this hypothesis, a 1-kbp *Pst*I mouse fragment containing the putative enhancer was inserted 3' to the CAT gene in the pTKCAT vector, yielding pTKCAT P. This construct was transiently transfected into E7 QNR and tested for enhancer activity. As a positive control, we used the quail homologous pTKCAT ED construct. Results show (Fig. 10B) that the 1-kbp *Pst*I mouse fragment (construct pTKCAT P) exhibited an enhancer activity, albeit 2-fold lower than that produced by the quail *Pax-6* enhancer (construct pTKCAT ED).

The ability of the mouse fragment to enhance CAT activity from the TK promoter in QNR demonstrates that this region contains a functional enhancer element.

DISCUSSION

In this study, we have demonstrated, by nuclear run-on experiments, that neuroretina-specific expression of *Pax-QNR* P0-initiated mRNAs is, in part, the result of transcriptional

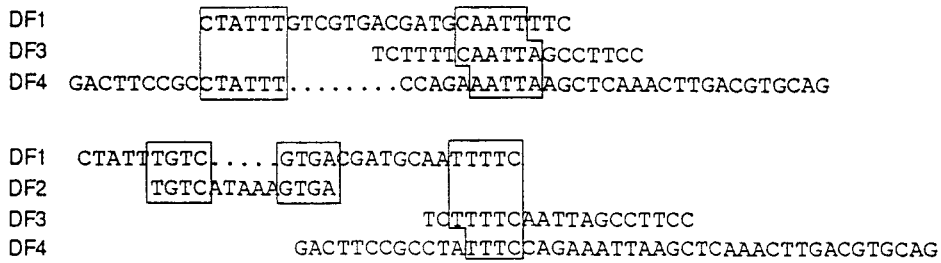


FIG. 9. Nucleotide sequence comparison of the four protein-binding sites DF1, DF2, DF3, and DF4. The stretches of homologies are boxed. Gaps, indicated by dots, were created to maximize the alignment of conserved sequences.

control, and we have identified a neuroretina-specific 3' enhancer within the *Pax-QNR* gene, 7.5 kbp downstream from the P0 promoter. This neuroretina-specific enhancer exerts an enhancer activity on the homologous P0 *Pax-QNR* or heterologous TK promoters in a position- and orientation-independent manner. Moreover, the activity of the 3' enhancer in embryonic neuroretina is developmentally controlled and parallels the level of expression of P0-initiated mRNAs. Thus, the increase in the level of P0-initiated mRNAs during the embryonic neuroretina development could be attributed, in part, to the activity of this enhancer.

We have found, both in a DNase I footprinting assay and in an EMSA, that the enhancer element contains four neuroretina-specific nuclear protein-binding sites, and we also demonstrated a functional role for these binding sites in a reporter-based expression assay. The protein-DNA complexes visualized in EMSA are detected at lower levels with E5 QNR nuclear extracts, and this is correlated with a lower enhancer activity at this stage. This might suggest that the factors binding to the enhancer are less abundant in neuroretina at day E5 of development or that the affinity of these factors to their sequences is lower as a result of posttranslational modification, for example. On the basis of dissection of the enhancer region, we propose that the enhancer activity is mediated by a synergy between the four protein-binding sites. Thus, the factors bound to these sites must cooperate with each other in order to activate the neuroretina enhancer. The picture of a tissue-specific enhancer made of several interacting enhancers agrees with the modular nature of the enhancers described so far and reveals similarities with the control elements regulating the tissue-specific expression of other genes (20, 22, 28). Southwestern analysis and EMSA competition experiments demonstrate that the four sites bind a set of unknown identical proteins. Although these proteins are detected essentially in the neuroretina, they are also faintly detected in RPE. One explanation could be the fact that the retinal pigment epithelium possesses the capacity to transdifferentiate into neuroretina in vivo (10) and to generate cells with neuronal traits in certain culture conditions (29, 32; for a review, see reference 15).

However, several questions remain unanswered. Why do the multimerized DF1, DF2, and DF3 sites have weak or no enhancer activity, although they bind factors some of which are identical to those bound by the active multimerized DF4 site? We might suggest different hypotheses. Since EMSAs reveal different protein-DNA complexes between the four DF, perhaps additional proteins (not detectable by Southwestern blotting) are present in the complexes observed with the DF4 fragment and are important to in vivo enhancer activity. That additional proteins are present in the DF4 complexes is strongly suggested by the fact that in EMSA competition experiments only the minor complex is inhibited by unlabeled

DF1, DF2, or DF3 fragments. Alternatively, the geometric spacing of the *cis* elements is important for the enhancer activity and this is not respected in the multimerized DF1, DF2, or DF3 fragments. Characterization of the factors involved should provide an answer to these questions. The nucleotide sequences of the four binding sites suggest the possibility that the DNA-binding proteins involved recognize AT-rich boxes and therefore belong to the homeodomain-containing transcription factors (for a review, see reference 14). Such proteins

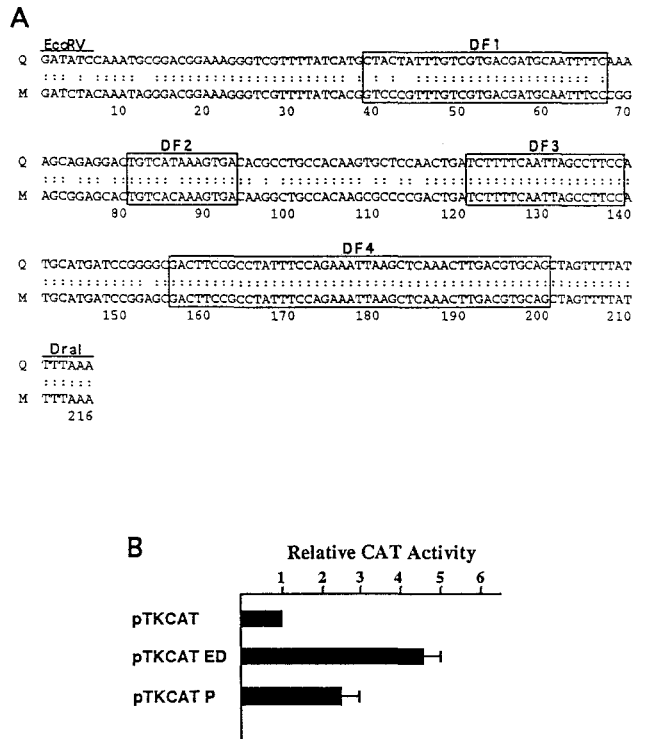


FIG. 10. Nucleotide sequence and enhancer activities of the 3' flanking homologous region of the mouse *Pax-6* gene. (A) Nucleotide sequence homology between the quail *Pax-6* enhancer (Q) and the homologous region in the mouse *Pax-6* gene (M). Double dots indicate identity of bases at the positions shown. The four protein-binding sequences observed previously on the quail *Pax-6* enhancer are boxed. (B) Enhancer activities of the 3' flanking homologous region of the mouse *Pax-6* gene. The pTKCAT P and pTKCAT ED constructs were transiently transfected into E7 QNR, and CAT activities were measured as for Fig. 2A. CAT activities of the constructs are expressed relative to that of the parental plasmid pTKCAT. The results shown are the averages of three independent transfection experiments performed in duplicate with two different DNA preparations, with the standard deviations indicated by error bars.

are effectively expressed in the eye (3, 26) and might be involved in *Pax-6* gene regulation.

Nucleotide sequence identity between the quail enhancer and the homologous murine region is approximately 90%, and the four protein-binding sites are also found in the murine sequence. Like the quail sequence, the murine homologous region also exhibits an enhancer activity when tested in transient transfection assays into neuroretina cells. However the mouse enhancer activity is 2-fold lower than that of the quail, despite the great degree of identity of the four protein-binding sites. One explanation could be point mutations in important sequences: the DF1 and DF2 sites differ by 5 and 1 bp from their quail homologs, respectively. Alternatively, there could be an inhibitory sequence, outside the enhancer region, within the 1-kbp mouse genomic fragment cloned in pTKCAT.

Taken together, our results indicate that the neuroretina enhancer described in this study is conserved in mammalian species and is a complex transcriptional regulatory element that potentially contributes to the neuroretina specificity of *Pax-6* gene expression. In this respect, it is interesting to note that the enhancer has no activity in pancreatic cell line β TC-3, which also expresses the *Pax-6* gene (42), and that Southwestern experiments performed with nuclear extracts from these cells fail to detect the proteins found in E7 QNR nuclear extracts (30).

We recently identified within the *Pax-QNR* gene a second promoter, termed P1, located 3 kbp downstream from the P0 promoter (32). However, the 3' neuroretina-specific enhancer described in this study has no activity on this promoter. Since the TATA box sequences of the two responsive promoters (P0 and TK) are identical (ATATTAAGG) and differ from those of the P1 promoter (ATAAAGCAATAT), it was tempting to test whether the specificity of the enhancer for the P0 promoter and its failure to interact with the P1 promoter were attributable to the divergent TATA box sequences of the two promoters, as has been described for the myoglobin gene (45). However, when the P0 TATA box sequence was changed to that of the P1 promoter, the responsiveness of the enhancer was not abolished (data not shown). Thus, the differential in enhancer activities between P0 and P1 promoters may reside in other *cis*-acting promoter sequences. Alternatively, since recent studies suggest that some enhancer factors are dependent upon auxiliary factors (coactivators) for activation functions (for a review, see reference 39), it remains possible that the enhancer is unable to activate the P1 promoter because this promoter lacks its full complement of required factors to interact with the active enhancer. Another explanation is the presence of an inhibiting factor that prevents the P1 promoter from interacting with the proteins of the active enhancer. These hypotheses about enhancer mechanisms could also be invoked in the differential in enhancer activities observed in the neuroretina between E5 and E7. In E5 neuroretina, the enhancer could be inactivated by a repressor or the enhancer activity needs the presence of an activator, absent at this stage. Cloning the gene(s) encoding the enhancer element-binding factor(s) and analyzing the molecular interactions between the enhancer element-binding factor(s) and other transcription factors will allow us to further define precise molecular mechanisms involved in the regulation of the *Pax-6* gene.

Preliminary results suggest that there may be another important *cis*-acting element(s) within the promoter-distal region that also contribute to the neuroretina-specific expression of the *Pax-QNR* gene. Defining additional regulatory elements that control the tissue-specific developmental expression of the *Pax-6* gene may be essential for *in vivo* studies of the role of this gene in normal eye development and for determining the

mechanisms of pathogenesis associated with *Pax-6*. Indeed, it remains possible that mutations in the *Pax-6* regulatory elements cause developmental defects associated with this gene, as has been suggested for some aniridia cases showing no mutations in the *Pax-6* coding region (18, 40). Although point mutations in the regulatory sequences associated with pathogenesis are rare, this has been demonstrated for the β -globin cluster (4).

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique, the Institut Pasteur de Lille, the Association de Recherche contre le Cancer, and the Association Française Retinitis Pigmentosa.

REFERENCES

- Adams, B., P. Dörfler, A. Aguzzi, Z. Kozmik, P. Urbanek, I. Maurer-Fogy, and M. Busslinger. 1992. *Pax-5* encodes the transcription factor BSAP and is expressed in B lymphocytes, the developing CNS and adult testis. *Genes Dev.* 6:1589-1607.
- Babiss, L. E., and J. M. Friedman. 1990. Regulation of *N-myc* gene expression: use of an adenovirus vector to demonstrate posttranscriptional control. *Mol. Cell. Biol.* 10:6700-6708.
- Beebe, D. 1994. Homeobox genes and vertebrate eye development. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* 35:2897-2900.
- Berry, M., F. Grosfeld, and N. Dillon. 1992. A single point mutation is the cause of the Greek form of hereditary persistence of fetal haemoglobin. *Nature (London)* 358:499-502.
- Boshart, M., M. Klüppel, A. Schmidt, G. Schütz, and B. Luckow. 1992. Reporter constructs with low background activity utilizing the *cat* gene. *Gene* 110:129-130.
- Carriere, C., S. Plaza, P. Martin, B. Quatannens, M. Bailly, D. Stehelin, and S. Saule. 1993. Characterization of quail Pax-6 (*Pax-QNR*) proteins expressed in the neuroretina. *Mol. Cell. Biol.* 13:7257-7266.
- Chalepakis, G., R. Fritsch, H. Fickenscher, U. Deutsch, M. Goulding, and P. Gruss. 1991. The molecular basis of the *undulated/Pax-1* mutation. *Cell* 66:873-884.
- Chalepakis, G., A. Stoykova, J. Wijnholds, P. Tremblay, and P. Gruss. 1993. Pax: gene regulators in the developing nervous system. *J. Neurobiol.* 24:1367-1384.
- Chomczynski, P., and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.
- Coulombre, J. L., and A. Coulombre. 1965. Regeneration of neural retina from the pigmented epithelium in the chick embryo. *Dev. Biol.* 12:79-92.
- Crepeux, P., D. Leprince, A. Flourens, O. Albagli, E. Ferreira, and D. Stehelin. 1993. The two functionally distinct amino termini of chicken *c-ets-1* products arise from alternative promoter usage. *Gene Expression* 3:215-225.
- Dozier, C., S. Ansieau, E. Ferreira, J. Coll, and D. Stehelin. 1991. An alternatively spliced *c-mil/raf* mRNA is predominantly expressed in chicken muscular tissues and conserved among vertebrate species. *Oncogene* 6:1307-1311.
- Dozier, C., C. Carriere, D. Grevin, P. Martin, B. Quatannens, D. Stehelin, and S. Saule. 1993. Structure and DNA-binding properties of *Pax-QNR*, a paired box- and homeobox-containing gene. *Cell Growth Differ.* 4:281-289.
- Duboule, D. 1994. Guidebook to the homeobox genes. Oxford University Press, Oxford.
- Eguchi, G., and R. Kodama. 1993. Transdifferentiation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5:1023-1028.
- Fickenscher, H. R., G. Chalepakis, and P. Gruss. 1993. Murine Pax-2 protein is a sequence-specific trans-activator with expression in the genital system. *DNA Cell Biol.* 12:381-391.
- Glaser, T., L. Jepeal, J. G. Edwards, R. Young, J. Favor, and R. Maas. 1994. PAX6 gene dosage effect in a family with congenital cataracts, aniridia, anophthalmia and central nervous system defects. *Nature Genet.* 7:463-471.
- Glaser, T., D. S. Walton, and R. L. Maas. 1992. Genomic structure, evolutionary conservation and aniridia mutations in the human *Pax-6* gene. *Nature Genet.* 2:232-239.
- Gorman, C. M., L. F. Moffat, and B. H. Howard. 1982. Recombinant genes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 2:1044-1051.
- Hambor, J. E., J. Mennone, M. E. Coon, J. H. Hanke, and P. Kavathas. 1993. Identification and characterization of an *Alu*-containing, T-cell-specific enhancer located in the last intron of the human CD8 α gene. *Mol. Cell. Biol.* 13:7056-7070.
- Hill, R. E., J. Favor, B. Hogan, C. C. Ton, G. Saunders, I. Hanson, J. Prosser, T. Jordan, N. Hastie, and V. V. Heyning. 1991. Mouse *small eye* results from mutations in a paired-like homeobox-containing gene. *Nature (London)* 354:522-525.

22. Jacquemin, P., C. Oury, B. Peers, A. Morin, A. Belayew, and J. A. Martial. 1994. Characterization of a single strong tissue-specific enhancer downstream from the three human genes encoding placental lactogen. *Mol. Cell. Biol.* 14:93-103.
23. Lavery, D. J., and U. Schibler. 1993. Circadian transcription of the cholesterol 7 α hydroxylase gene may involve the liver-enriched bZIP protein DBP. *Genes Dev.* 7:1871-1884.
24. Leprince, D., P. Crepieux, and D. Stehelin. 1992. *c-ets-1* DNA binding to the PEA3 motif is differentially inhibited by all the mutations found in *v-ets*. *Oncogene* 7:9-17.
25. Li, H.-S., J.-M. Yang, R. Jacobson, D. Pasko, and O. Sundin. 1994. Pax-6 is first expressed in a region of ectoderm anterior to the early neural plate: implications for stepwise determination of the lens. *Dev. Biol.* 162:181-194.
26. Liu, I. S., J.-D. Chen, L. Ploder, D. Vidgen, D. Van der Kooy, V. I. Kalnins, and R. R. McInnes. 1994. Developmental expression of a novel murine homeobox gene (*Chx10*): evidence for roles in determination of the neuroretina and inner nuclear layer. *Neuron* 13:377-393.
27. Martin, P., C. Carriere, C. Dozier, B. Quatannens, M. Mirabel, B. Vandebunder, D. Stehelin, and S. Saule. 1992. Characterization of a paired box- and homeobox-containing quail gene (*pax-QNR*) expressed in the neuroretina. *Oncogene* 7:1721-1728.
28. O'Prey, J., S. Ramsay, I. Chambers, and P. R. Harrison. 1993. Transcriptional up-regulation of the mouse cytosolic glutathione peroxidase gene in erythroid cells is due to a tissue-specific 3' enhancer containing functionally important CACC/GT motifs and binding sites for GATA and Ets transcription factors. *Mol. Cell. Biol.* 13:6290-6303.
29. Pittack, C., M. Jones, and T. Reh. 1991. Basic fibroblast growth factor induces retinal pigment epithelium to generate neural retina in vitro. *Development* 113:577-588.
30. Plaza, S. Unpublished data.
31. Plaza, S., C. Dozier, and S. Saule. 1993. Quail PAX-6 (PAX-QNR) encodes a transcription factor able to bind and *trans*-activate its own promoter. *Cell Growth Differ.* 4:1041-1050.
32. Plaza, S., C. Dozier, N. Turque, and S. Saule. Submitted for publication.
33. Quiring, R., U. Walldorf, U. Kloter, and W. Gehring. 1994. Homology of the eyeless gene of *Drosophila* to the small eye gene in mice and aniridia in humans. *Science* 265:785-789.
34. Schibler, U., O. Hagenbüchle, P. K. Wellauer, and A. C. Pittet. 1983. Two promoters of different strengths control the transcription of the mouse alpha-amylase gene Amy-1a in the parotid gland and the liver. *Cell* 33:501-508.
35. Spegelaere, P., B. van Hille, N. Spruyt, S. Faisst, J. J. Cornelis, and J. Rommelaere. 1991. Initiation of transcription from the minute virus of mice P4 promoter is stimulated in rat cells expressing a *c-Ha-ras* oncogene. *J. Virol.* 65:4919-4928.
36. Stapleton, P., A. Weith, P. Urbaneck, Z. Kozmik, and M. Busslinger. 1993. Chromosomal localization of seven PAX genes and cloning of a novel family member, PAX-9. *Nature Genet.* 3:292-298.
37. Stein, B., H. J. Rahmsdorf, A. Steffen, M. Litfin, and P. Herrlich. 1989. UV-induced DNA damage is an intermediate step in UV-induced expression of human immunodeficiency virus type 1, collagenase, *c-fos*, and metallothionein. *Mol. Cell. Biol.* 9:5169-5181.
38. Strachan, T., and A. P. Read. 1994. PAX genes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4:427-438.
39. Tijan, R., and T. Maniatis. 1994. Transcriptional activation: a complex puzzle with few easy pieces. *Cell* 77:5-8.
40. Ton, C. C., H. Hirvonen, H. Miwa, M. Weil, P. Monaghan, T. Jordan, V. Van Heyningen, N. Hastie, H. Meijers-Heijboer, M. Drechsler, B. Royer-Pokora, F. Collins, A. Swaroop, L. C. Strong, and G. F. Saunders. 1991. Positional cloning and characterization of a paired box- and homeobox-containing gene from the aniridia region. *Cell* 67:1059-1074.
41. Tremblay, P., and P. Gruss. 1994. Pax: genes for mice and men. *Pharmacol. Ther.* 61:205-226.
42. Turque, N., S. Plaza, F. Radvanyi, C. Carrière, and S. Saule. 1994. Pax-QNR/Pax-6, a paired box- and homeobox-containing gene expressed in neurons, is also expressed in pancreatic endocrine cells. *Mol. Endocrinol.* 8:929-938.
43. Walther, C., and P. Gruss. 1991. Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development* 113:1435-1449.
44. Walther, C., J.-L. Guenet, D. Simon, U. Deutch, B. Jostes, M. D. Goulding, D. Plachov, R. Balling, and P. Gruss. 1991. Pax: a murine gene family of paired box containing genes. *Genomics* 11:424-434.
45. Wefald, F. C., B. H. Devlin, and S. R. Williams. 1990. Functional heterogeneity of mammalian TATA-box sequences revealed by interaction with a cell-specific enhancer. *Nature (London)* 344:260-262.
46. Zannini, M., H. Francis-Lang, D. Plachov, and R. Di Lauro. 1992. Pax-8, a paired domain-containing protein, binds to a sequence overlapping the recognition site of a homeodomain and activates transcription from two thyroid-specific promoters. *Mol. Cell. Biol.* 12:4230-4241.

ARTICLE IV

"The quail *Pax6* (*Pax-QNR*) mRNAs are expressed from two promoters used differentially during retina development and neuronal differentiation."

Serge Plaza, Christine Dozier, Nathalie Turque et Simon Saule

Molecular and Cellular Biology (sous presse)

Les ARNm du gène *Pax-QNR* sont initiés à partir de deux promoteurs et sont différemment exprimés au cours du développement de la neurorétine et de la différenciation neuronale

1/ Caractérisation du promoteur P1

L'isolement d'un ADNc correspondant à un ARNm divergeant dans sa séquence 5' non codante (nommé A1, Figure 1A) suggérait l'existence d'un second promoteur. Nous avons donc entrepris d'isoler et de caractériser la région promotrice permettant l'initiation de l'ARNm A1.

Nous avons localisé le site d'initiation de cet ARNm quelques nucléotides en amont de l'ADNc cloné (Figure 1B) à l'aide d'expériences de protection à la RNase et d'extension d'amorce réalisées au niveau de l'exon 1 (Figure 2). Le séquençage de la région génomique située en amont de ce site d'initiation a permis d'identifier une boîte TATA potentielle ainsi qu'une boîte CAAT situées respectivement 23 et 66 paires de base en amont du site d'initiation (Figure 1B). L'insertion du fragment génomique 1 Kbp NotI dans les deux orientations en amont du gène CAT et la transfection des constructions résultantes dans des QNR a permis de montrer l'existence d'une région de promotion située en amont de l'exon 1 (Figure 3A). Ce promoteur interne, que nous avons appelé P1, est situé 3 Kbp en aval du promoteur P0.

Comme le promoteur P0, le promoteur P1 fonctionne également dans les QEC, bien que son activité soit trois à quatre fois plus faible dans ces cellules (Figure 3B), ce qui suggère que les séquences promotrices clonées ne possèdent pas d'éléments responsables de l'expression tissulaire spécifique du gène *Pax-QNR*. Nous avons alors testé si le promoteur P1 était soumis aux mêmes régulateurs que le promoteur P0, et nous avons pu montrer qu'une boucle d'autorégulation a lieu sur ce promoteur comme sur le promoteur P0 (Figure 4). Ce deuxième promoteur est aussi sensible à l'action de la protéine c-Myb suivant les mêmes mécanismes que le promoteur P0 (résultats non publiés).

2/ Expression des ARNm initiés aux promoteurs P0 ou P1

En vue d'aborder les mécanismes gouvernant l'expression du gène, nous avons réalisé des expériences d'hybridation *in situ*, afin de déterminer si l'expression des ARNm initiés à chacun des promoteurs était spécifique d'un type cellulaire donné ou d'une étape de différenciation particulière. Les résultats révèlent qu'à l'exception du pancréas pour lequel aucune expression des ARNm initiés au promoteur P0 n'a pu être décelée, les ARNm initiés à chacun des promoteurs sont co-exprimés dans le tube neural, la neurorétine et la cornée (Figure 5). Notamment, en ce qui concerne la neurorétine les ARNm initiés à chacun des promoteurs sont exprimés dans les mêmes couches cellulaires (nucléaire interne et ganglionnaire) aux stades de développement embryonnaire E9 et E20 (Figure 5 panneaux C à F). Cependant l'analyse de l'expression de ces ARNm au cours du développement embryonnaire de la neurorétine, effectuée par la technique de protection à la RNase, révèle une expression différentielle : les ARNm initiés au promoteur P0 sont détecté à partir de E6, leur expression augmente jusqu'à E8 puis reste constante jusqu'à éclosion (Figure 6), alors que les ARNm initiés au promoteur P1 sont détectés tout au long du développement de la neurorétine jusqu'à l'éclosion avec un pic d'expression à E6 (Figure 6). Ces résultats suggèrent que des facteurs différents régulent chacun des promoteurs. Comme l'activateur α est un élément de régulation spécifique de la neurorétine et régule le promoteur P0 au cours du développement (article 3), nous avons testé son activité sur le promoteur P1 dans des expériences de transfections transitoires réalisées dans les QNR E7 (exprimant les ARNm initiés à chacun des promoteurs). Il s'avère que, contrairement au promoteur P0, l'activateur α n'est pas actif sur le promoteur P1 (Figure 10). L'activateur α est donc un premier élément de régulation différenciant les promoteurs P0 et P1.

Ces résultats suggèrent que les deux promoteurs P0 et P1 participent différemment à l'expression du gène *Pax-QNR* et obéissent à des inducteurs distincts.

3/ L'apparition des ARNm initiés au promoteur P0 est corrélée avec l'apparition du phénotype neuronal

La rétine à E5 est un tissu indifférencié en cours de prolifération. A E8, stade de développement où l'expression des ARNm initiés au promoteur P0 est maximale, la rétine devient post-mitotique et les neurones se différencient. L'induction de l'expression des ARNm initiés au promoteur P0 peut donc être liée à un arrêt de prolifération cellulaire et/ou à l'induction de la différenciation neuronale.

Le rétrovirus RSV tsNY68, contenant l'oncogène *v-src* thermosensible pour la prolifération permet d'induire (à température permissive) ou de stopper (à température non permissive) la croissance des QNR (Calothy *et al.* 1980). En utilisant des QNR infectées par ce virus, nous avons ainsi pu montrer que l'expression des ARNm initiés au promoteur P0 n'est pas modulée suite à un arrêt de prolifération cellulaire (Figure 7C), ce qui suggère que la différenciation neuronale est responsable de l'induction de l'expression de ces ARNm.

Le meilleur argument que nous ayons obtenu en faveur de l'expression du promoteur P0 dans les neurones vient de l'étude de l'expression des ARNm initiés à chacun des promoteurs suite à la *trans*-différenciation neuronale de la rétine pigmentaire. La rétine pigmentaire normale en culture n'exprime que les ARNm initiés au promoteur P1 (Figure 9). Les cellules de rétine pigmentaire infectée par le rétrovirus MC29, contenant l'oncogène *v-myc*, se transforment (Figure 8B) et des neurones apparaissent dans la culture (Figure 8C et D), qui exprime alors les ARNm initiés à la fois aux promoteurs P0 et P1 (RPE MC29 Neurons, Figure 9B). Cependant, si la culture est maintenue en monocouche épithéliale, les cellules n'expriment que les ARNm initiés au promoteur P1 (comme de la rétine pigmentaire normale) (RPE MC29, Figure 9B). Ainsi l'apparition du phénotype neuronal s'accompagne de l'apparition des ARNm initiés au promoteur P0.

Ces résultats, rapprochés de l'expression tardive de l'ARNm P0 dans la neurorétine, suggèrent donc un lien entre la mise en route du promoteur P0 et la différenciation des neurones. Le fait que P0 soit induit dans les neurones suggère que ces cellules vont posséder, après leur différenciation, plus de protéines Pax-QNR que les cellules non-neuronales et donc que des

gènes cibles des protéines Pax-QNR dans ces cellules devraient être sensibles à un effet de dose de ce facteur.

The quail *Pax-6(Pax-QNR)* mRNAs are expressed from two promoters used differentially during retina development and neuronal differentiation

Serge Plaza, Christine Dozier, Nathalie Turque and Simon Saule*

Laboratoire de Différenciation Cellulaire et Moléculaire, CNRS EP56
Institut Pasteur - 1 Rue Calmette 59019 LILLE Cedex France.

RUNNING TITLE : Alternative promoters usage for *Pax-6(Pax-QNR)* expression in the retina.

Key Words : *Pax-6* promoters, neuroretina development, quail.

* Corresponding author, Tel : (33) 20 87 77 86, Fax : (33) 20 87 79 08

Summary

During investigations on the regulation of the *Pax-6* gene, we characterized a cDNA from the quail neuroretina showing a 5' untranslated region distinct from that previously described and initiated from an internal promoter. Using RNase protection and primer extension mapping, we localized this second quail *Pax-6* promoter, termed P1. As reported for the already described P0 promoter, P1 was also *trans*-activated *in vitro* by the p46^{Pax-QNR} protein. RNase protection assays performed with quail neuroretina RNA showed that P1-initiated mRNAs were detected before the P0-initiated mRNAs, remained constant up to E8 and decreased slowly thereafter whereas, P0-initiated mRNAs accumulated up to E8. In contrast, quail retinal pigmented epithelium expressed only the P1-initiated mRNAs. Transformation of these cells by the *v-myc* oncogene induced neuronal traits in the culture which thereafter, in addition to the P1-initiated mRNAs, expressed *PaxQNR* from the P0 promoter. These results suggest that expression of the quail *Pax-6* gene is under the control of different regulators through alternate promoters, P0 being activated at the onset of neuronal differentiation.

INTRODUCTION

Transcriptional regulation by the homeobox proteins is thought to coordinate the precise spatial and temporal sequence of growth and differentiation see, (13). Through homology to the paired-box, nine paired-box containing genes, the *Pax* gene family, have been isolated in vertebrates, (40). Mutations in the *Pax-6* gene have been associated with the mouse mutant *small eye* (19), the corresponding human gene (*AN*) has been found deleted or mutated in aniridia (17, 18) and the *Drosophila eyeless* gene is *Pax-6* (28). The *Pax-6* gene is expressed in the developing central nervous system, the optic cup, lens, overlying epithelium, in the neuronal layers of the retina and the endocrine pancreas (39, 22, 37). The restricted expression of this gene suggests transcriptional regulation of expression by tissue-specific factors. Among several mechanisms used to restrain gene expression (1), alternate promoter usage is frequently operative (41, 34, 35). However, to date little is known about the regulation of *Pax-6*.

We have recently characterized the quail *Pax-6* gene, named *Pax-QNR* (22), defined its complete exon-intron organization, (12) and characterized a promoter region termed P0 (25). In this report, we describe the isolation of another cDNA (A1) colinear to the previously characterized MC29-QNR2 cDNA, except in its most 5'untranslated region (5'UTR) sequence. The A1 mRNA was initiated from an internal promoter (termed P1), located 3 Kb downstream from the previously described P0 promoter (25). The P1 promoter was able to drive CAT expression both in quail neuroretina cells (QNR) and in quail embryo cells (QEC) and, like P0, responded positively to the p46 Pax-QNR protein. As shown by RNase protection assays *Pax-QNR* mRNAs initiated from the P1 promoter were detected before the mRNAs initiated from the P0 promoter during neuroretina development. Moreover, P0-and P1-initiated mRNAs were differentially accumulated during neuroretina development : while P0-initiated transcripts increased from E5 to E8, the P1-initiated transcripts decreased. Only the mRNAs initiated from the P1 promoter could be detected in the quail pigmented retinal epithelium (RPE) and were not modulated during embryo development. However, transformation of these cells by the MC29 virus encoding the v-myc transcription factor can induce neuronal traits in the culture and these

transdifferentiated neuronal cultures show expression of P0-initiated mRNAs. These mRNAs were not expressed in MC29 RPE cultures without neuronal morphology. These results suggest that a shift in transcriptional regulation occurs in quail *Pax-QNR* gene expression during neuronal differentiation and that P0 initiation is induced in these cells.

MATERIALS AND METHODS

Cloning and DNA sequencing. The cDNA A1 was isolated from a cDNA library constructed in the pCDM8 vector from 15-day-old quail spinal cords (kindly supplied by C. Dulac) using MC29-QNR2 cDNA as a probe. The 5'UTR of the cDNA A1 as well as the homologous genomic DNA were ligated into M13 vectors mp18 and mp19. The nucleotide sequence was determined in both orientations by the dideoxy sequencing method using an Applied Biosystem 370A automatic sequencer. The EMBL nucleotide sequence database accession numbers is X82151.

Mapping of transcription initiation sites. Total RNA from QNR or heart was isolated by the guanidine isothiocyanate method. For the RNase protection assays, a 325 bp SstII-NotI (from -153 to +168) genomic fragment was blunt-ended and subcloned into the blunt-ended-PstI-HincII sites of the pGEM3 vector and used as previously described Dozier et al. (12), except that the hybridizations were performed at 50°C. The protected fragments were separated on a 5% sequencing gel. For the primer extension analysis, a 30-base synthetic oligonucleotide (5'-AAATGAGGCCGGGCCGGGGCTCGCTTTTCA-3') complementary to bases +34 to +62 of the *Pax-QNR* P1 promoter sequence shown in Fig.1B, was end-labelled with T4 polynucleotide kinase. The reaction was performed with 1 µg of Poly(A⁺) RNA prepared using a mRNA purification kit (Pharmacia) and 10⁶ cpm of labelled primer as described previously (20), except that the annealing was performed overnight at 45°C in 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 40 mM PIPES (pH 6.4) and 80% formamide. For the external primer extension analysis, 100 µg of total RNA or 1 ng of *in vitro*-synthesized A1 sense RNA (used as a positive control) were mixed with

1 ng of single stranded DNA of the 416 bp SstII genomic fragment (from -153 to +263) cloned into mp18 vector, in 26 μ l of 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 40 mM PIPES (pH 6.4) and 80% formamide, heated at 80°C for 10 minutes and incubated overnight at 45°C. After ethanol precipitation, the pellet was resuspended in a final volume of 10 μ l of Taq DNA polymerase buffer containing 20 U of RNasin (Promega) and 0.5 ng of 5' end-labelled universal sequencing primer, and the solution was incubated first at 60°C for 10 min, and then at room temperature for 10 minutes. The elongation reaction was carried out in 15 μ l of Taq buffer at 60°C for 1 hour in the presence of 330 μ M dNTPs and 5 U of sequencing grade Taq DNA polymerase (Promega). After RNase treatment, the elongated fragments were analyzed on a 6% sequencing gel.

Construction of CAT reporter plasmids. The 1010 bp NotI genomic fragment (from -839 to +168 of the P1 promoter sequence) was blunt-ended and cloned in both orientations into the blunt-ended BamHI site of the promoterless vector pBLCAT6. The P1 promoter sequence in the sense or antisense orientation with respect to the CAT gene, was named pP1N^S and pP1N^{AS}. To obtain the 5' deleted CAT construct, pP1 Δ 5, the blunt-ended NotI promoter fragment was subcloned into the blunt-ended BamHI site of the promoterless pBLCAT5. The pP1CAT5 construct obtained was digested with SphI and Sall, treated with exonuclease III and subsequently with the mung bean nuclease. The end point of the deletion was determined by dideoxy sequencing using an oligonucleotide corresponding to the vector sequence 5'-CAAGGCGATTAAGTTGGG-3' as primer. To obtain the 5' deleted CAT construct, pP1XN, which contains the 552 bp XhoI-NotI P1 promoter fragment (from -379 to +172), the pP1N^S was digested with Sall and XhoI, blunt-ended and religated. The enhancer constructs pP0CAT EP and pP1N^SCAT EP were obtained by cloning a 460 bp EcoRV-blunt-ended PstI fragment (containing a neuroretina-specific enhancer element described in reference 26), downstream of the CAT gene, into the SmaI site of pP0CAT and pP1N^SCAT, respectively. The pRSVCAT plasmid contains the CAT gene under the control of the Rous sarcoma virus long-terminal repeat (RSV-LTR).

Cell culture and virus. Dissociated QNR or pigmented retina (RPE) dissected from 7-day-old quail embryos were plated in Dulbecco/ F12 (v/v) medium containing 10% fetal calf serum, 1% vitamin MEM 100X, and 10 $\mu\text{g/ml}$ of conalbumin (complete medium). Dishes (60 mm) containing 5×10^6 dissociated QNR cells in complete medium were infected with RSV tsNY68 virus (a gift of G. Calothy) at 37°C. The infected cells were passaged four times on gelatin-coated dishes to allow the virus to spread, and the morphologically transformed cells were then cultured for an additional two days at either 37°C or 41°C. RPE cells were infected with MC29(RAV-1) virus as in reference (16) at low density and cultured on gelatin coated dishes. The neuronal phenotype appeared after three passages, and areas of cells with this phenotype were isolated under a microscope and grown as an homogeneous population. For the mRNA stability studies, QNR extracted from 8-day-old embryos were plated on 100-mm-diameter dishes and treated 36 hours later with 5 $\mu\text{g/ml}$ of actinomycin D for various times or 10 $\mu\text{g/ml}$ of cycloheximide for 3 hours.

RNA extraction and RNase protection analysis. Total RNA was extracted from quail neuroretina dissected from E5 to E18 embryos, and from hatched chicken, or from actinomycin D- and cycloheximide-treated E8 QNR cells, by the RNazol method (6). A 424 bp EcoRI-HincII fragment corresponding to the 5' part of the MC29-QNR2 cDNA and cloned into the pGEM4 vector described in Dozier et al. (12) was used to synthesize the antisense RNA probe used as described previously (12). When the GAPDH RNA probe was used, RNase protections were performed with 2 μg of RNA supplemented with 20 μg of yeast tRNA.

Immunofluorescence analysis. Normal or MC29-Infected RPE cells cultured on collagen-coated 12-mm microscope cover slips were fixed for 20 minutes with 3.7% paraformaldehyde in PBS, then treated with rabbit anti 90 $\times 10^3 M_r$ bovine brain neuron specific enolase (ICN) serum. Bound antibodies were revealed using swine anti rabbit FITC (Dako).

Transfection and CAT assays. Quail neuroretina cells, and quail embryo cells (QEC) were seeded at 5×10^5 cells per 60-mm dish in DMEM 10% FCS, 24 hours prior to transfection, performed by the calcium phosphate method. Cells were co-transfected with 1 or 10 μg of CAT constructs and 0.5 μg of plasmid RSV β -gal, used as an internal control of transfection

efficiency. For the experiments with the vector expressing the p46 Pax-QNR protein, cells were co-transfected with 1 μ g of the CAT construct and 5 μ g of pJ3 Ω 103 as described in reference (26).

***In vitro* transcription.** To perform the control A1 used in the external primer extension procedure, a 5' fragment of cDNA A1 (0.5 Kbp HincII) was cloned into the HincII site of the pGEM4 vector. The sense RNA probe was transcribed *in vitro* from the EcoRI linearized plasmid using T7 polymerase according to the manufacturer's specifications (Promega).

EMSA and orthophenanthroline footprinting. The DNA probe used was the 232 bp Δ 5-XhoI fragment (from -611 to -380) [α^{32} P] dCTP labeled with the Klenow fragment of DNA polymerase I (Boehringer). Gel retardation assays were performed with 1 μ l of reticulocyte lysates as described previously (12). For band shift assays with antibodies, reticulocyte lysates were incubated for 1 h at 0°C in binding buffer supplemented with 1 μ l of antiserum directed against the carboxy-terminal part of the Pax-QNR protein products (4) or 1 μ l of preimmune serum, prior to introduction of the probe. Gel retardation assays were performed with 1 μ g of reticulocyte lysates or bacterially expressed paired, homeo and carboxy-terminal domains as described previously (12). Orthophenanthroline-copper (Cu²⁺) footprinting was carried out essentially as described previously (25) using the 232 bp Δ 5-XhoI fragment and bacterially expressed paired and homeo domains peptides or fusion peptide MS2.

***In situ* hybridization.**

A 653 bp XhoI-Asp718 genomic fragment encompassing exon 0 and cloned into the pGEM3 vector described in reference (25) was used to synthesize the RNA probe specific for the P0-initiated mRNAs. To synthesize the RNA probe specific for the P1-initiated mRNAs, a 416 bp SstII genomic fragment (from -153 to +263) was blunt-ended and cloned into the HincII site of the pGEM3 vector. Sense and antisense RNA probes were prepared with [³⁵S] CTP and used as described previously (37).

RESULTS

Cloning and sequencing of the *Pax-QNR* promoter P1

The isolated A1 cDNA is colinear to the MC29-QNR2 cDNA, except in its most 5'UTR (Fig. 1A). This 5'UTR is encoded by the genomic sequences immediately upstream from exon 1 (named $\Delta E1$, Fig. 1B). This cDNA was able to direct the synthesis of the 46 and 32/33 $\times 10^3 M_r$ Pax-QNR proteins both *in vitro* and *in vivo* (38). A cDNA containing part of this 5'UTR was also found in human (17), showing that the A1-specific 5'UTR sequences are phylogenetically conserved (Fig. 1C), but nothing is known regarding human Pax-6 promotion. Since alternative splicing within the 5'UTR is often combined with alternative promoter usage (21, 35), the presence of this different 5'UTR suggests that the A1 cDNA corresponds to a mRNA initiated from different promoter from that already described (P0).

Determination of the transcriptional start site and functional analysis of the *Pax-QNR* P1 promoter

To determine whether the A1 mRNA is initiated from a distinct promoter, three different techniques were used to define the A1 transcriptional start site. For the primer extension experiments, a 5'-labelled 30-base primer complementary to cDNA sequences encoded by the *Pax-QNR* exon 1 (oligo PEX, positions +34 to +62 in Fig. 1B) was hybridized to 1 μ g of poly(A⁺) RNA and was extended by reverse transcription. A faint primer extension product of 63 nt appeared when QNR RNA, but not when heart RNA was used, suggesting that this product arises from specifically primed *Pax-QNR* mRNAs (Fig. 2A). This result was confirmed by an external primer extension analysis (11). In this experiment, total RNA from QNR or heart, or *in vitro*-synthesized A1 sense RNA (used as a positive control) were hybridized with antisense single-stranded DNA corresponding to the 416 bp SstII genomic fragment (from -152 to +263 in Fig. 1B). The universal sequencing primer was annealed to the hybrid and Taq DNA polymerase was added to extend the primer up to the RNA cap site (see schema in Fig. 2B). One band was detected when QNR RNA, but not when heart RNA was used (Fig. 2B). The size of this elongated fragment localizes the transcriptional start site upstream from the beginning of the A1

cDNA, in agreement with the primer extension analysis. Next, we performed RNase protection assays with a 325 bp SstII-NotI genomic fragment (from -153 to +168 in Fig. 1B) containing the extended exon 1 (E1). This fragment was subcloned into the pGEM3 vector and a ^{32}P labelled antisense RNA probe was hybridized to either QNR or heart RNA. A major fragment of approximately 170 nt in length was protected with QNR RNA but not with heart RNA (Fig. 2C). The RNA initiation site determined by this method was consistent with that defined by the primer extension experiments. Therefore the nucleotide located 15 bases 5' to the beginning of the A1 cDNA was designated +1, the start of transcription initiation. These results indicate that the A1 mRNA is initiated at a new transcriptional start site involving a 5' extended version of exon 1.

In order to determine whether this region exhibits a promoter activity, a 1010 bp NotI genomic fragment (from -839 to +168 in Fig. 1B) was inserted in both orientations upstream from the bacterial CAT gene of the promoterless pBLCAT vector. The resulting plasmids (pP1^S and pP1^{AS}) were transiently transfected into QNR cells in parallel with pRSVCAT as a positive control and the promoterless pBLCAT5 vector as a negative control, and assayed for CAT activity. The results showed that the 1010 bp NotI fragment in the correct orientation (pP1^S, Fig. 3A, lane 1), but not the antisense orientation (pP1^{AS} Fig. 3A, lane 1) was able to drive the expression of the CAT gene in the transfected QNR. This promoter was also able to drive the expression of the CAT gene in the transiently transfected QEC, albeit with a lower efficiency but with an efficiency comparable to the previously characterized P0 promoter (Fig. 3B). This result shows the presence of a second *Pax-QNR* promoter (designated P1), located about 3 Kbp downstream from the *Pax-QNR* P0 promoter. Hereafter, we will refer to P0-initiated messengers for exon 0 containing mRNAs, and P1-initiated messengers for mRNA containing the A1-specific part of exon 1, but it should be noted that *Pax-QNR* produced additional mRNAs not evidenced in the RNase protection assay (12).

***Pax-QNR* P1 promoter elements**

The sequence of the 5' flanking region of this downstream promoter (Fig. 1B) revealed the presence of a TATA box-like sequence (AATATT) and a canonical CAAT box, located

respectively -23 and -66 nucleotides upstream from the transcriptional initiation site, at positions consistent with those usually found in eukaryotic genes. A computer-assisted search revealed a number of potential regulatory elements : seven putative Sp1 binding sites matching 7 to 10 bp of the consensus Sp1 binding sequence $G/TGGGCGG^{G/A}G/A^C/T$ (14) ; 10 potential E binding sites for the b/HLH/LZ nuclear factors, such as myc and USF (for review see reference 27) ; two NF- κ B-like sequences (consensus sequence $GGGR^A C_T TYYCC$ see reference 20) and finally, close to the TATA box, two octamer binding sites at -36 and +5 (33, 30).

Autoregulation of the *Pax-QNR* P1 promoter by the Pax-QNR protein

In order to determine whether the Pax-QNR protein is able to regulate the *Pax-QNR* P1 promoter, equal amount of the pP1^S construct were cotransfected with increasing amounts of the pJ3 Ω 103 vector which expresses the the p46 Pax-QNR protein (described in ref. (25)), into QEC. Cell lysates were collected two days after transfection, and the levels of CAT activity present in the lysates were determined. Co-transfection of the pP1^S with the vector expressing the Pax-QNR protein resulted in a 5 fold increase of CAT activity relative to the vector control (Fig. 4A, compare lanes 1 and 2). Thus the transcriptional activator p46^{Pax-QNR} acts similarly on the P0 (25) and P1 promoters *in vitro*.

To map the p46^{Pax-QNR} responsive element(s) in the *Pax-QNR* P1 promoter, 5' deletion constructs of the promoter were tested for Pax-QNR responsiveness following transient co-transfection into QEC. Removal of the 5' sequences of the P1 promoter from the NotI site (position -839) to position -611 (construct pP1 Δ 5) had no effect on the Pax-QNR responsiveness (Fig. 4A, compare lanes 2 and 4). By contrast, further deletion to the XhoI site (position -379, construct pP1XN) abolished the Pax-QNR responsiveness (Fig. 4A, compare lanes 5 and 6). This suggests that the 232 bp promoter fragment, between position -611 and the XhoI site (position -379) contains a p46^{Pax-QNR} responsive element. We tested this fragment for direct p46^{Pax-QNR} protein-DNA binding by the electrophoretic migration shift assay (EMSA). Purified fragment was labelled and incubated with *in vitro*-synthesized p46 Pax-QNR protein. One DNA-protein complex was detected (Fig. 4B, lane 2, arrow). The formation of this complex was completely blocked after the addition of a specific Pax-QNR antiserum described in Carrière et

al. (4) (Fig. 4B, lane 3) but not after the addition of preimmune serum (Fig. 4B, lane 4). These results demonstrate binding of the p46 Pax-QNR protein to the *Pax-QNR* P1 promoter sequences shown to mediate the Pax-QNR activation. The precise sequence recognized was further determined. A scaled-up band shift experiment was performed using bacterially expressed paired and homeodomain peptides (25). The entire gel was treated with phenanthroline, and the free DNA and the DNA bound by the peptides were eluted and analysed on a sequencing gel. Only a paired domain binding region was identified within the 232bp Δ 5-XhoI fragment. The comparison of the P1 promoter Pax-QNR-binding site with the P0 (25), chicken α A-crystallin (10), mouse α A-crystallin (9) and mouse N-Cam L1 (5) Pax-6 binding sites is shown in Figure 4C. The alignment of the different sequences yielded a common pattern related to the Pax-6 binding site derived by PCR-based selection (15).

P0- and P1-initiated mRNAs are expressed *in vivo* in the ocular tissues

In order to study the expression pattern of the P0- and P1-initiated mRNAs *in vivo*, we performed *in situ* hybridization using riboprobes specific for each of these mRNAs (see Materials and Methods). We performed serial sections of quail or chicken embryos and hybridized them with the two specific riboprobes. Results show (Fig. 5) that the neuroretina both at embryonic day 9 (quail, Fig. 5C, D) and 20 (chicken, Fig. 5E, F), the corneal epithelium (Fig. 5G, I) and the lens (not shown) expressed mRNAs initiated from P0 and P1. In the neuroretina, no difference in hybridization in the cellular layers could be distinguished with the two probes (Fig. 5, compare panels C, D, E and F). In addition, the developing neural tube also expressed both mRNA species (Fig. 5A, B). In contrast, in the pancreas, the P1-initiated mRNAs were abundant whereas the P0-initiated mRNAs were not detected (38). Thus, these results indicate that both P0- and P1-initiated mRNAs are expressed in the same cell layers in the neuroretina.

P0- and P1-initiated mRNAs are expressed differentially during neuroretina development

To quantify the mRNAs initiated from P0 and P1, we performed RNase protection assays during neuroretina development. We used a riboprobe corresponding to the 5'EcoRI-HincII fragment of MC29-QNR2 cDNA which detects both the MC29-QNR2 mRNA initiated from the P0 promoter and the P1-initiated messengers (see Fig. 6A, top panel and reference (12).

Antisense labelled RNA probe was hybridized to total RNA extracted from quail neuroretinas dissected from E5 to E18 embryos and from chicks after hatching. P0-initiated mRNAs could be detected as a full-length protected fragment of 424 nt, whereas the P1-initiated mRNAs (devoid of exon 0) could be detected as a smaller protected fragment of 323 nt (Fig. 6A, top panel). The results show (Fig. 6A, bottom panel) that in contrast to the P0-initiated mRNAs, the P1-initiated mRNAs were clearly detected in the neuroretina from E5 embryos: a P1/P0 ratio of 61 was determined by densitometric scanning of the 323 and 424 radiolabeled bands, and this ratio varied from 61 to 0.4 between E5 and E18. The analysis of three independent experiments shows that the amount of the P1-initiated mRNAs remained relatively constant from E5 to E8 and declined after this stage (Fig. 6B). In contrast, the P0-initiated mRNAs increased regularly from E5 to E8 (8 fold) and reached a plateau value at this stage (Fig. 6B). These results indicate that the two mRNA species are differentially expressed during neuroretina development.

P0- and P1-initiated mRNAs exhibit similar relative stability in E8 neuroretina

To explore the possibility that the two mRNA species undergo differential post-transcriptional processing, we studied the accumulation of these two messengers in the E8 neuroretina in the presence of cycloheximide (known as a protein synthesis inhibitor which stabilizes the messengers that are rapidly degraded under normal conditions) or actinomycin D (an inhibitor of RNA Polymerases). As shown in Fig. 7A, the ratio between P0- and P1-initiated mRNAs is similar with or without cycloheximide or actinomycin D treatments, indicating no major differences in relative stability between these two mRNA species. This ratio, close to 2, is rather found for E11 instead of E8 QNR (ratio close to 6, see Fig. 6A). This may be explained by the 36 hours of *in vitro* culture separating the plating time from extraction.

Differential Pax-QNR promoter usage is not linked to cellular proliferation events

Since we have shown that the amount of the P0-initiated mRNAs is maximal after E8, during the period when the cellular proliferation declines (29), we determined whether this mRNA could be modulated by proliferation events. To test the possibility that an arrest in cellular growth could induce P0-initiation, we infected QNR cells with a Rous Sarcoma Virus (RSV) mutant expressing a *tssrc* gene (RSVtsNY68) known to maintain neuroretina proliferation at the

permissive temperature (37°C); at a non-permissive temperature (41°C), the cells stop growing (3). We examined the expression of the *Pax-QNR* mRNAs by RNase protection assays performed on these cells cultured at 37°C or shifted to 41°C. The results show (Fig. 7C) that the P1/P0 ratio is similar at 37°C and 41°C, indicating that stopping cell growth is not sufficient to modulate *Pax-QNR* initiation in QNR cells.

When E7 neuroretina is cultured *in vitro*, the P0-initiated mRNAs are rapidly lost (Fig. 7B, compare lane E8 to E8 P1 and P3), while the level of P1-initiated mRNAs remains constant. Since cultured QNR cells cease to proliferate (7), this is a further indication that P0-initiation is not linked to cell growth arrest. Disappearance of P0-initiated mRNAs could be explained if it is assumed that these messengers are expressed in post-mitotic neurons which are lost in the culture. The fact that P0-initiated mRNAs were clearly detected in the RSV tsNY68-infected QNR cells (Fig. 7C, lane 37°C) but not in uninfected cultures, could be explained by the src protein activity. In fact, RSV tsNY68 has been described as being able to induce the proliferation of infected neurons (8) and therefore to maintain them in the culture. Thus, P0-initiated mRNA expression in the neuroretina after E5 may be concomitant with the onset of neuronal differentiation, rather than with the decrease in cellular proliferation.

P0-initiated mRNAs are expressed during neuronal differentiation

During the study of the effect of v-myc on the differentiation process, we observed that the retinal pigmented epithelial cells (RPE, Fig. 8A) infected with the MC29 virus became transformed (Fig. 8B) and acquired neuronal traits. These included neuronal morphology with long cellular processes (Fig. 8C), and the expression of several neuronal markers (such as neuron specific enolase NSE, Fig. 8D ; a detailed characterization of these cells will be presented elsewhere). RNase protection assays performed on normal RPE show a low level of expression of P1-initiated mRNAs. In contrast to the neuroretina, no variation in the *Pax-QNR* expression can be observed during RPE development (Fig. 9A). In addition, RPE does not show expression of the P0-initiated mRNA (Fig. 9A). In cultured RPE, or in MC29-transformed RPE without neuronal traits, only the P1-initiated mRNAs are detected, albeit at a higher level than in RPE tissue (compare Fig. 9A lane E8 with lanes RPE or RPE MC29, Fig. 9B). In contrast, MC29-

transformed RPE exhibiting neuronal traits showed, in addition to the P1-initiated mRNAs, the P0-initiated mRNAs (424 nt protected fragment, Fig. 9 B, lane RPE MC29 neurons). These results indicate that neurons efficiently accumulate Pax-QNR P0-initiated mRNAs.

A *Pax-QNR* neuroretina-specific enhancer element functions in a promoter-specific manner.

All the results described above suggest that the two *Pax-QNR* promoters P0 and P1 are under the control of different regulators. We have recently characterized within the *Pax-QNR* gene, a neuroretina-specific enhancer element (located in exon α , see Fig. 1A) active on a CAT construct driven by the *Pax-QNR* P0 promoter (24). The activity of this enhancer prompted us to determine whether this element was able to enhance CAT activity driven by the *Pax-QNR* P1 promoter. For this purpose, a 460 bp EcoRV-PstI *Pax-QNR* genomic fragment, containing the enhancer element, was cloned 3' to the CAT gene in the pPOCAT or pP1^{SCAT} vectors (Fig. 10). The resulting constructs (pPOCAT EP and pP1^{SCAT} EP, Fig. 10) and their parental plasmids pPOCAT and pP1^{SCAT} were transiently transfected into E7 QNR and QEC, and assayed for CAT activity, expressed relative to the values for the parental plasmids. The results show (Fig. 10) that in E7 QNR cells, the enhancer element increased the CAT activity of the P0 promoter by about six-fold, whereas it failed to increase the CAT activity of the P1 promoter above basal level. In QEC, which do not express the P0-initiated mRNAs, the enhancer element did not increase the CAT activity of either the P0 or P1 promoters above basal levels (Fig. 10). Thus the activity of this *Pax-QNR* neuroretina-specific enhancer is restricted to the P0 promoter and this may explain the differential activity of P0 and P1 during neuroretina development.

DISCUSSION

***Pax-QNR(Pax-6)* is expressed through two promoters**

In this report we present evidence that the quail *Pax-6* (*Pax-QNR*) mRNAs are transcribed from two distinct promoters. We have isolated a cDNA clone, A1 showing a new 5'UTR

sequence, which corresponds to a 5' extended exon 1. By primer extension and RNase protection experiments, we have shown that the A1 initiation site is distinct from that described for the MC29-QNR2 mRNA (25) and maps 15 nt upstream from the 5' end of the corresponding cDNA clone. Moreover, this region is able to drive the expression of the CAT gene in transfected cells. Taken together, these results lead to the conclusion that the quail *Pax-6* gene contains a second promoter located 3 Kbp downstream from the previously characterized P0 promoter (25).

The sequence of this promoter P1 includes a TATA box-like sequence (position -23) and a canonical CAAT box (position -66) as well as putative binding sites for regulatory proteins. Of particular interest are the octamer motifs located at positions -36 and +5, which are not found in P0. Octamer boxes (ATGCAAAT) are found upstream from a number of tissue-specific and ubiquitously expressed genes. The octamer is bound by transcriptional regulators containing a DNA-binding motif referred to as the POU domain, and these proteins are developmental regulators (31, 32). Some of these genes are expressed in the developing eye (2) and the *Pit-1* gene, one of the POU-family members (31), is expressed in the anterior pituitary gland, like the *Pax-6* gene (39).

***Pax-QNR(Pax-6)* mRNAs initiated from P0 or P1 are not accumulated similarly during neuroretina development**

RNase protection assays show that P0- and P1-initiated mRNAs species are not expressed similarly during the neuroretina development. At E5, the P1-initiated mRNAs are detected first. The amount of these mRNAs remained constant up to E8 and decreased thereafter. P0-initiated transcripts were barely detected at E5. The amount of these mRNAs increased regularly up to E8, remained constant up to E18 and declined after hatching. Therefore, the accumulation of the P0-initiated mRNAs is maximal during the period when cellular proliferation declines. Using the RSV mutant tsNY68, we showed that both P0- and P1-initiated mRNAs are expressed in proliferating cells and that their amounts are not modulated after the arrest of cellular growth.

P0-initiated mRNAs follow neuronal differentiation

We found that in contrast to the P1-initiated mRNAs, the P0-initiated mRNAs disappear when E7 neuroretina are cultured *in vitro*. Indeed, the first cells lost from *in vitro* cultured

neuroretina are the small-rounded neuronal cells. In RPE, only P1-initiated mRNAs are detected. RPE represents a useful model since neuronal differentiation from RPE cells has been already documented after bFGF treatment of chicken RPE *in vitro* (24) or *in vivo* (23). Oncogenes usually block this differentiation process, but induction of differentiation has been documented for the *myc* oncogene in neural crest cells (16). MC29 carrying the *v-myc* oncogene transforms RPE cells and is able to induce neuronal differentiation as judged by morphological criteria and NSE expression. Using MC29-infected RPE, we demonstrated that P0-initiated mRNAs are detected only after the expression of neuronal markers. This suggests that the expression of these mRNAs is associated with neuronal differentiation events and that factor(s) present in the differentiating neurons are able to promote P0 initiation.

What distinguishes P0 from P1 ?

We have recently characterized within the Pax-QNR gene a cis-acting DNA element enhancing the expression of the *Pax-QNR* P0 promoter in the neuroretina cells, but not in QEC or in RPE cells (26). The activity of this neuroretina-specific enhancer is restricted to the P0 promoter since the P1 promoter remains unresponsive to it. Moreover, in QNR cells the activity of this enhancer is weak at E5 and high at E7/E8 and parallels the level of expression of P0-initiated mRNAs (26). These results suggest that this enhancer participates, in a developmentally regulated way, in P0 initiation and that the two *Pax-QNR* promoters P0 and P1 undergo differential regulation.

The P0-initiation is induced upon neuronal differentiation. Why would P0 initiation be necessary in these cells since P1 initiation is also occurring ? This may be because some critical event taking place during the neuronal differentiation is dependent on the amount of Pax-QNR proteins. Indeed, the dominant phenotype obtained with heterozygous animals where only one copy of *Pax-6* is present demonstrates the importance of the protein dosage for Pax-6 function (36, 18). A distinct initiation site used by neurons may be the way to increase the amount of Pax-QNR mRNAs and proteins in these cells, without affecting the amount of Pax-QNR mRNAs and proteins in the neighbouring cells. This may suggest that Pax-QNR target promoters could be regulated differentially depending on the amount of Pax-QNR transcription factor present in the

cell. Since the nucleotide sequence of the Pax-6 binding sites already identified is heterogeneous, it is conceivable that the Pax-6 binding affinity and transcriptional response may differ from one site to another. Therefore, the amount of Pax-6 required to *trans*-activate a particular gene may be dependent from the binding site(s) present in the promoter, and a gradient in the protein amount may be a way to activate distinct target genes during retinal differentiation. In addition, these observations also suggest that mutations located outside the *Pax-6* locus and affecting the promoter usage, but not the protein structure, may be involved in some Aniridia phenotypes when the Pax-6 coding sequence is found to be unaltered (36).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank P.Martin, G.Buttice and R. Pierce, for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique, Institut Pasteur de Lille, Association pour la Recherche contre le Cancer and the Association Française Retinitis Pigmentosa.

REFERENCES

1. **Babiss, L. E., and J. M. Friedman.** 1990. Regulation of N-myc gene expression : use of an Adenovirus vector to demonstrate posttranscriptional control. *Mol. Cell. Biol.* **10**:6700-6708.
2. **Beebe, D.** 1994. Homeobox genes and vertebrate eye development. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **35**:2897-2900.
3. **Calothy, G., F. Poirier, G. Dambrine, P. Mignatti , P. Combes, and B. Pessac.** 1980. Expression of viral oncogenes in differentiating chick embryo neuroretinal cells infected with avian tumor viruses. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **44**:83-990.
4. **Carrière, C., S. Plaza, P. Martin, B. Quatannens, M. Bailly, D. Stehelin, and S. Saule.** 1993. Characterization of quail pax-6 (Pax-QNR) proteins expressed in the neuroretina. *Mol. Cell. Biol.* **13**:7257-7266.
5. **Chalepakis, G., J.Wijnholds, P. Giese, M.Schachner, and P.Gruss.** 1994. Characterization of Pax-6 and Hoxa-1 binding to the promoter region of the neural cell adhesion molecule L1. *DNA and CELL BIOL.* **13** : 891-900.
6. **Chomczynski, P., and N. Sacchi.** 1987. Single step method of RNA isolation by guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**:156-159.
7. **Crisanti Combes, P., A. Privat, B. Pessac, and G. Calothy.** 1977. Differentiation of chick embryo neuroretina cells in monolayer cultures. An ultrastructural study. *Cell Tiss. Res.* **185**:159-173.
8. **Crisanti Combes, P., A-M. Lorinet, A.Girard, B. Pessac, M. Wassef, and G. Calothy.** 1982. Expression of neuronal markers in chick and quail embryo neuroretina cultures infected with Rous sarcoma virus. *Cell Diff.* **11**:45-54.
9. **Cvekl, A., F. Kashanchi, C. Sax, J.Brady, and J. Piatigorsky.** 1995. Transcriptional regulation of the mouse α A-Crystallin gene: activation dependent on a cyclic AMP-responsive element (DE1/CRE) and a Pax-6-binding site. *Mol.Cell.Biol.* **15** : 653-660.

10. **Cvekl, A., C. Sax, E. Bresnick, and J. Piatigorsky.** 1994. A complex array of positive and negative elements regulates the chicken α A-Crystallin gene : Involvement of Pax-6, USF, CREB and/or CREM, and AP-1 proteins. *Mol.Cell.Biol.* **14** : 7363-7376.
11. **Deak, F., E. Barta, S. Mestric, M. Biesold, and I. Kiss.** 1991. Complex pattern of alternative splicing generates unusual diversity in the leader sequence of the chicken link protein mRNA. *Nucleic Acids Res.* **19**:4983-4990.
12. **Dozier, C., C. Carrière, D. Grevin, P. Martin, B. Quatannens, D. Stehelin, and S. Saule.** 1993. Structure and DNA-binding properties of *Pax-QNR*, a pairedbox- and homeobox-containing gene. *Cell Growth and Differentiation* **4**:281-289.
13. **Duboule, D.** (1994). *Guidebook to the Homeobox Genes.* Sambrook & Tooze publication at Oxford University Press.
14. **Dynan, W. S., S. Sazer, R. Tijan, and R. T. Schimke.** 1986. Transcription factor Sp1 recognises a DNA sequence in the mouse dihydrofolate reductase promoter. *Nature* **319**:246-248.
15. **Epstein, J., J. Cai, T. Glaser, L. Jepeal, and R. Maas.** 1994. Identification of A *Pax* paired domain recognition sequence and evidence for DNA-dependent conformational change. *J.Biol.Chem.* **269**: 8355-8361.
16. **Fauquet, M., D. Stehelin, and S. Saule.** 1990. Myc products induce the expression of catecholaminergic traits in quail neural crest-derived cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**:1546-1550.
17. **Glaser, T., D. Waldon, and R. L. Maas.** 1992. Genomic structure, evolutionary conservation and aniridia mutations in the human *pax-6* gene. *Nature genet.* **2**:231-239.
18. **Glaser, T., D. Walton, J. Cai, J. Epstein, L. Jepeal, and R.L. Maas.** 1995. PAX-6 gene mutations in Aniridia. *Molecular Genetics of Ocular Disease* (Wiley-Liss, inc), pp.51-82.
19. **Hill, R. E., J. Favor, B. Hogan, C. C. Ton, G. Saunders, I. Hanson, J. Prosser, T. Jordan, N. Hastie, and V. V. Heyningen.** 1991. Mouse small eye results from mutations in a paired-like homeobox-containing gene. *Nature* **354**:522-525.

20. **Lenardo, M., and D. Baltimore.** 1989. NF- κ B : a pleotropic mediator of inductible and tissue-specific gene control. *Cell.* **83**:6682-6686.
21. **Luo, X., K. Park, F. Lopez-Casillas, and K. Kim.** 1989. Structural features of the acetyl-CoA carboxylase gene : Mechanisms for the generation of mRNAs with 5'end heterogeneity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**:4042-4046.
22. **Martin, P., C. Carrière, C. Dozier, B. Quatannens, M. Mirabel, B. Vandebunder, D. Stehelin, and S. Saule.** 1992. Characterization of a pairedbox- and homeobox-containing quail gene (pax-QNR) expressed in the neuroretina. *Oncogene* **7**:1721-1728.
23. **Park, C., and M. Hollenberg.** 1989. Basic fibroblast growth factor induces retinal regeneration *in vivo*. *Devl. Biol.* **134**:201-205.
24. **Pittack, C., M. Jones, and T. Reh.** 1991. Basic fibroblast growth factor induces retinal pigment epithelium to generate neural retina *in vitro*. *Development* **113**:577-588.
25. **Plaza, S., C. Dozier, and S. Saule.** 1993. Quail Pax-6(Pax-QNR) encodes a transcription factor able to bind and *trans*-activate its own promoter. *Cell Growth & Diff.* **4**:1041-1050.
26. **Plaza, S., C. Dozier, M.-C. Langlois, and S. Saule.** 1995. Identification and characterization of a neuroretina-specific enhancer element in the Quail *Pax-6 (Pax-QNR)* gene. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 892-903.
27. **Prendergast, G. C., and E. B. Ziff.** 1992. A new bind for *myc*. *Trends Genet.* **8**:9 1-96.
28. **Quiring, R., U. Walldorf, U. Kloter, and W. Gehering.** 1994. Homology of the eyeless gene of *Drosophila* to the small eye gene in mice and Aniridia in Humans. *Science* **265**:785-789.
29. **Romanoff, A. F.** 1960. The avian embryo. New-York : McMillan Co.
30. **Rosales, R., M. Vigneron, M. Macchi, I. Davidson, F. H. Xiao, and P. Chambon.** 1987. *In vitro* binding of cell-specific and ubiquitous nuclear proteins to the octamer motif of the SV40 enhancer and related motifs present in other promoters and enhancers. *EMBO.J.* **6**:3015-3025.
31. **Rosenfeld, M.** 1991. POU-domain transcription factors : pou-er-ful developmental regulators. *Genes Dev.* **5**:897-907.

32. **Ruvkun, G., and M. Finney.** 1991. Regulation of transcription and cell identity by POU domain proteins. *Cell* **64**:475-478.
33. **Singh, H., R. Sen, D. Baltimore, and P. A. Sharp.** 1986. A nuclear factor that binds to a conserved sequence motif in transcriptional control elements of immunoglobulin genes. *Nature* **319**:154-157.
34. **Strähle, U., A. Schmidt, G. Kelsey, F. Stewart, T. Cole, W. Schmid, and G. Schütz.** 1992. At least three promoters direct expression of the mouse glucocorticoid receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**:6731-6735.
35. **Timmusk, T., K. Palm, M. Metsis, T. Reintam, V. Paalme, M. Saarma, M., and H. Persson.** 1993. Multiple promoters direct tissue-specific expression of the rat BDNF gene. *Neuron* **10**:475-489.
36. **Tremblay, P., and P. Gruss.** 1994. Pax: Genes for Mice and Men. *Pharmac. Ther.* **61**:205-226.
37. **Turque, N., S. Plaza, F. Radvanyi, C. Carrière, and S. Saule.** 1994. Pax-QNR/Pax-6, a paired box-and homeobox-containing gene expressed in neurons is also expressed in pancreatic endocrine cells. *Molecular Endocrinology* **8**:929-938.
38. **Turque, N.,** Unpublished data.
39. **Walther, C., and P. Gruss.** 1991. Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development* **113**:1435-1449.
40. **Walther, C., J.-L. Guenet, D. Simon, U. Deutch, B. Jostes, M. Goulding, D. D., Plachov, R. Balling, R., and P. Gruss.** 1991. Pax : a murine gene family of paired box containing genes. *Genomics* **11**:424-434.
41. **Yamasaki, T., H. Nakajima, N. Kono, K. Hotta, K. Yamada, E. Imai, M. Kuwajima, T. Noguchi, T. Tanaka, and S. Tarui.** 1991. Structure of the entire human muscle phosphofructokinase-encoding gene: a two promoter system. *Gene* **104**: 277-282.

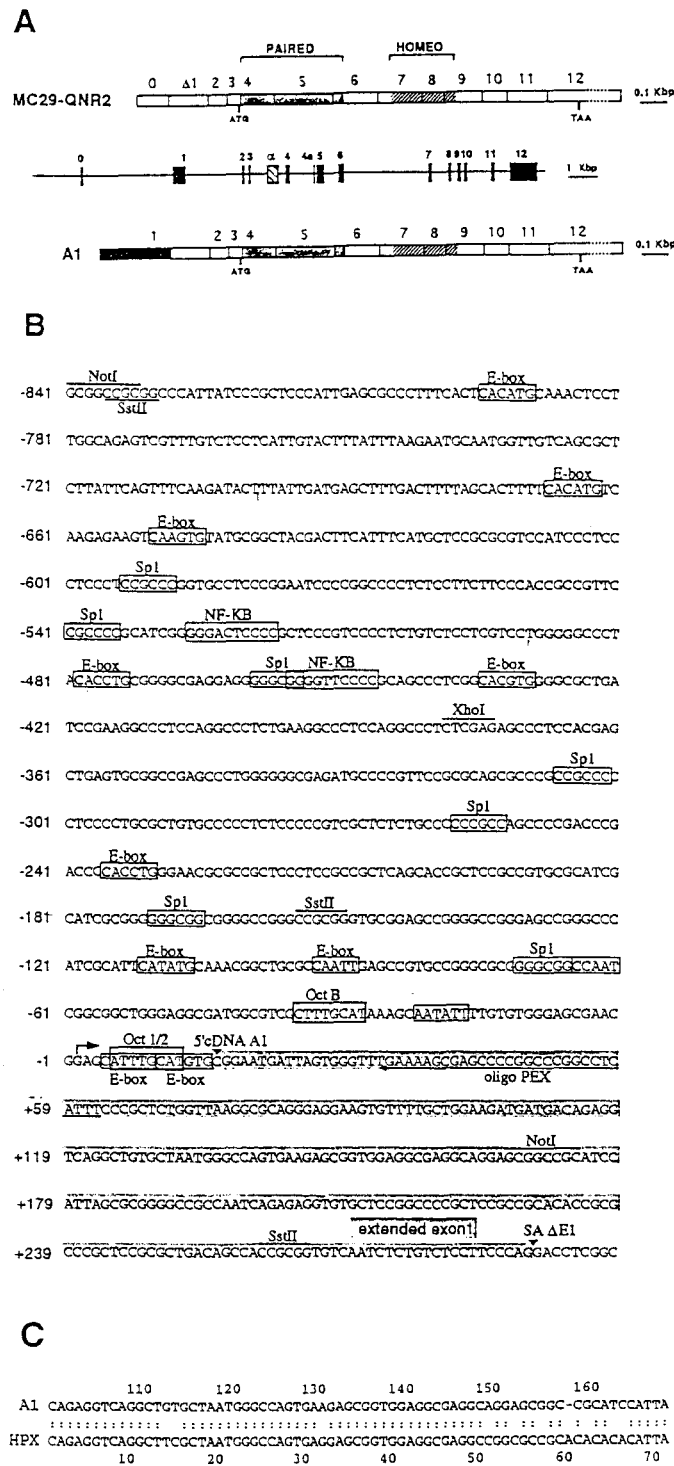


Figure 1 : (A) Exon structure of the quail *Pax-QNR* gene and comparison between the MC29-QNR2 and A1 cDNAs. The boxes indicate the exons. (B) Sequence of the *Pax-QNR* P1 promoter. The sequence corresponds to a 1140 bp genomic fragment of the *Pax-QNR* gene. The arrow represents the transcriptional start site. The sequence is numbered from the start site. In grey, sequence of the A1 5' UTR. SA, splice acceptor indicates the exon0/ Δ exon1 junction. (C) Comparison of the 5'UTR sequences of the A1 cDNA and the human λ HPX-2 cDNA (HPX in the figure) (described in ref.17). Double dots indicate identity of bases at that positions.

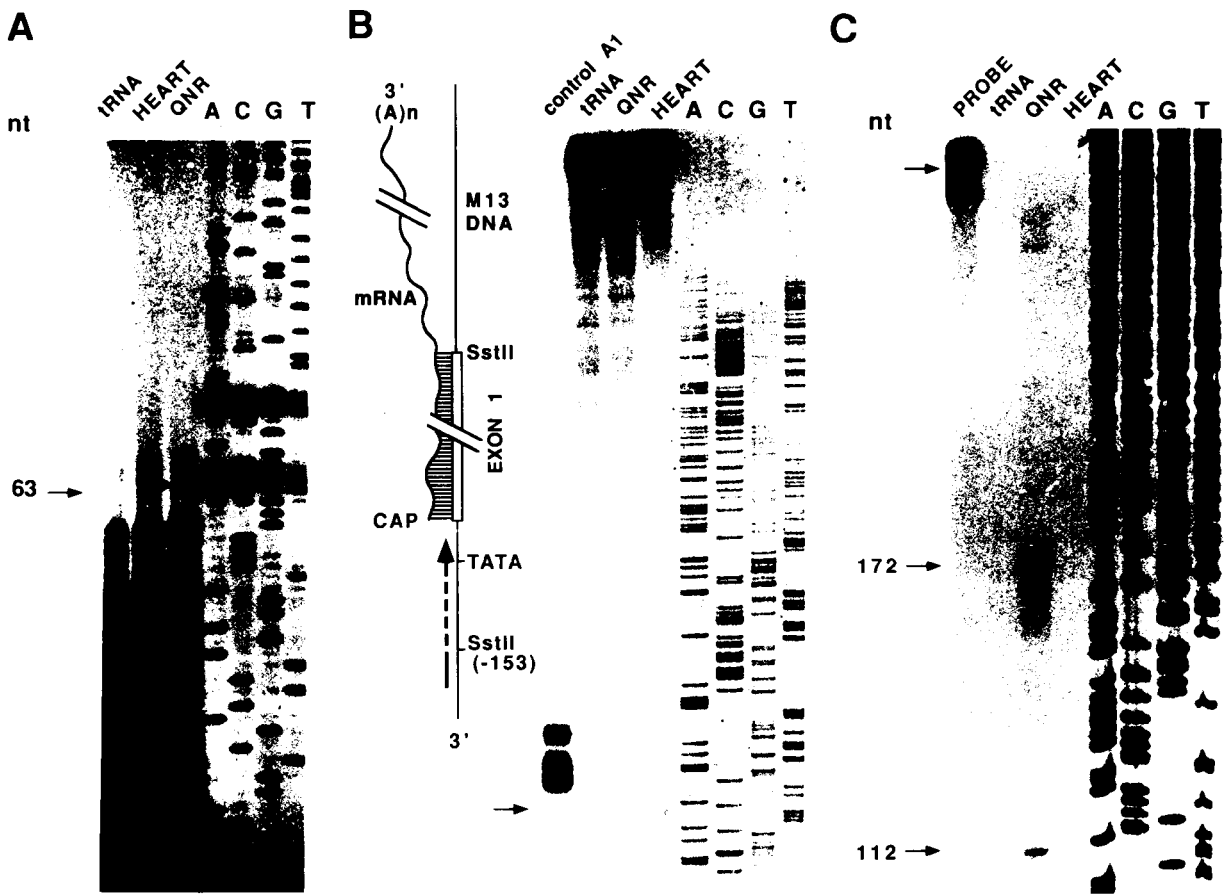


Figure 2 : Mapping of the transcription start sites of the P1 *Pax-QNR* promoter. (A) Primer extension analysis. 1 μ g of Poly(A⁺) quail RNA from neuroretina (QNR) or heart was hybridized to a 5' end-labelled 30-mer oligonucleotide primer. After reaction with reverse transcriptase, the products were analyzed on a 6% sequencing gel along with a sequencing ladder (M13mp18 template using the 17-mer universal primer). The positions of the transcriptional start sites are indicated by arrows. (B) Mapping of transcription start sites by external primer extension analysis. A M13mp18 DNA carrying the RNA-complementary strand of exon 1 and the promoter region (SstII genomic fragment, from -153 to +263) was used as template and hybridized to 100 μ g of total RNA from QNR and heart or 1ng of *in vitro* synthesized A1 sense RNA (lane control A1). ³²P end-labelled M13mp18 17-mer universal primer was hybridized, extended with Taq DNA polymerase and analyzed on a 6% sequencing gel. (C) RNase protection analysis. Total RNA (20 μ g) from QNR and heart was hybridized with an antisense RNA probe prepared from the 325 bp SstII-NotI genomic fragment. Following RNase digestion, the samples were analyzed on a 5% sequencing gel. The sequencing ladder (M13mp18 template using the 17-mer universal primer) was used to determine the number of nucleotides in the fragments protected by the RNAs which are indicated by arrows.

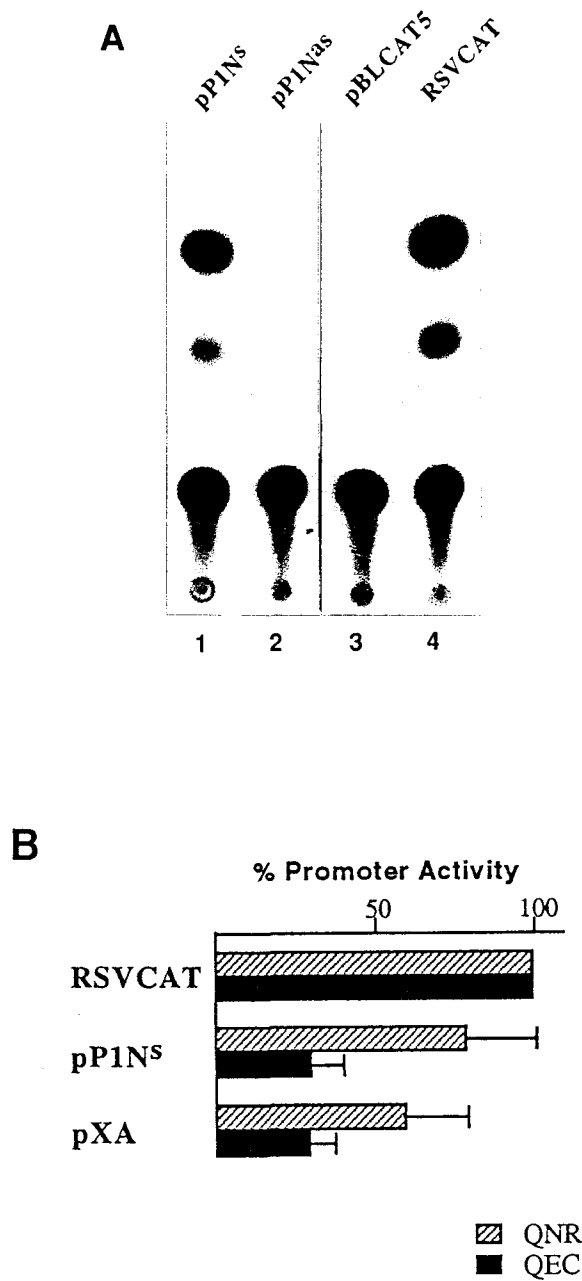


Figure 3 : CAT activities of the promoter region. (A) Plasmids pP1NS and pP1NAS contain the 1.01 Kbp NotI fragment cloned in the pBLCAT6 reporter plasmid, upstream from the CAT gene in the sense or the antisense orientation, respectively. QNR were transfected with 10 μ g of pP1NS (lane 1), pP1NAS (lane 2) and the promoterless vector pBLCAT5, (lane 3). 1 μ g of the pRSVCAT was used as a positive control (lane 4). 0.5 μ g of plasmid RSV β -gal were co-transfected with the CAT constructs as an internal control of transfection efficiency. (B) Expression of *Pax-QNR* promoters in QNR and QEC cells. The pP1NS or the P0 promoter, pXA (10 μ g), pRSVCAT (1 μ g) constructs were co-transfected with 0,5 μ g of pRSV β -gal into either QNR or QEC. The results shown are the averages of three separate experiments, with the standard deviations indicated by error bars.

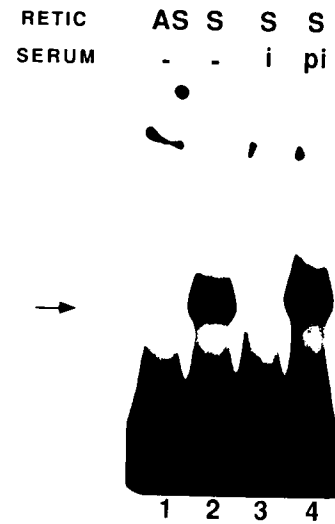
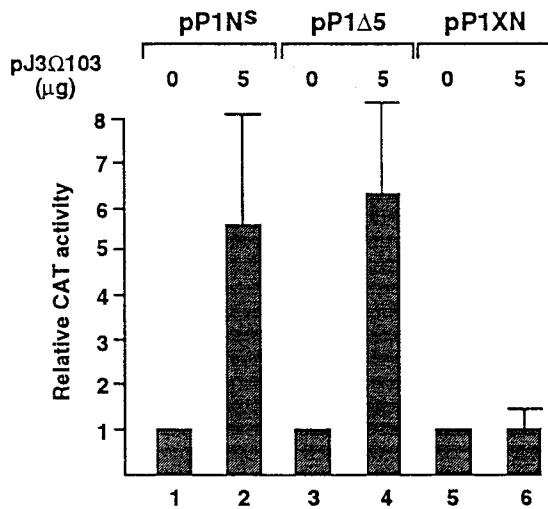
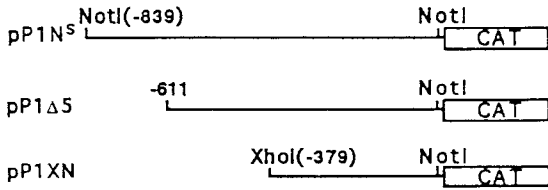
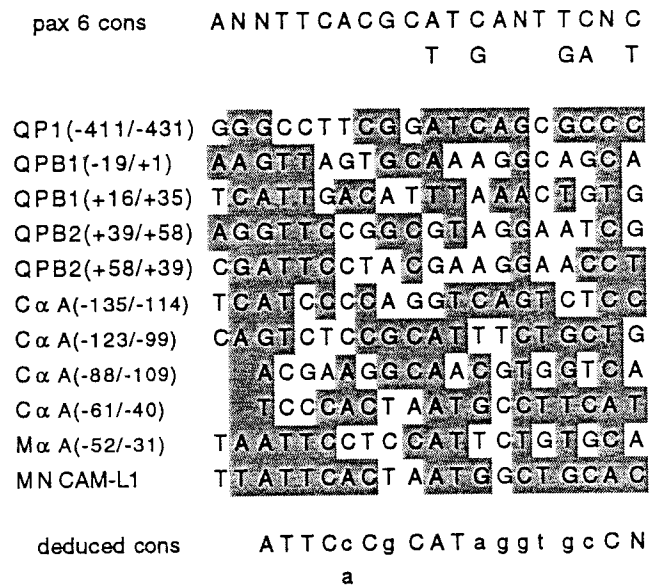
B**A****C**

Figure 4 : Activation of the P1 *Pax-QNR* promoter by the Pax-QNR protein. (A) Structure of the deleted CAT constructs, and analysis of their activation by Pax-QNR. QEC were transfected with 1 μ g of CAT constructs and 5 μ g of the pJ3 Ω 103 plasmid containing the MC29-QNR2 cDNA insert. The total amount of DNA in the transfection was kept constant by addition of the vector control, pJ3 Ω . The CAT activities were performed using equal amounts of proteins. (B) Gel retardation analysis of DNA fragments spanning the *Pax-QNR* promoter region required for Pax-QNR-dependent activation. The end-labelled 232 bp Δ 5-XhoI fragment (from -611 to -380) was incubated in the presence of *in vitro* translated Pax-QNR protein in the sense (S, lanes 2, 3 and 4) or antisense (AS, lane 1) orientation, supplemented or not (-) with antiserum directed against the carboxy-terminal part of the Pax-QNR gene products (i, lane 3) or preimmune serum (pi, lane 4). (C) Alignment of the Pax-QNR/Pax-6 recognition sequences in the P1 promoter (QP1), the P0 promoter (QPB1, QPB2, 25), the chicken α A-cristallin promoter (C α A, 10) the mouse α A-cristallin promoter (M α A, 9) and the mouse N CAM-L1 promoter (5). Uppercase letters indicate at least 54% conservation of each nucleotide; lowercase letters indicate at least 36% conservation of each nucleotide. Pax-6 cons refer to the paired-domain consensus binding site derived by the PCR-based selection (15).

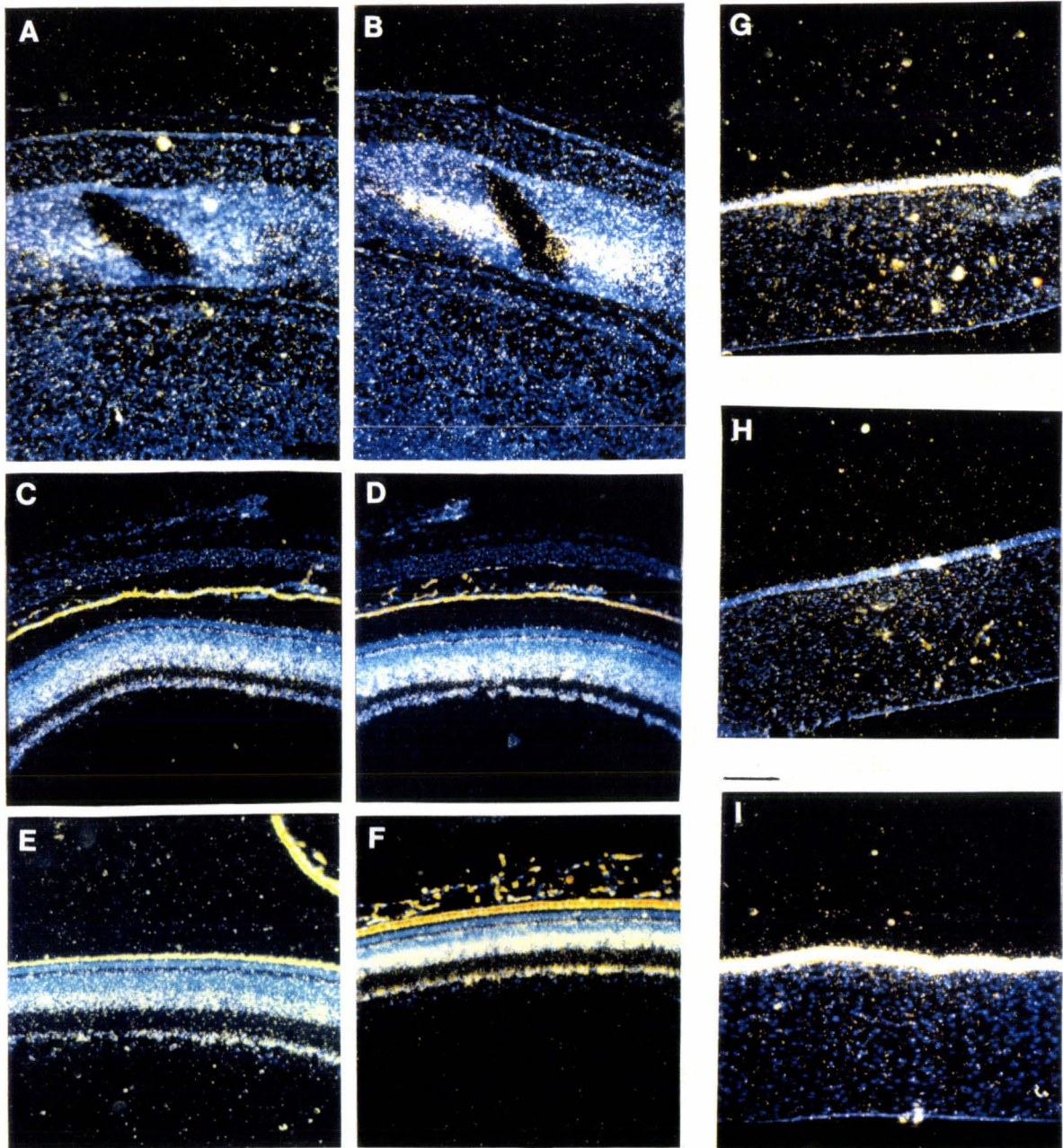


Figure 5 : Detection of P0- and P1-initiated *Pax-QNR* mRNAs by *in situ* hybridization in quail and chicken. (A) Hybridization of E3.5 transversal chicken section with a ^{35}S -labelled P0 antisense probe (encompassing exon 0). Bars : 125 μm . (B) Adjacent section hybridized with a ^{35}S -labelled P1 antisense probe (encompassing the extended exon 1). (C) Hybridization of E9 quail eye section with a P0 antisense probe. (D) Adjacent section hybridized with a P1 antisense probe. (E) Hybridization of E20 chicken eye section with a P0 antisense probe. (F) Adjacent section hybridized with a P1 antisense probe. (G) Hybridization of E20 chicken corneal section with a P0 antisense probe. (H) Adjacent section hybridized with a P0 sense probe as control. (I) Adjacent section hybridized with a P1 antisense probe.

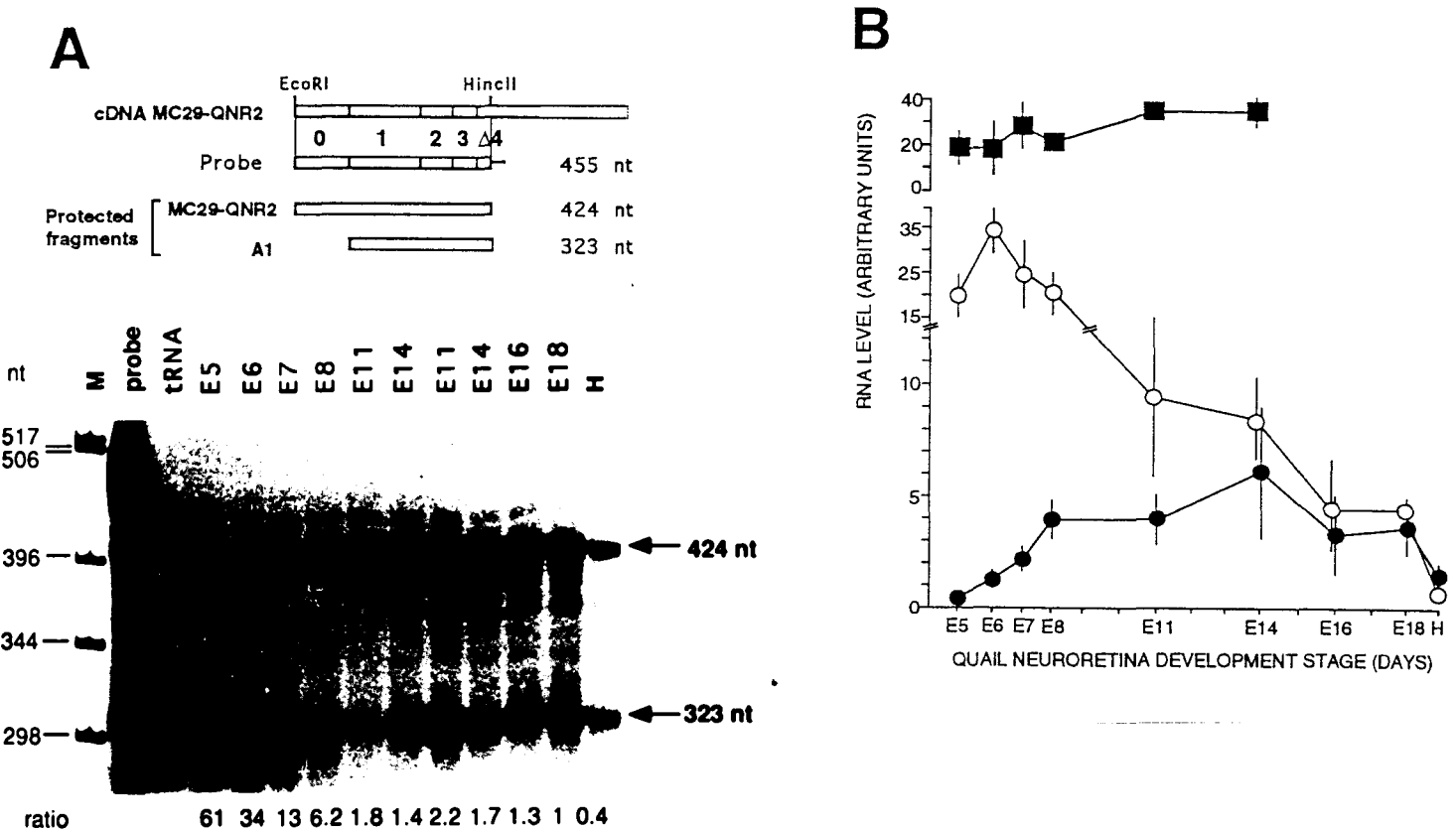


Figure 6 : Variations in the accumulation of P0- and P1-initiated Pax-QNR mRNAs during neuroretina development. (A) RNase protection experiments. The structure of the (32 P) cRNA probe and predicted fragments (open box) derived from MC29-QNR2 cDNA subcloned in a pGEM4 plasmid shown diagrammatically at the top of the figure. Bold line, linker sequence. The 424 nts fragment should detect the P0-initiated mRNAs whereas the 323 nts fragment will detect the P1-initiated messengers. 20 μ g of total RNA were used for each point. RNA were extracted from embryonic quail neuroretina dissected at indicated days, and after hatching, H. M, end-labelled HincII-digested pBR322. The intensity of the 323 and 424 nts fragments was measured by densitometry and the ratio of 323/424 fragment intensities is shown below each lane. (B) The intensity of each protected fragment shown in panel A, measured by densitometry was expressed in arbitrary units as the RNA level. As a control, the intensity of a GAPDH protected fragment was similarly measured. The results are the averages of three separate experiments until E14 and only two for late stages and GAPDH, with the standard deviations indicated by error bars. (■) GAPDH; (○) P1-initiated messengers; (●) P0-initiated messengers.

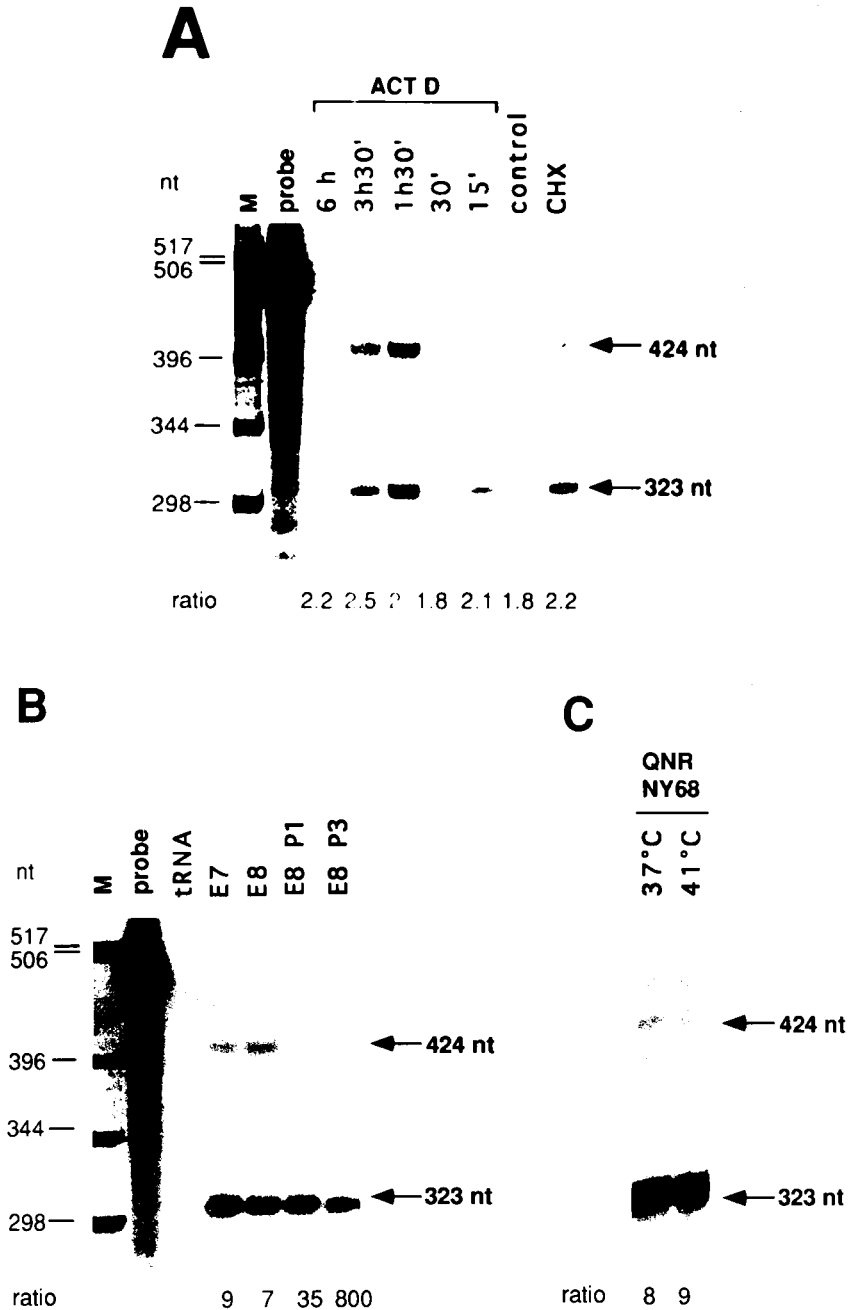


Figure 7 : Study the stability of P0- and P1-initiated Pax-QNR mRNAs in E8 neuroretina. (A) RNase protection experiment performed with 20 μ g of total RNA isolated from neuroretina treated 36 hours after plating as indicated on the top of the figure. (B) RNase protection experiment performed with RNA from neuroretina dissected from E7 or E8 quail embryos, or extracted after *in vitro* propagation. P1 refers to neuroretina after one passage, and P3 after three passages. (C) RNase protection experiment performed with RNA from neuroretina dissected from E7 quail embryos infected *in vitro* with the RSV tsNY68 virus passaged four times at 37°C. The transformed cells were then transferred at 41°C for two days, and extracted. The intensity of each protected fragment was measured by densitometry and the ratio of the 323/424 intensities indicated below each lane.

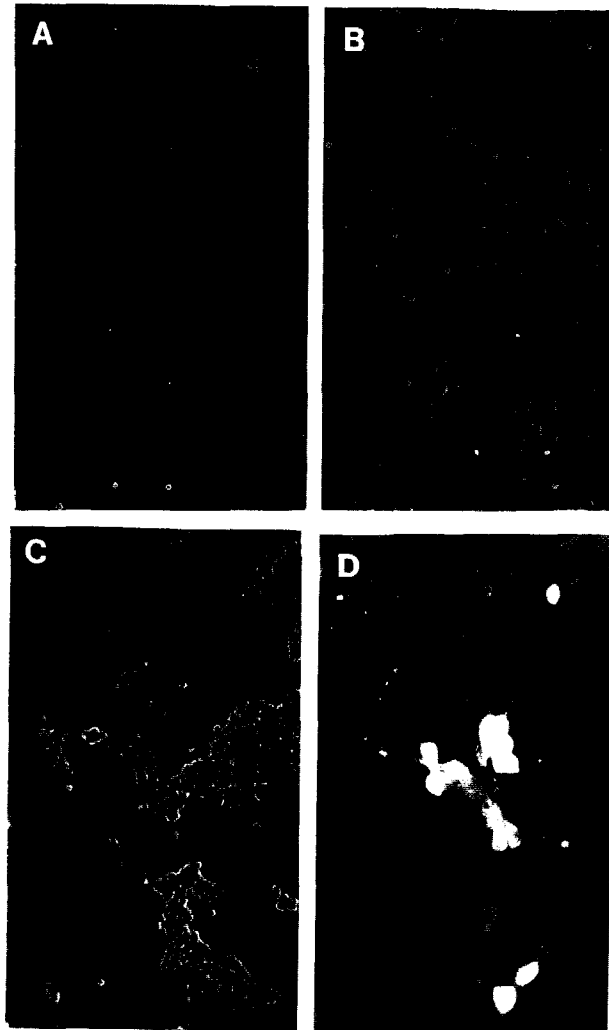


Figure 8 : Morphology of cultured RPE (A), MC29(RAV-1) transformed RPE (B), and MC29(RAV-1) transformed RPE exhibiting a neuronal phenotype (C). Anti-neuron-specific enolase immunoreactive proteins were detected on fixed RPE MC29(RAV-1) cells with fluorescein isothiocyanate-labelled swine anti-rabbit immunoglobulin as secondary reagent (D).

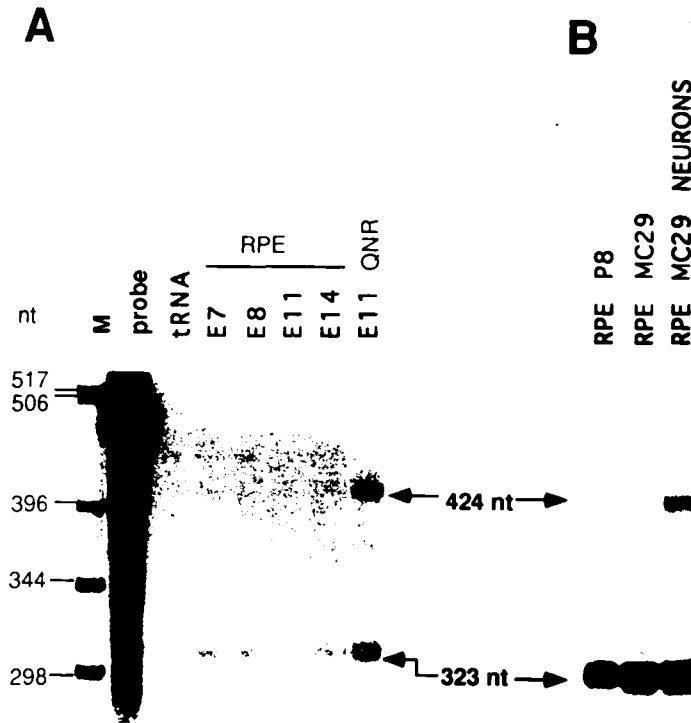


Figure 9 : Variations in accumulation of P0- and P1-initiated Pax-QNR mRNAs during retina pigmented epithelium development. (A) RNA were extracted from embryonic quail RPE dissected at indicated developmental stages, and as a control from E11 neuroretina. (B) RNase protection experiment performed with RNA isolated from cultured cells described in Fig. 8.

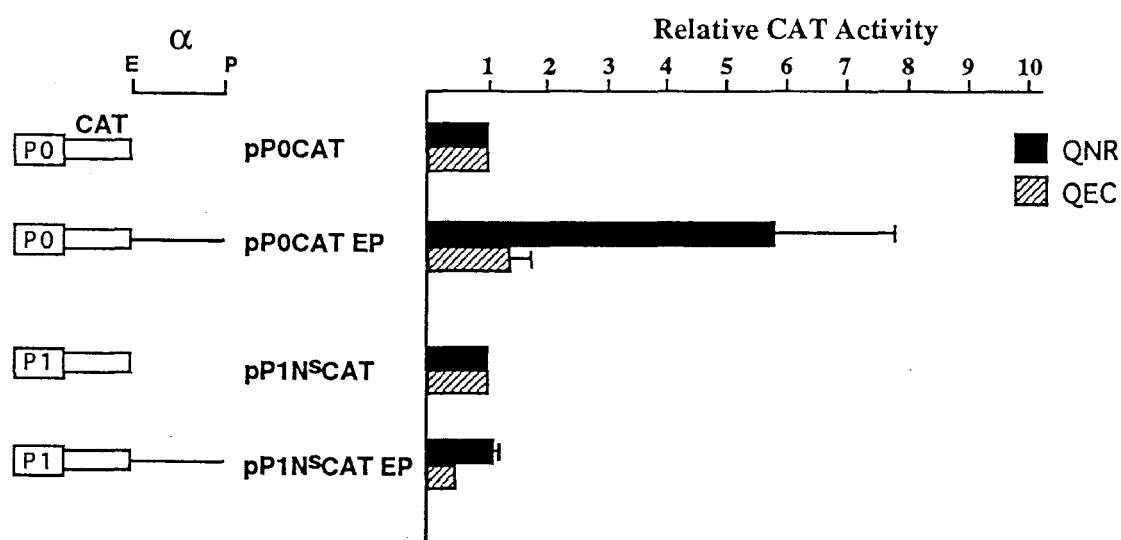


Figure 10 : Activity of a *Pax-QNR* neuroretina-specific enhancer element (26) on the two *Pax-QNR* promoters. The pP0CAT EP and pP1NSCAT EP contain the 460 bp EcoRV-PstI fragment inserted in the natural orientation, 3' to the CAT gene in plasmids pP0CAT (25) and pP1NSCAT, respectively. These plasmids were transiently transfected into QNR E7 and QEC and CAT activities were measured with an Instant Imager (Packard). CAT activities of the enhancer constructs are expressed relative to that for the parental plasmids. The PstI (P) and EcoRV (E) restriction enzyme sites used to generate the enhancer CAT constructs are marked. The results are the averages of three independent experiments performed in duplicate using two different DNA preparations, with the standard deviations indicated by error bars.

DISCUSSION

Afin d'étudier les mécanismes régissant le développement de l'œil, nous nous sommes intéressés au gène *Pax6/Pax-QNR*. Ce gène est spécifiquement exprimé dans cet organe et son importance au cours du développement est attestée par le fait que des mutations du gène *Pax6* sont responsables d'anomalies de développement de l'œil à l'état hétérozygote et d'une absence totale d'œil à l'état homozygote.

Rôle du facteur de transcription Pax-QNR

Nous avons montré que ce gène code un facteur de transcription, cependant le rôle que joue la protéine Pax-QNR dans le développement de l'œil est encore mal connu. En attendant l'identification des gènes cibles de ce facteur de transcription, quelques données préliminaires permettent de supposer :

- un rôle dans la différenciation : *Pax6* est en effet impliqué dans la régulation du gène codant la cristalline αA , protéine exprimée spécifiquement dans le cristallin (Cvekl *et al.* 1994, 1995).

- un rôle dans la migration cellulaire : le promoteur du gène codant la molécule d'adhésion cellulaire neuronale N-CAM L1 contient des sites de fixation pour le domaine paired de Pax6 (Chalepakis *et al.* 1994). Les molécules d'adhésion cellulaires sont particulièrement importantes pour les mécanismes d'adhésion et d'interaction cellulaires (pour revue voir Hynes et Lander 1992).

La démonstration d'un gène cible pour un facteur de transcription est en effet difficile à établir. Des outils performants sont à notre disposition pour réaliser les études *in vitro*, mais la réelle difficulté réside dans l'application et la généralisation de ces résultats pour les observations *in vivo*. La seule détermination de sites de fixation ou de modulation transcriptionnelle d'un promoteur obtenus *in vitro* constituent des éléments bien fragiles pour démontrer la relevance physiologique de ce mécanisme. Même si la co-expression du régulateur et du produit du gène cible sont montrées et que ce dernier est modulé par l'expression ectopique du régulateur *in vivo*, des questions restent entières. Est-ce que le mécanisme moléculaire

montré *in vitro* a effectivement lieu *in vivo*? Si oui, à quel moment, dans quel contexte et dans quelle cellule ?

Nous nous sommes intéressés à la régulation transcriptionnelle de ce gène qui présente une expression restreinte à quelques tissus et qui est régulée au cours du développement. L'isolement de gènes impliqués dans la régulation du gène *Pax-QNR* permettrait ainsi d'avoir accès à des gènes impliqués dans les processus de développement de la neurorétine.

Deux promoteurs dirigent l'expression du gène

Nous avons pu montrer que le gène possède deux régions de promotion distinctes (P0 et P1) à partir desquels sont initiés des ARNm susceptibles de coder des protéines identiques. Nous pouvons alors nous interroger sur le rôle respectif de chacun des promoteurs et de l'intérêt que peut apporter ce type de structure pour l'expression du gène. L'un des avantages réside dans le fait que chaque promoteur peut être soumis à des régulateurs différents. En effet, l'analyse des sites de fixation consensuels pour des facteurs de transcription présents dans les séquences promotrices révèle que le promoteur P0 pourrait être régulé par le facteur de transcription Krox24 alors que le promoteur P1 pourrait être régulé par des protéines de la famille POU. A ce propos, il est intéressant de noter que Pax6 est exprimé dans les rhombomères 3 et 5 chez la souris, zone d'expression de *Krox24* (Li *et al.* 1994 ; M.C.Langlois, résultats non publiés). De plus, des études d'expression *in toto* réalisées dans le laboratoire ont permis de montrer que les ARNm initiés au promoteur P0 sont effectivement exprimés dans les rhombomères 3 et 5 chez la caille (M.C. Langlois, résultats non publiés). L'étude de la régulation du gène *Pax-QNR* par la protéine Krox24 mériterait par conséquent d'être approfondie.

En ce qui concerne la régulation du promoteur P1, il est important de signaler que certaines protéines POU sont spécifiquement exprimés dans la rétine comme Brn3, ainsi que dans le tube neural (revue de Wegner *et al.* 1993). Enfin, l'avantage de posséder deux régions de promotion distinctes soumises à des régulateurs différents est illustré par le statut d'expression de *Pax-QNR* dans le pancréas et la rétine pigmentaire où aucune expression des ARNm initiés à

partir du promoteur P0 n'a pu être décelée alors que les ARNm initiés au promoteur P1 sont abondants.

Le promoteur P0 est induit au cours de la différenciation neuronale de la rétine pigmentaire

L'étude de l'expression des ARNm initiés au promoteur P0 et P1 au cours du développement de la neurorétine a permis de montrer que les deux promoteurs fonctionnent dans les mêmes couches cellulaires, et que les intensités relatives des ARNm initiés à chacun des promoteurs varient. En résumé, le taux des ARNm initiés au promoteur P1 est relativement constant alors que le taux des ARNm initiés au promoteur P0, très faible aux stades précoces, augmente fortement aux stades plus tardifs. De ces résultats découlent la conclusion que le promoteur P0 est un promoteur induit au cours du développement alors que le promoteur P1 peut être considéré comme constitutif au sein des territoires d'expression du gène *Pax-QNR*.

Les ARNm initiés à partir du promoteur P0 apparaissent en même temps que l'arrêt de prolifération cellulaire et la différenciation des neurones dans la neurorétine. De plus nous avons pu montrer que la *trans*-différenciation de la rétine pigmentaire en neurones s'accompagne également d'une expression des ARNm initiés au promoteur P0. Il est donc tentant d'imaginer P0 comme un promoteur inductible spécifiquement exprimé dans la différenciation neuronale. Comme chaque promoteur initie la synthèse d'ARNm codant les mêmes protéines (p46 et p32/33), ce mécanisme de régulation permettrait alors d'augmenter le taux intracellulaire des protéines Pax-QNR dans les neurones. Cette notion est importante car l'aspect semi-dominant de la mutation de ce gène chez la souris et chez l'homme suggère que les gènes cibles de Pax6 sont dépendants d'un effet dose de ce dernier pour leur régulation. Nous pouvons supposer que l'induction du promoteur P0 permet d'augmenter le taux des protéines Pax6/Pax-QNR et ainsi d'induire les cellules à s'engager dans un programme de différenciation.

Les protéines Pax-QNR réguleraient selon un mécanisme "dose-dépendant"

Nous pouvons alors nous interroger sur les mécanismes moléculaires qui vont générer cette diversité de réponse dépendante de la quantité de la protéine Pax-QNR. Des études réalisées chez la drosophile montrent que ce type de régulation dépend de la présence de plusieurs sites de fixations de basse affinité présents dans les séquences de régulation du gène (Jäckle 1994). Le taux d'activation obtenu est dépendant du nombre de sites présents, de leur affinité respective pour la protéine *trans*-activatrice, ainsi que de la concentration de cette protéine.

En ce qui concerne la protéine P46^{Pax-QNR}, nous avons montré que celle-ci régule positivement ses promoteurs (P0 et P1). L'étude du mécanisme d'autorégulation du gène *Pax-QNR* a permis de mettre en évidence plusieurs sites de fixation pour la protéine P46^{Pax-QNR} sur le promoteur P0, qui est sensible à la quantité de *trans*-activateur. Au niveau des régions de promotion des gènes cibles potentiels de la protéine Pax6 (N-CAM L1 et α A cristalline) (Cvekl *et al.* 1994 ; Chalepakis *et al.* 1994) plusieurs sites de fixations pour cette protéine sont également identifiés. Ces différents sites sont caractérisés par des dégénérescences de bases par rapport au consensus optimal pour la fixation établi par des expériences de polymérisation en chaînes (PCR)(discuté ultérieurement). Ces sites pourraient par conséquent correspondre à des sites de basse affinité. Il s'ensuit qu'il s'établira un équilibre en solution entre les protéines Pax6/Pax-QNR libres et celles liées à l'ADN, dépendant de l'affinité pour le site de reconnaissance et de la concentration en protéine présente en solution. Il est donc tout à fait envisageable que les gènes cibles soient sensibles à un effet dose de ce facteur par l'intermédiaire du nombre et de l'affinité des sites de fixation présents dans les régions de régulation.

Analyse des séquences de fixation de la protéine P46^{Pax-QNR}

Pour les protéines Pax1, Pax2, Pax3 et Pax6, les études de propriété de liaison à l'ADN des domaines paired et homéo ont été réalisées sur des séquences artificielles dérivées de la séquence e5 : séquence de fixation pour la protéine Paired de drosophile présente dans le

promoteur du gène *even-skipped* (Treisman *et al.* 1991 ; Chalepakis *et al.* 1991 ; Dozier *et al.* 1993 ; Fickenscher *et al.* 1993 ; Chalepakis *et al.* 1994). Ces séquences ne représentent pas les séquences physiologiques pour la fixation de ces différentes protéine.

La mise en évidence du mécanisme d'autorégulation nous a donc permis d'accéder à une séquence de fixation physiologique de la protéine Pax-QNR. Au sein du promoteur P0 nous avons identifié deux sites de fixation pour chacun des domaines paired et homéo de la protéine p46^{Pax-QNR} et nous avons notamment montré que les séquences de reconnaissance du domaine paired sont étendues et dégénérées. Le groupe de R. Maas (Epstein *et al.* 1994a) a déterminé la séquence optimale de fixation du domaine paired de Pax6 et les résultats obtenus aboutissent aux mêmes conclusions. En effet, le consensus dégagé qui contient peu de bases définies comme invariantes (voir article IV figure 4C) peut être muté ponctuellement sans affecter la fixation à l'ADN de la protéine Pax6. Les travaux réalisés dans le groupe de H. Busslinger (Czerny *et al.* 1993) confirment également que les séquences reconnues par le domaine paired des protéines Pax sont beaucoup plus étendues que le consensus de fixation GTTCC initialement décrit. Nous avons comparé le consensus de fixation établi par le groupe de R. Maas avec les différentes séquences de fixation décrites pour la protéine Pax6/Pax-QNR, issues des promoteurs de ses gènes cibles potentiels : le gène codant l' α A cristalline (Cvekl *et al.* 1994, 1995), le gène codant la NCAM-L1 (Chalepakis *et al.* 1994) et le gène *Pax-QNR* (article 1). Les séquences de fixation sont difficilement comparables entre elles et présentent des divergences plus ou moins importantes avec le consensus établi précédemment (voir article IV figure 4C). Il sera donc difficile de rechercher des gènes cibles sur le seul critère d'homologies de séquence avec la séquence optimale de fixation définie par Epstein *et al.* (1994a).

Le fait que le promoteur P0 contient des sites de fixation pour le domaine paired et homéo suggère que la protéine se fixe aux séquences promotrices par l'intermédiaire de ses deux domaines. Treisman *et al.* (1991) ont montrés que les domaines paired et homéo de la protéine Paired de drosophile agissent coopérativement pour la fixation à l'ADN sur la séquence e4 (présente dans le promoteur du gène *even-skipped*). Ces sites de fixation paired et homéo sont dégénérés par rapport aux sites de reconnaissance présents sur e5 et sont espacés de deux tours

d'hélice. Il est alors intéressant de noter qu'il en est de même pour les séquences de fixation paired et homéo présentes au sein du promoteur P0, ce qui permet également d'envisager un mécanisme de coopération entre les domaines paired et homéo pour la fixation de la protéine Pax-QNR sur ce promoteur.

Les régulateurs transcriptionnels du gène *Pax-QNR*

Nous avons montré qu'un contrôle transcriptionnel du gène *Pax-QNR* est en partie responsable de la différence d'expression observée entre la neurorétine et des cellules n'exprimant pas ce gène (cellules embryonnaires de caille : QEC ; rétine pigmentaire : RPE). Différents éléments (protéines Pax et Myb, séquence activatrice α) sont capables de moduler l'expression du/des promoteur(s) du gène *Pax-QNR* (FIGURE 33). La question qui découle de ces résultats concerne l'identification de tous les régulateurs transcriptionnels responsables de l'expression du gène *Pax-QNR* dans la neurorétine mais aussi de leur intervention au cours du temps.

Des études récentes montrent que certaines protéines Pax sont susceptibles de fixer et de réguler par l'intermédiaire de séquences identiques (Czerny *et al.* 1993 ; Glaser *et al.* 1994)). Par exemple, Pax2 est capable de réguler des séquences reconnues par Pax6 (Glaser *et al.* 1994). Il est alors concevable que *Pax6* soit régulé par d'autres protéines Pax. A ce propos il est intéressant de signaler que le gène *Pax2* est également exprimé dans la rétine (revue de Tremblay et Gruss 1994).

La présence de sites de fixation homéo au sein du promoteur permet également de suggérer que d'autres protéines à homéodomaine régulent le gène *Pax-QNR*. Beaucoup de protéines à homéodomains reconnaissent en effet les mêmes séquences d'ADN (Hoey et Levine 1988).

La mise en évidence d'un mécanisme d'autorégulation positive s'exerçant sur les deux promoteurs suggère que la protéine p46^{Pax-QNR} est un régulateur transcriptionnel de son gène. Durant le développement embryonnaire, dans la neurorétine deux phases d'expression du gène *Pax-QNR* peuvent être distinguées : une phase d'induction aux stades précoces (E5 à E8) et une

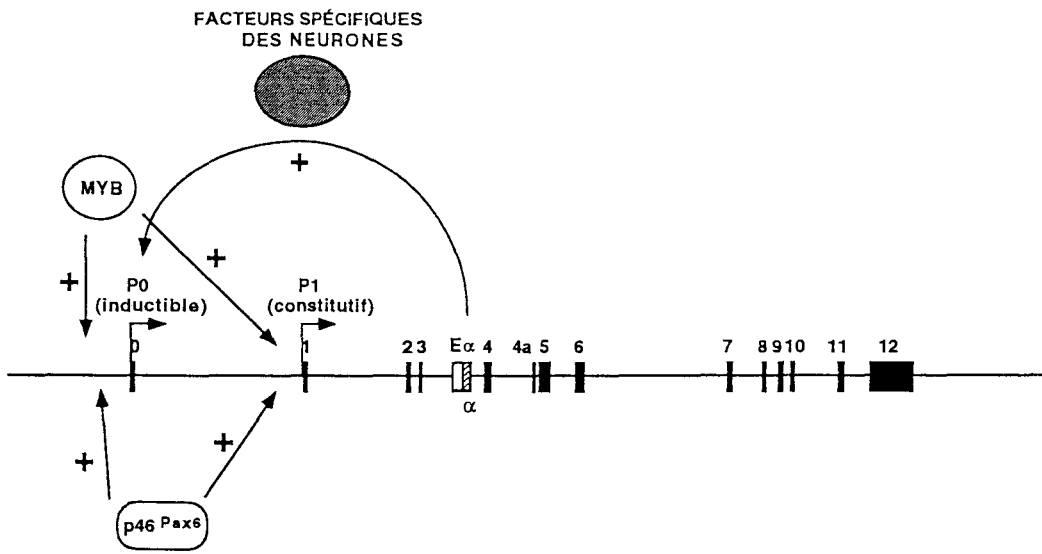


FIGURE 33 : Modèle de régulation du gène *Pax6*.

phase de maintien du taux d'expression (E8 à l'éclosion) (Martin *et al.* 1992 et article 4). Nous avons montré que le taux de stimulation du promoteur P0 induit par la protéine p46^{Pax-QNR} augmente proportionnellement en fonction de la quantité de *trans*-activateur appliqué (Article 1, Figure 3B canaux 4,5 et 6). Comme l'accumulation de la protéine p46^{Pax-QNR} suit celle des ARNm (Carrière 1995), il n'est peut être pas naïf de penser que le mécanisme d'autorégulation s'exerce dans la phase où l'accumulation de la protéine est maximale, phase de maintien du taux d'expression de ce gène. L'importance de ce mécanisme durant la phase précoce pourrait alors être négligeable : les promoteurs seraient en effet peu induits puisque la protéine p46^{Pax-QNR} n'est présente qu'en faible quantité. Une hypothèse inverse permet néanmoins d'envisager que ce mécanisme d'autorégulation prenne effet aux stades précoces et atteigne rapidement un plateau, la quantité de protéine p46^{Pax-QNR} étant en excès par rapport au promoteurs régulés.

Se pose alors le problème de connaître les (autres) facteurs responsables de l'induction du gène *Pax-QNR* aux stades précoces du développement de la neurorétine. La mise en évidence d'une part d'une co-expression du proto-oncogène *c-myb* et du gène *Pax-QNR* durant ces stades, d'autre part de l'effet de la protéine c-Myb sur l'activité des deux promoteurs du gène *Pax-QNR* suggèrent que cette protéine pourrait être un régulateur transcriptionnel du gène *Pax-QNR* lors du développement de la neurorétine. Il est intéressant de signaler que le proto-oncogène *c-myb* a déjà été associé à des événements de prolifération et de différenciation cellulaire dans des lignées hématopoïétiques et de neuroblastomes, l'extinction de son expression précédant les processus de différenciation (Quéva 1993). La possibilité que la protéine c-Myb soit un régulateur transcriptionnel du gène *Pax-QNR* dans la neurorétine élargit le spectre d'activité de cette protéine, jusque là restreint au système hématopoïétique. L'étude du mode d'action moléculaire de la protéine c-Myb a permis de mettre en évidence une activité régulatrice indépendante de la liaison à l'ADN, qui implique des séquences de fixation pour TBP particulières. En effet, la conversion de la boîte TATA du promoteur P0 en boîte TATA du promoteur SV40 abolit cette activité particulière de la protéine c-Myb. Ce mécanisme, précédemment décrit pour le promoteur du gène *HSP70* (Klempnauer *et al.* 1989 ; Foos *et al.* 1993) suggère que la protéine c-Myb est capable d'interagir spécifiquement avec les facteurs de transcription généraux. Une

interaction physique avec TBP serait envisageable, mais dans ce cas comment expliquer la nécessité d'une séquence TATA particulière? Une explication possible résiderait dans des changements conformationnels de TBP en fonction du type de séquence TATA fixée, qui auraient pour conséquence de masquer ou de dévoiler la zone d'interaction avec la protéine c-Myb. Une autre explication serait que la protéine c-Myb interagirait avec un facteur de transmission dont le recrutement autour de TBP dépendrait du type de séquence TATA. Toutefois, nous sommes en mesure d'établir que plusieurs types de séquence TATA sont sensibles à l'effet indirect de la protéine c-Myb puisque les promoteurs des gènes *HSP70*, P0 et P1 de *Pax-QNR* sont régulés suivant ce mécanisme et n'ont pas les mêmes séquences TATA.

Nous avons identifié au sein du gène *Pax-QNR* une séquence activatrice α , située 7,5 Kbp en aval du promoteur P0, qui régule spécifiquement ce promoteur et non le promoteur P1. L'activité de la séquence α est spécifique de la neurorétine et régulée au cours du développement puisqu'il est actif sur le promoteur P0 dans des QNR E7 alors qu'il est inactif dans des QNR E5. Puisque son activité est corrélée avec l'expression des ARNm initiés au promoteur P0 dans la neurorétine *in vivo*, l'activateur α pourrait jouer un rôle dans l'induction du gène *Pax-QNR* (promoteur P0) *in vivo* aux stades précoces du développement de la neurorétine. Dans ce cas, si comme nous le supposons, les ARNm initiés au promoteur P0 sont induits dans les neurones, il est tentant d'imaginer que les facteurs se fixant sur la séquence α sont des protéines neuronales. L'isolement de ces protéines permettra de les étudier et de vérifier leur implication dans les mécanismes de différenciation neuronale. Reste à comprendre comment fonctionne cet activateur. Le fait que l'activité de α s'exerce sur le promoteur P0 mais pas sur le promoteur P1 suggère que, outre les facteurs fixant la séquence α , des protéines additionnelles sont impliquées. Ces protéines pourraient permettre l'action de α sur le promoteur P0 en agissant comme co-activateurs et/ou au contraire empêcher l'action de α sur le promoteur P1 en agissant comme inhibiteurs. Dans les deux cas (co-activateur ou inhibiteur), ces protéines pourraient interagir directement avec les séquences du promoteur ou constituer un lien entre les facteurs de transcription spécifiques fixés sur l'activateur α et les composants de la machinerie

transcriptionnelle du promoteur (il s'agirait alors de TAFs). Dans ce cas, il est envisageable que des TAFs différentes soient recrutées par les deux promoteurs. Suite à l'observation d'une très grande homologie des séquences TATA présentes dans les promoteurs P0 et TK (tous deux induits par α) et différentes de celle du promoteur P1, nous avons envisagé la possibilité que l'activation transmise par α soit dépendante du type de boîte TATA. Nous avons interchangé la boîte TATA du promoteur P0 en boîte TATA du promoteur P1 afin de déterminer si la transmission de l'activation nécessite des séquences de fixation pour TFIID particulières comme nous l'avons montré pour Myb. Le promoteur P0 muté est toujours activé par α , ce qui suggère que le contexte des séquences environnantes est essentiel. Il faudrait alors recourir à de la mutagenèse aléatoire sur le promoteur afin d'identifier les éléments *cis* impliqués dans l'interaction avec la séquence α . A cinq jours de développement embryonnaire l'activateur α ne fonctionne pas, bien que des interactions de protéines avec la séquence α soient visualisées (quoique plus faibles). Ceci signifie soit que les facteurs se fixant sur α ne sont pas assez abondant pour activer le promoteur P0, soit ils ne sont pas fonctionnels, soit les protéines accessoires (TAFs) sont manquantes ou non fonctionnelles. La dernière hypothèse, la plus simple, consisterait à ce que l'absence relative d'activité de la séquence α dans ces cellules soit liée au très faible nombre de cellules différenciées dans lesquelles, prise individuellement, la séquence α fonctionnerait. La neurorétine est un tissu, donc caractérisée par la présence de plusieurs types cellulaires. L'activité CAT mesurée après transfection ne permet pas de distinguer les cellules dans lesquelles α fonctionne de celles où α ne fonctionne pas. Il n'y aurait alors que lorsque le nombre de cellules différenciées augmenterait en nombre suffisant (E7) que l'activité de α deviendrait décelable.

L'activateur α caractérisé révèle une structure assez complexe. Il est constitué de quatre modules différents répartis sur 210 paires de bases fixant des facteurs identiques ou apparentés. Chaque module fixe plusieurs protéines. Nous n'avons pas encore identifié chaque composant protéique. L'analyse de la séquence nucléotidique de chaque module et sa comparaison avec les sites de fixation de facteurs de transcription connus permet néanmoins d'envisager l'intervention de facteurs de transcription de type POU, HMG (pour High Mobility Group) et ATF/CREB. La

détermination de ces facteurs pourra être abordée en étudiant plus précisément les séquences nucléotidiques responsables de la fixation de chaque facteur. L'intervention de chacun de ces facteurs s'avère intéressante à approfondir. Certains membres de la famille POU sont spécifiquement exprimés dans la rétine et le système nerveux central (revue de Wegner *et al.* 1993). Les membres de la famille ATF/CREB sont les agents terminaux de la voie d'activation dépendante de la protéine kinase A, voie très utilisée et importante dans les neurones (revue de Frank et Greenberg 1994). Enfin, les protéines HMG sont suspectées jouer un rôle structural dans l'organisation spatiale de l'amplificateur en provoquant des courbures d'ADN qui permettraient le rapprochement des facteurs de transcription spécifiques entre eux, et aussi avec les TAFs (Giese et Grosschedl 1993 ; Carlson *et al.* 1993).

En conclusion, l'étude structurale et fonctionnelle des promoteurs du gène *Pax-QNR* nous a permis non seulement de mettre en évidence une expression complexe et subtile de ce gène mais aussi de fournir des pistes d'investigation concernant son rôle ainsi que sa régulation transcriptionnelle.

RÉFÉRENCES

- Abate, C., L. Patel, F. J. Rauscher III and T. Curran.** (1990). Redox regulation of Fos and Jun DNA-binding activity *in vitro*. *Science*, **249**, 1157-1161.
- Adams, B., P. Dörfler, A. Aguzzi, Z. Kozmik, P. Urbànek, I. Maurer-Fogy and M. Busslinger.** (1992). *Pax5* encodes the transcription factor BSAP and is expressed in B lymphocytes, the developing CNS, and adult testis. *Genes & Dev.*, **6**, 1589-1607.
- Alkalay, I., A. Yaron, A. Hatzubai, S. Jung, A. Avraham, O. Gerlitz, I. Pashut-Lavon, and Y. Ben-neriah.** (1995). In vivo stimulation of I κ B phosphorylation is not sufficient to activate NF- κ B. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 1294-1301.
- Adler, R.** (1993). Plasticity and differentiation of retinal precursor cells. *Int. Rev. Cytol.*, **146**, 145-190.
- Almouzni, G., M. Méchali and A. P. Wolffe.** (1991). Transcription complex disruption caused by a transition in chromatin structure. *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 655-665.
- Almouzni, G. and A. P. Wolffe.** (1993). Replication-coupled chromatin assembly is required for the repression of basal transcription *in vivo*. *Genes & Dev.*, **7**, 2033-2047.
- Amouyel, P., V. Laudet, P. Martin, R. Li, B. Quatannens, D. Stéhelin and S. Saule.** (1989). Two nuclear oncogenic proteins, P135^{gag-myb-ets} and p61/63^{myc}, cooperate to induce transformation of chicken neuroretina cells. *J. Virol.*, **63**, 3382-3388.
- Anathan, J., R. Baler, D. Morrissey, J. Zuo, Y. Lan, M. Weir and R. Voellmy.** (1993). Synergistic activation of transcription is mediated by the N-terminal domain of *Drosophila* fushi tarazu homeoprotein and can occur without DNA binding by the protein. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 1599-1609.
- Anderson, W. F., D. H. Ohlendorf, Y. Takeda and B. W. Matthews.** (1981). Structure of the cro repressor from bacteriophage λ and its interaction with DNA. *Nature*, **290**, 754-758.
- Angel, P. and M. Karin.** (1991). The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim. Biophys. Acta*, **1072**, 129-157.
- Angrand, P.-O.** (1993). Les domaines de liaison de l'ADN des facteurs de transcription eucaryotes. *m/s*, **9**, 725-736.
- Aso, T., H. Serizawa, R. Conaway and J. Conaway.** (1994). A TATA sequence-dependent transcriptional repressor activity associated with mammalian transcription factor IIA. *EMBO J.*, **13**, 435-445.
- Assa-Munt, N., R. J. Mortishire-Smith, R. Aurora, W. Herr and P. E. Wright.** (1993). The solution structure of the Oct-1 POU-specific domain reveals a striking similarity to the bacteriophage λ repressor DNA-binding domain. *Cell*, **73**, 193-205.
- Bach, I. and M. Yaniv.** (1993). More potent transcriptional activators or a transdominant inhibitor of the HNF-1 homeoprotein family are generated by alternative RNA processing. *EMBO J.*, **12**, 4229-4242.
- Balling, R., U. Deutsch and P. Gruss.** (1988). *undulated*, a mutation affecting the development of the mouse skeleton, has a point mutation in the paired box of *Pax 1*. *Cell*, **55**, 531-535.

- Barberis, A., K. Widenhorn, L. Vitelli and M. Busslinger.** (1990). A novel B-cell lineage-specific transcription factor present at early but not late stages of differentiation. *Genes & Dev.*, **4**, 849-859.
- Bechade, C., B. Calothy, B. Pessac, P. Martin, J. Coll, F. Denhez, S. Saule, J. Ghysdael and D. Stéhelin.** (1985). Induction of proliferation of transformation of neuroretina cells by the *mil* and *myc* viral oncogenes. *Nature*, **316**, 559-562.
- Benezra, R., R. L. Davis, D. Lockshon, D. L. Turner and H. Weintraub.** (1990). The protein Id : a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell*, **61**, 49-59.
- Benezra, R.** (1994). An intermolecular disulfide bond stabilized E2A homodimers and is required for DNA binding at physiological temperatures. *Cell*, **79**, 1057-1067.
- Bengal, E., L. Ransone, R. Scharfmann, V. J. Dwarki, S. J. Tapscott, H. Weintraub and I. M. Verma.** (1992). Functional antagonism between c-Jun and MyoD proteins : a direct physical association. *Cell*, **68**, 507-519.
- Berger, S., W. Cress, A. Cress, S. Triezenberg and L. Guarente.** (1990). Selective inhibition of activated but not basal transcription by the acidic activation domain of VP16 : Evidence for transcriptional adaptors. *Cell*, **61**, 1199-1208.
- Blackwood, E. M., B. Lüscher and R. N. Eisenman.** (1992). Myc and Max associate *in vivo*. *Genes & Dev.*, **6**, 71-80.
- Bopp, D., M. Burri and S. Baumgartner.** (1986). Conservation of a large protein domain in the segmentation gene *paired* and in functionally related genes of *Drosophila*. *Cell*, **47**, 1033-1040.
- Boyle, W. J., T. Smeal, L. H. K. Defize, P. Angel, J. R. Woodgett, M. Karin and T. Hunter.** (1991). Activation of protein kinase C decreases phosphorylation of c-Jun sites that negatively regulate its DNA-binding activity. *Cell*, **64**, 573-584.
- Brent, J. and P. Ptashne.** (1985). A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a procaryotic repressor. *Cell*, **43**, 729-736.
- Bresnik, E. H., M. Bustin, V. Marsaud, H. Richard-Foy and G. L. Hager.** (1992). The transcriptionally-active MMTV promoter is depleted of histone H1. *Nucl. Acids Res.*, **20**, 273-278.
- Buratowski, S., S. Hahn, L. Guarente and P. A. Sharp.** (1989). Five intermediate complexes in transcription initiation by RNA polymerase II. *Cell*, **56**, 549-561.
- Buratowski, S. and H. Zhou.** (1992). Transcription factor IID mutants defective for interaction with transcription factor IIA. *Science*, **255**, 1130-1132.
- Buratowski, S.** (1994). The basics of basal transcription by RNA polymerase II. *Cell*, **77**, 1-3.
- Burk, O., S. Mink, M. Ringwald and K.-H. Klempnauer.** (1993). Synergistic activation of the chicken *mim-1* gene by *v-myb* and C/EBP transcription factors. *EMBO J.*, **12**, 2027-2038.
- Calothy, G., F. Poirier, G. Dambrine, P. Mignatti, P. Combes and B. Pessac.** (1980). Expression of viral oncogenes in differentiating chick embryo neuroretinal cells infected with avian tumor viruses. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **44**, 983-990.

- Carcamo, J., L. Buckbinder and D. Reinberg.** (1991). The initiator directs the assembly of a transcription factor IID-dependent transcription complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 8052-8056.
- Carlsson, P., M. L. Waterman and K. A. Jones.** (1993). The hLEF/TCF-1 α HMG protein contains a context-dependent transcriptional activation domain that induces the TCR α enhancer in T. cells. *Genes & Develop.*, **7**, 2418-2430.
- Carrière, C., S. Plaza, P. Martin, B. Quatannens, M. Bailly, D. Stéhelin and S. Saule.** (1993). Characterization of quail Pax-6 (Pax-QNR) proteins expressed in the neuroretina. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 7257-7266.
- Carrière, C.** (1995). *PaxQNR/Pax-6*, un gène essentiel pour la formation des yeux: structure et expression dans la neurorétine d'oiseau., Thèse de l' Université des Sciences et Technologies de Lille.
- Chalepakis, G., R. Fritsch, H. Fickenscher, U. Deutsch, M. Goulding and P. Gruss.** (1991). The molecular basis of the *undulated/Pax-1* mutation. *Cell*, **66**, 873-884.
- Chalepakis, G., M. Goulding, A. Read, T. Strachan and P. Gruss.** (1994a). Molecular basis of splotch and Waardenburg *Pax-3* mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 3685-3689.
- Chalepakis, G., J. Wijnholds, P. Giese, M. Schachner and P. Gruss.** (1994b). Characterization of Pax-6 and Hoxa-1 binding to the promoter region of the neural cell adhesion molecule L1. *DNA & Cell Biol.*, **13**, 891-900.
- Chalepakis, G., F. S. Jones, G. M. Edelman and P. Gruss.** (1994c). Pax-3 contains domains for transcription activation and transcription inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 12745-12749.
- Chan, S.-K., L. Jaffe, M. Capovilla, J. Botas and R. S. Mann.** (1994). The DNA binding specificity of Ultrabithorax is modulated by cooperative interactions with Extradenticle, another homeoprotein. *Cell*, **78**, 603-615.
- Chen, J. D. and V. Pirrotta.** (1993). Multimerization of the *Drosophila zeste* protein is required for efficient DNA binding. *EMBO J.*, **12**, 2075-2083.
- Chen, J.-L., C. Attardi, C. Verrijzer, K. Yokomori and R. Tjian.** (1994). Assembly of recombinant TFIID reveals differential coactivator requirements for distinct transcriptional activators. *Cell*, **79**, 93-105.
- Chen, H., b. Li and J. L. Workman.** (1994). A histone-binding protein, nucleoplasmin, stimulates transcription factor binding to nucleosome and factor-induced nucleosome disassembly. *EMBO J.*, **13**, 380-390.
- Chesnut, J. D., J. H. Stephens and M. E. Dahmus.** (1992). The interaction of RNA polymerase II with the adenovirus-2 major late promoter is precluded by phosphorylation of the C-terminal domain of subunit IIa. *J. Biol. Chem.*, **267**, 10500-10506.
- Chiu, R., P. Angel and M. Karin.** (1989). Jun-B differs in its biological properties from, and is a negative regulator of, c-Jun. *Cell*, **59**, 979-986.
- Ciechnover, A.** (1994). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell*, **79**, 13-21.

- Conaway, R. and J. Conaway.** (1994). General initiation factors for RNA polymerase II. *Ann. Rev. Biochem.*, **62**, 161-190.
- Corden, J. L.** (1993). RNA polymerase II transcription cycles. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **3**, 213-218.
- Cortes, P., O. Florres and D. Reinberg.** (1992). Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II : purification and analysis of transcription factor IIA and identification of transcription factor III. *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 413-421.
- Courey, A. J. and R. Tjian.** (1988). Analysis of Sp1 in vivo reveals multiple transcriptional domains, including a novel glutamine-rich activation motif. *Cell*, **55**, 887-898.
- Cowell, I. G.** (1994). Repression versus activation in the control of gene transcription. *TIBS*, **19**, 38-42.
- Cress, W. D. and S. J. Triezenberg.** (1991). Critical structural elements of the VP16 transcriptional activation domain. *Science*, **251**, 87-90.
- Crisanti-Combes, P., A. Privat, B. Pessac and G. Calothy.** (1977). Differentiation of chick embryo neuroretina cells in monolayer cultures. An ultrastructural study. I. Seven day retina. *Cell Tissue Res.*, **185**, 159-173.
- Cullen, K., M. P. Kladde and M. A. Seyfred.** (1993). Interaction between transcription regulatory regions of prolactin chromatin *Science*, **261**, 203-206.
- Cvekl, A., C. M. Sax, E. H. Bresnick and J. Piatigorsky.** (1994). A Complex array of positive and negative elements regulates the chicken α A-Crystallin gene: involvement of Pax-6, USF, CREB and/or CREM, and AP-1 proteins. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 7363-7376.
- Cvekl, A., F. Kashanchi, C. M. Sax, J. N. Brady and J. Piatigorsky.** (1995). Transcriptional regulation of the mouse α A-crystallin gene : activation dependent on a cyclic AMP-responsive element (DE1/CRE) and a Pax-6 binding site. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 653-660.
- Czerny, T., G. Schaffner and M. Busslinger.** (1993). DNA sequence recognition by Pax proteins: bipartite structure of the paired domain and its binding site. *Genes & Dev.*, **7**, 2048-2061.
- Davis, R. L., H. Weintraub and A. B. Lassar.** (1987). Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell*, **51**, 897-1000.
- de Groot, R. P., J. den Hertog, J. R. Vandenheede, J. Goris and P. Sassone-Corsi.** (1993). Multiple and cooperative phosphorylation event regulate the CREM activator function. *EMBO J.*, **12**, 3903-3911.
- de Groot, R. P., L. M. Ballou and L. M. Sassone-Corsi.** (1994). Positive regulation of the cAMP-responsive activator CREM by the p70 S6 kinase : an alternative route to mitogen-induced gene expression. *Cell*, **79**, 81-91.
- Dekker, N., M. Cox, R. Boelens, C. P. Verrijzer, P. C. Van Der Vliet and R. Kaptein.** (1993). Solution structure of the POU-specific DNA-binding domain of Oct-1. *Nature*, **362**, 852-855.
- Deng, T. and M. Karin.** (1993). JunB differs from c-Jun in its DNA-binding and dimerization domains, and represses c-Jun by formation of inactive heterodimers. *Genes & Dev.*, **7**, 479-490.

- Donaldson, L. W., J. M. Petersen, B. J. Graves and L. M. McIntosh.** (1994). Secondary structure of the ETS domain places murine Ets-1 in the superfamily of winged helix-turn-helix DNA-binding proteins. *Biochemistry*, **33**, 13509-13516.
- DiDonato, J.A., F. Mercurio, and M. Karin.** (1995). Phosphorylation of I κ B α precedes but is not sufficient for its dissociation from NF- κ B. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 1302-1311.
- Dozier, C., C. Carrière, D. Grévin, P. Martin, B. Quatannens, D. Stéhelin and S. Saule.** (1993). Structure and DNA-binding properties of *Pax-QNR*, a paired box- and homeobox-containing gene. *Cell Growth & Differ.*, **4**, 281-289.
- Drapkin, R., A. Sancar and D. Reinberg.** (1994). Where transcription meets repair. *Cell*, **77**, 9-12.
- Dressler, G. R., J. E. Wilkinson, U. W. Rothenpieler, L. T. Patterson, L. Silliams-Simons and H. Westphal.** (1993). Deregulation of *Pax-2* expression in transgenic mice generates severe kidney abnormalities. *Nature*, **362**, 65-67.
- Du, H., A. L. Roy and R. G. Roeder.** (1993). Human transcription factor USF stimulates transcription through the initiator elements of the HIV-1 and the Ad-M1 promoters. *EMBO J.*, **12**, 501-511.
- Dynlacht, B., R. Weinzierl, A. Admon and R. Tjian.** (1993). The dTAFII80 subunit of *Drosophila* TF_{II}D contains β -transducin repeats. *Nature*, **363**, 176-179.
- Edwards, R. B., A. J. Adler, S. Dev and R. C. Claycomb.** (1992). Synthesis of retinoic acid from retinol by cultured rabbit Müller cells. *Exp. Eye Res.*, **54**, 481-490.
- Eguchi, G. and R. Kodama.** (1993). Transdifferentiation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **5**, 1023-1028.
- Ekker, S. V., D. G. Jackson, D. P. von Kessler, B. I. Sun, K. E. Young and P. A. Beachy.** (1994). The degree of variation in DNA sequence recognition among four *Drosophila* homeotic proteins. *EMBO J.*, **13**, 3551-3560.
- Ellenberger, T. E., C. J. Brandl, K. Struhl and S. C. Harrison.** (1992). The GCN4 basic region leucine zipper binds DNA as a dimer of uninterrupted α helices : crystal structure of the protein-DNA complex. *Cell*, **71**, 1223-1237.
- Ellenberger, T., D. Fass, M. Arnaud and S. C. Harison.** (1994). Crystal structure of transcription factor E47 : E-box recognition by a basic region helix-loop-helix dimer. *Genes & Dev.*, **8**, 970-980.
- Epstein, D. J., M. Vekemans and P. Gros.** (1991). *splotch* (*Sp^{2H}*), a mutation affecting development of the mouse neural tube, shows a deletion within the paired homeodomain of *Pax-3*. *Cell*, **67**, 767-774.
- Epstein, J., J. Cai, T. Glaser, L. Jepeal and R. Maas.** (1994a). Identification of A *Pax* Paired domain recognition sequence and evidence for DNA-dependent conformational changes. *J. Biol. Chem.*, **269**, 8355-8361.
- Epstein, J. A., T. Glaser, J. Cai, L. Jepeal, D. S. Walton and R. L. Maas.** (1994b). Two independent and interactive DNA-binding subdomains of the Pax6 paired domain are regulated by alternative splicing. *Genes & Dev.*, **8**, 2022-2034.

- Faisst, S. and S. Meyer.** (1992). Compilation of vertebrate-encoded transcription factors. *Nucl. Acids Res.*, **20**, 3-26.
- Ferré-D'Amaré, A. R., G. C. Prendergast, E. B. Ziff and S. K. Burley.** (1993). Recognition by Max of its cognate DNA through a dimeric b/HLH/Z domain. *Nature*, **363**, 38-44.
- Ferré-D'Amaré, A. R., P. Pognonec, R. G. Roeder and S. K. Bulery.** (1994). Structure and function of the b/HLH/Z domain of USF. *EMBO J.*, **13**, 180-189.
- Fickenscher, H. R., G. Chalepakis and P. Gruss.** (1993). Murine Pax-2 protein is a sequence-specific *Trans*-activator with expression in the genital system. *DNA & Cell Biol.*, **12**, 381-391.
- Fitzpatrick, V. D., A. Percival-Smith, C. J. Ingles and H. M. Krause.** (1992). Homeodomain-independent activity of the *fushi tarazu* polypeptide in *Drosophila* embryos. *Nature*, **356**, 610-612.
- Flores, O., H. Lu, M. Killeen, J. Greenblatt, Z. Burton and D. Reinberg.** (1991). The small subunit of transcription factor IIF recruits RNA polymerase II into the preinitiation complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 9999-10003.
- Flores, O., H. Lu and D. Reinberg.** (1992). Factors involved in specific transcription initiation by RNA polymerase II : Identification and characterization of factor IIIH. *J. Biol. Chem.*, **267**, 2786-2793.
- Foos, G., S. Natour and K.-H. Klempnauer.** (1993). TATA-box dependent trans-activation of the human HSP70 promoter by Myb proteins. *Oncogene*, **8**, 1775-1782.
- Foulkes, N. S. and P. Sassone-Corsi.** (1992). More is better : activators and repressors from the same gene. *Cell*, **68**, 411-414.
- Frank, D. A. and M. E. Greenberg.** (1994). CREB : a mediator of long-term memory from mollusks to mammals. *Cell*, **79**, 5-8.
- Garrido, C., D. Leprince, J. S. Lipsick, D. Stéhelin, D. Gospodarowicz and S. Saule.** (1992a). Definition of functional domains in P135^{gag-myb-ets} and p48^{v-myb} proteins required to maintain the response for neuroretina cells to basic fibroblast growth factor. *J. Virol.*, **66**, 160-166.
- Garrido, C., F. Grässer, J. S. Lipsick, D. Stéhelin and S. Saule.** (1992b). Protein truncation is not required for *c-myb* proto-oncogene activity in neuroretina cells. *J. Virol.*, **66**, 6773-6776.
- Garrido, C., R. P. LI, J. Samarut, D. Gospodarowicz and S. Saule.** (1993a). *v-erbA* cooperates with bFGF in neuroretina cell transformation. *Virology*, **192**, 578-586.
- Garrido, C., S. Plaza, D. Gospodarowicz and S. Saule.** (1993b). Fos expression induces growth arrest in tumorigenic neuroretina cells. *Oncogene*, **8**, 2713-2719.
- Gégonne, A., R. Bosselut, R.-A. Bailly and J. Ghysdael.** (1993). Synergistic activation of the HTLV1 LTR Ets-responsive region by transcription factors Ets1 and Sp1. *EMBO J.*, **12**, 1169-1178.
- Giese, K. and R. Grosschedl.** (1993). LEF-1 contains an activation domain that stimulates transcription only in a specific context of factor-binding sites. *EMBO J.*, **12**, 4667-4676.

- Gill, G., E. Pascal, Z. H. Tseng and R. Tjian.** (1994). A glutamine-rich hydrophobic patch in transcription factor Sp1 contacts the dTAF_{II}110 component of the *Drosophila* TFIID complex and mediates transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 192-196.
- Gius, D., X. Cao, F. J. Rauscher, D. R. Cohe, T. Curran and V. P. Sukhatme.** (1990). Transcriptional activation and repression by Fos are independent functions : the C terminus represses immediate-early gene expression via CArG elements. *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 4243-4255.
- Glaser, T., D. S. Walton and R. L. Maas.** (1992). Genomic structure, evolutionary conservation and aniridia mutations in the human *PAX6* gene. *Nature genet.*, **2**, 232-239.
- Glaser, T., L. Jepeal, J. G. Edwards, S. R. Young, J. Favor and R. L. Maas.** (1994). *PAX6* gene dosage effect in a family with congenital cataracts, aniridia, anophthalmia and central nervous system defects. *Nature Genet.*, **7**, 463-471.
- Glass, C. K., J. M. Holloway, O. V. Devary and M. G. Rosenfeld.** (1988). The thyroid hormone receptor binds with opposite transcriptional effects to a common sequence motif in thyroid hormone and estrogen response elements. *Cell*, **54**, 313-323.
- Glass, C. K., S. M. Lipkin, O. V. Devary and M. G. Rosenfeld.** (1989). Positive and negative regulation of gene transcription by a retinoic acid-thyroid hormone receptor heterodimer. *Cell*, **59**, 697-708.
- Glass, C. K., O. V. Devary and M. G. Rosenfeld.** (1990). Multiple cell type-specific proteins differentially regulate target sequence recognition by the α retinoic acid receptor. *Cell*, **63**, 729-738.
- Glover, J. N. M. and S. C. Harrison.** (1995). Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-c-Jun bound to DNA. *Nature*, **373**, 257-261.
- Gondie, B. G. and M. R. Capecchi.** (1994). Mice with targeted disruptions in the paralogous genes *hoxa-3* and *hoxd-3* reveal synergistic interactions. *Nature*, **370**, 304-307.
- Goodrich, J., T. Hoey, C. Thut, A. Admon and R. Tjian.** (1993). *Drosophila* TAF_{II}40 interacts with both a VP16 activation domain and the basal transcription factor TFIIB. *Cell*, **75**, 519-530.
- Goodrich, J. and R. Tjian.** (1994a). Transcription factors IIE and IIH and ATP hydrolysis direct promoter clearance by RNA polymerase II. *Cell*, **77**, 145-156.
- Goodrich, J. and R. Tjian.** (1994b). TBP-TAF complexes : selectivity factors for eukaryotic transcription. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **6**, 403-409.
- Grossi, M., A. Calconi and F. Tatò.** (1991). *v-jun* oncogene prevents terminal differentiation and suppresses muscle-specific gene expression in ASV-17-infected muscle cells. *Oncogene*, **6**, 1767-1773.
- Gruda, M. C., K. Kovary, R. Metz and R. Bravo.** (1994). Regulation of Fra-1 and Fra-2 phosphorylation differs during the cell cycle of fibroblasts and phosphorylation *in vitro* by MAP kinase affects DNA binding activity. *Oncogene*, **9**, 2537-2547.
- Ha, I., S. Robert, E. Maldonado, X. Sun, M. Green and D. Reinberg.** (1993). Multiple functional domains of human transcription factor IIB. Distinct interactions with two general transcription factors and RNA polymerase II. *Genes & Dev.*, **7**, 1021-1032.



- Hai, T. and T. Curran.** (1991). Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 3720-3724.
- Han, K., M. S. Levine and J. L. Manley.** (1989). Synergistic activation and repression of transcription by *drosophila* homeobox proteins. *Cell*, **56**, 573-583.
- Han, K. and J. L. Manley.** (1993a). Transcriptional repression by the *Drosophila* Even-skipped protein : definition of a minimal repression domain. *Genes & Dev.*, **7**, 491-503.
- Han, K. and J. L. Manley.** (1993b). Functional domains of the *Drosophila* Engrailed protein. *EMBO J.*, **12**, 2723-2733.
- Hanes, S. D. and R. Brent.** (1989). DNA specificity of the bicoid activator protein is determined by homeodomain recognition helix residue 9. *EMBO J.*, **57**, 1275-1283.
- Hatten, M. E.** (1993). The role of migration in central nervous system neuronal development. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **3**, 38-44.
- Hayes, J. J., D. J. Clark and A. P. Wolffe.** (1991). Histone contributions to the structure of DNA in the nucleosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 6829-6833.
- He, X. and M. G. Rosenfeld.** (1991). Mechanisms of complex transcriptional regulation: implications for brain development. *Neuron*, **7**, 183-196.
- Hernandez, N.** (1993). TBP, a universal eukaryotic transcription factor. *Genes & Dev.*, **7**, 1291-1308.
- Herr, W., R. A. Sturm and R. G. Clerc.** (1988). The POU domain : a large conserved region in the mammalian *pit-1*, *oct-2* and *Caenorhabditis elegans unc-86* gene products. *Genes & Dev.*, **2**, 1513-1516.
- Hibi, M., A. Lin, T. Smeal, A. Minden and M. Karin.** (1993). Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates c-Jun activation domain. *Genes & Dev.*, **7**, 2135-2148.
- Hill, R. E., J. Favor, B. L. M. Hogan, C. C. T. Ton, G. F. Saunders, I. M. Hanson, J. Prosser, T. Jordan, N. D. Hastie and V. van Heyningen.** (1991). Mouse *Small eye* results from mutations in a paired-like homeobox-containing gene. *Nature*, **354**, 522-525.
- Hirai, S.-I., R.-P. Ryseck, F. Mechta, R. Bravo and M. Yaniv.** (1989). Characterization of *junD* : a new member of the *jun* proto-oncogene family. *EMBO J.*, **8**, 1433-1439.
- Hirai, S.-I., B. Bourachot and M. Yaniv.** (1990). Both Jun and Fos contribute to transcription activation by the heterodimer. *Oncogene*, **5**, 39-46.
- Hisatake, K., S. Hasegawa, R. Takada, Y. Nakatani, M. Horikoshi and R. Roeder.** (1993). The p250 subunit of native TATA box-binding factor TFIID is the cell-cycle regulatory protein CCG1. *Nature*, **362**, 179-181.
- Hochstrasser, M.** (1992). Ubiquitin and intracellular protein degradation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **4**, 1024-1031.
- Hoey, T. and M. Levine.** (1988). Divergent homeo box proteins recognize similar DNA sequences in *Drosophila*. *Nature*, **332**, 858-861.

- Hoey, T., R. Weinzierl, G. Gill, J.-L. Chen, B. Dynlacht and R. Tjian.** (1993). Molecular cloning and functional analysis of *Drosophila* TAF110 reveal properties expected of coactivators. *Cell*, **72**, 247-270.
- Hope, I. A. and K. Struhl.** (1986). Functional dissection of a eukaryotic transcriptional activator protein, GCN4 of yeast. *Cell*, **46**, 885-894.
- Hope, I. A., S. Mahadevan and K. Struhl.** (1988). Structural and functional characterization of the short acidic transcriptional activation region of yeast GCN4 protein. *Nature*, **333**, 635-640.
- Hoth, C. F., A. Milunsky, N. Lipsky, R. Sheffer, C. S.K. and C. T. Baldwin.** (1993). Mutations in the paired domain of the human PAX3 gene cause Klein-Waardenburg syndrome (WS-III) as well as Waardenburg syndrome type I (WS-I). *Amer. J. Hum. Genet.*, **52**, 455-462.
- Hsu, W., T. K. Kerppola, P.-L. Chen, T. Curran and S. Chen-Kiang.** (1994). Fos and Jun repress transcription activation by NF-IL6 through association at the basic zipper region. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 268-276.
- Hunter, T. and M. Karin.** (1992). The regulation of transcription by phosphorylation. *Cell*, **70**, 375-387.
- Hynes, R. A. and A. D. Lander.** (1992). Contact and adhesive specificities in the associations, migrations, and targeting of cells and axons. *Cell*, **68**, 303-322.
- Ingles, C. J., M. Shales, W. D. Cress, S. J. Triezenberg and J. Greenblatt.** (1991). Reduced binding of TFIID to transcriptionally compromised mutants of VP16. *Nature*, **351**, 588-590.
- Ingraham, H. A., S. E. Flynn, J. W. Voss, V. R. Albert, M. S. Kapiloff, L. Wilton and M. G. Rosenfeld.** (1990). The POU-specific domain of Pit-1 is essential for sequence-specific, high affinity DNA binding and DNA-dependent Pit-1 interactions. *Cell*, **61**, 1021-1033.
- Inostroza, J., F. Mermelstein, I. Ha, W. Lane and D. Reinberg.** (1992). Dr1, a TATA-binding protein-associated phosphoprotein and inhibitor of class II gene transcription. *Cell*, **70**, 477-489.
- Jäckle, H.** (1994). Positional signalling in the *Drosophila* blastoderm. 128. EMBL Meeting on Transcription, Heidelberg, 28/08-1/09.
- Jacq, X., C. Brou, Y. Lutz, I. Davidson, P. Chambon and L. Tora.** (1994). Human TAFII30 is present in a distinct TF_{II}D complex and is required for transcriptional activation by the estrogen receptor. *Cell*, **79**, 107-117.
- Javahery, R., A. Khachi, K. Lo, B. Zenzie-Gregory and S. Smale.** (1994). DNA sequence requirements for transcriptional initiator activity in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 116-127.
- Jaynes, J. B. and P. H. O'Farrell.** (1991). Active repression of transcription by the Engrailed homeodomain protein. *EMBO J.*, **10**, 1427-1433.
- Johnson, F. B., E. Parker and M. A. Krasnow.** (1995). Extradenticle protein is a selective cofactor for the *Drosophila* homeotics: Role of the homeodomain and YPWM amino acid motif in the interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 739-743.
- Kadesch, T.** (1993). Consequences of heteromeric interactions among helix-loop-helix proteins. *Cell Growth Differ.*, **4**, 49-55.

- Kamakaka, R. T., M. Bulger and J. T. Kadonaga.** (1993). Potentiation of RNA polymerase II transcription by Gal4-VP16 during but not after DNA replication and chromatin assembly. *Genes & Dev.*, **7**, 1779-1795.
- Kato, G. J., W. M. F. Lee, L. Chen and C. V. Dang.** (1992). Max : functional domains and interaction with c-Myc. *Genes & Dev.*, **6**, 81-92.
- Kaufmann, J. and S. Smale.** (1994). Direct recognition of initiator elements by a component of the transcription factor IID complex. *Genes & Dev.*, **8**, 821-829.
- Kelleher, R., P. Flanagan and R. Kornberg.** (1990). A novel mediator between activator proteins and the RNA polymerase II transcription apparatus. *Cell*, **61**, 1209-1215.
- Keller, S. A., J. M. Jones, A. Boyle, B. L.L., P. D. Killen, G. D.G., N. V. Kapousta, P. Hitchcock, S. R.T. and M.H. Meisler.** (1994). Kidney and retinal defects (*Krd*), a transgene-induced mutation with a deletion of mouse chromosome 19 that includes the *Pax2* locus. *Genomics*, **23**, 309-320.
- Kerr, L. D., L. J. Ransone, P. Wamsley, M. J. Schmitt, T. G. Boyer, Q. Zhou, A. J. Berk and I. M. Verma.** (1993). Association between proto-oncoprotein Rel and TATA-binding protein mediates transcriptional activation by NF- κ B. *Nature*, **365**, 412-419.
- Kissinger, C. R., B. Liu and E. Martin-Blanco.** (1990). Crystal structure of an engrailed homeodomain-DNA complex at 2.8 Å resolution : a framework for understanding homeodomain-DNA interactions. *Cell*, **63**, 579-590.
- Klempnauer, K.-H., H. Arnold and H. Biedenkapp.** (1989). Activation of transcription by *v-myb*: evidence for two different mechanisms. *Genes & Develop.*, **3**, 1582-1589.
- Kokubo, T., D.-W. Gong, S. Yamashita, R. Takada, R. Roeder, M. Horikoshi and N. Nakatani.** (1993a). Molecular cloning, expression, and characterization of the *Drosophila* 85-kilodalton TFIID subunit. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 7859-7863.
- Kokubo, T., D.-W. Gong, R. Roeder, M. Morikoshi and Y. Nakatani.** (1993b). The *Drosophila* 110-kDa transcription factor TFIID subunit directly interacts with the N-terminal region of the 230-kDa subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 5896-5900.
- Kokubo, T., D.-W. Gong, S. Yamashita, M. Horikoshi, R. Roeder and Y. Nakatani.** (1993c). *Drosophila* 230-kD TFIID subunit, a functional homolog of the human cell cycle gene product, negatively regulates DNA binding of the TATA box-binding subunit of TFIID. *Genes & Dev.*, **7**, 1033-1046.
- Kovary, K. and R. Bravo.** (1991a). The Jun and Fos protein families are both required for cell cycle progression in fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 4466-4472.
- Kovary, K. and R. Bravo.** (1991b). Expression of different Jun and Fos proteins during the G₀-to-G₁ transition in mouse fibroblasts : *in vitro* and *in vivo* associations. *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 2451-2459.
- Kovary, K. and R. Bravo.** (1992). Existence of different Fos/Jun complexes during the G₀-to-G₁ transition and during exponential growth in mouse fibroblasts : differential role of Fos protein. *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 5015-5023.

- Kowenz-Leutz, E., G. Twamley, S. Ansieau and A. Leutz.** (1994). Novel mechanism of C/EBP β (NF-M) transcriptional control : activation through derepression. *Genes & Dev.*, **8**, 2781-2791.
- Kozmik, Z., R. Kurzbauer, P. Dörfler and M. Busslinger.** (1993). Alternative splicing of *Pax-8* Gene transcripts is developmentally regulated and generated isoforms with different transactivation properties. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 6024-6035.
- Krauss, S., T. Johansen, V. Korzh, Y. Moens, J. A. Ericson and A. Fjose.** (1991). Zebrafish *Pax [zf-a]*: a paired box-containing gene expressed in the neural tube. *EMBO J.*, **10**, 3609-3619.
- Kristie, T. M. and P. A. Sharp.** (1990). Interactions of the Oct-1 POU subdomains with specific DNA sequences and with the HSV α -*trans*-activator protein. *Genes & Dev.*, **4**, 2383-2396.
- Kumar, V. and P. Chambon.** (1988). The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer. *Cell*, **55**, 145-156.
- Lassar, A. B., R. L. Davis, E. W. Woodring, T. Kadesch, C. Murre, A. Voronova, D. Baltimore and H. Weintraub.** (1991). Functional activity of myogenic HLH proteins requires hetero-oligomerization with E12/E47-like proteins *in vivo*. *Cell*, **66**, 305-315.
- Laudet, V. and D. Stéhelin.** (1992). Flexible friends. *Curr. Biol.*, **2**, 293-295.
- Lee, W. S., C. C. Kao, G. O. Bryant, X. Liu and A. J. Berk.** (1991). Adenovirus E1A activation domain binds the basic repeat in the TATA box transcription factor. *Cell*, **67**, 365-376.
- Lee, D. K., J. Dejong, S. Hashimoto, M. Morikoshi and R. Roeder.** (1992). TFIIA induces conformational changes in TFIID via interactions with the basic repeat. *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 5189-5196.
- Lee, H.-L. and T. K. Archer.** (1994). Nucleosome-mediated disruption of transcription factor-chromatin initiation complexes at the mouse mammary tumor virus long terminal repeat *in vivo*. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 32-41.
- Lenardo, M. M. and D. Baltimore.** (1989). NF- κ B: A pleiotropic mediator of inducible and tissue-specific gene control. *Cell*, **58**, 227-229.
- Lewin, B.** (1994). Chromatin and gene expression : constant questions, but changing answers. *Cell*, **79**, 397-406.
- Li, S., E. B. Crenshaw III, E. J. Rawson, D. M. Simmons, L. W. Swanson and M. G. Rosenfeld.** (1990). Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the POU-domain gene *pit-1*. *Nature*, **347**, 528-533.
- Li, L., J.-C. Chambard, M. Karin and E. N. Olson.** (1992). Fos and Jun repress transcriptional activation by myogenin and MyoD : the amino terminus of Jun can mediate repression. *Genes & Dev.*, **6**, 676-689.
- Li, P., X. He, M. R. Gerrero, M. Mok, A. Aggarwal and M. G. Rosenfeld.** (1993). Spacing and orientation of bipartite DNA-binding motifs as potential functional determinants for POU domain factors. *Genes & Dev.*, **7**, 2483-2496.

- Li, H.-S., J.-M. Yang, R. D. Jacobson, D. Pasko and O. Sundin.** (1994). Pax-6 Is First Expressed in a Region of Ectoderm Anterior to the Early Neural Plate: Implications for Stepwise Determination of the Lens. *Develop. Biol.*, **162**, 181-194.
- Liang, H., X. Mao, E. T. Olejniczak, D. G. Nettesheim, L. Yu, R. P. Meadows, C. B. Thompson and S. W. Fesik.** (1995). Solution structure of the *ets* domain of FLI-1 when bound to DNA. *Science*, in press.
- Lieberman, P. M. and A. J. Berk.** (1991). The Zta *trans*-activator protein stabilizes TFIID association with promoter DNA by direct protein-protein interaction. *Genes & Dev.*, **5**, 2441-2454.
- Lim, P., N. Kraut, J. Frampton and T. Graf.** (1992). DNA binding by c-Ets-1, but not v-Ets, is repressed by an intramolecular mechanism. *EMBO J.*, **11**, 643-652.
- Lin, Y.-S. and M. R. Green.** (1991). Mechanism of action of an acidic transcriptional activator in vitro. *Cell*, **64**, 971-981.
- Lin, A., J. Frost, T. Deng, T. Smeal, D. Brenner and M. Karin.** (1992). Casein kinase II is a negative regulator of c-Jun DNA binding and AP-1 activity. *Cell*, **70**, 777-789.
- Lin, Y.-C., K. Brown and U. Siebenlist.** (1995). Activation of NF- κ B requires proteolysis of the inhibitor I κ B- α : Signal-induced phosphorylation of I κ B- α alone does not release active NF- κ B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 552-556.
- Lu, H., O. Flores, R. Weinmann and R. Reinberg.** (1991). The nonphosphorylated form of RNA polymerase II preferentially associates with the preinitiation complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 10004-10008.
- Lucibello, F. C., C. Lowag, M. Neuberg and R. Müller.** (1989). *Trans*-repression of the mouse *c-fos* promoter : a novel mechanism of Fos-mediated *Trans*-regulation. *Cell*, **59**, 999-1007.
- Lüscher, B., E. Christenson, D. W. Litchfield, E. G. Krebs and R. N. Eisenman.** (1990). Myb DNA binding inhibited by phosphorylation at a site deleted during oncogenic activation. *Nature*, **344**, 517-522.
- Ma, J. and M. Ptashne.** (1987). A new class of yeast transcriptional activators. *Cell*, **51**, 113-119.
- Maldonado, E., I. Ha, P. Cortes, L. Weis and R. Reinberg.** (1990). Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II : Role of transcription factors IIA, IID, and IIB during formation of transcription-competent complex. *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 6335-6347.
- Martin, P., C. Carrière, C. Dozier, B. Quatannens, M.-A. Mirabel, B. Vandenbunder, D. Stéhelin and S. Saule.** (1992). Characterization of a paired box- and homeobox-containing quail gene (*Pax-QNR*) expressed in the neuroretina. *Oncogene*, **7**, 1721-1728.
- Matsusaka, T., K. Fuji kaxa, Y. Nishio, N. Mukaida, K. Matsuhima, T. Kishimoto and S. Akira.** (1993). Transcription factors NF-IL6 and NF- κ B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 10193-10197.
- Maxon, M., J. Goodrich and R. Tjian.** (1994). Transcription factor IIE binds preferentially to RNA polymerase IIa and recruits TFIIF : a model for promoter clearance. *Genes & Dev.*, **8**, 515-524.

- McGinnis, W. and R. Krumlauf.** (1992). Homeobox genes and axial patterning. *Cell*, **68**, 283-302.
- McKay, D. B. and T. A. Steitz.** (1981). Structure of catabolite gene activator protein at 2.9 Å resolution suggests binding of left-handed B-DNA. *Nature*, **290**, 744-749.
- McPherson, C. E., E.-Y. Shim, D. S. Friedman and K. S. Zaret.** (1993). An active tissue-specific enhancer and bound transcription factors existing in a precisely positioned nucleosomal array. *Cell*, **75**, 387-398.
- Means, A. and P. Farhnam.** (1990). Transcription initiation from the dihydrofolate reductase promoter is positioned by HIP1 binding initiation site. *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 653-661.
- Meisterernst, M. and R. Roeder.** (1991). Family of proteins that interact with TFIID and regulate promoter activity. *Cell*, **67**, 557-567.
- Meisterernst, M., A. Roy, H. M. Lieu and R. Roeder.** (1991). Activation of class II gene transcription by regulatory factors is potentiated by a novel activity. *Cell*, **66**, 981-993.
- Merino, A., K. Madden, W. Lane, J. Champoux and D. Reinberg.** (1993). Topoisomerase I is involved in both repression and activation of transcription. *Nature*, **365**, 227-232.
- Meyer, M., R. Schreck and P. A. Baeuerle.** (1993). H₂O₂ and antioxidants have opposite effects on activation of NF-κB and AP-1 in intact cells : AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. *EMBO J.*, **12**, 2005-2015.
- Miner, J. N. and K. R. Yamamoto.** (1992). The basic region of AP-1 specifies glucocorticoid receptor activity at a composite response element. *Genes & Dev.*, **6**, 2491-2501.
- Molina, C. A., N. S. Foulkes, E. Lalli and P. Sassone-Corsi.** (1993). Inducibility and negative autoregulation of CREM : an alternative promoter directs the expression of ICER, an early response repressor. *Cell*, **75**, 875-886.
- Mukherjee, B., S. D. Morgenbesser and R. A. DePinho.** (1992). Myc family oncoproteins function through a common pathway to transform normal cells in culture : cross-interference by Max and *trans*-acting dominant mutants. *Genes & Dev.*, **6**, 1480-1492.
- Mumberg, D., F. C. Lucibelle, M. Schuermann and R. Müller.** (1991). Alternative splicing of *fosB* transcripts results in differentially expressed mRNAs encoding functionally antagonistic proteins. *Genes & Dev.*, **5**, 1212-1223.
- Murre, C., Voronova A., Baltimore, D.** (1991). B-cell- and myocyte-specific E2-box-binding factors contain E12/E47-like subunits. *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 1156-1160.
- Müller, H. P., J. M. Sogo and W. Schaffner.** (1989). An enhancer can stimulate transcription in *trans* when attached to the promoter *via* a protein bridge. *Cell*, **58**, 767-777.
- Nakabeppu, Y., K. Ryder and D. Nathans.** (1988). DNA binding activities of three murine Jun proteins : stimulation by Fos. *Cell*, **55**, 907-915.
- Nakabeppu, Y. and D. Nathans.** (1991). A naturally occurring truncated form of FosB that inhibits Fos/Jun transcriptional activity. *Cell*, **64**, 751-759.

- Näär, A. M., J.-M. Boutin, S. M. Lipkin, C. K. Yu, J. M. Holloway, C. K. Glass and M. G. Rosenfeld.** (1991). The orientation and spacing of core DNA-binding motifs dictate selective transcriptional responses to three nuclear receptors. *Cell*, **65**, 1267-1279.
- Ness, S. A., E. Kowenz-Leutz, T. Casini, T. Graf and A. Leutz.** (1993). Myb and NF-M: combinatorial activators of myeloid genes in heterologous cell types. *Genes & Develop.*, **7**, 749-759.
- O'Shea, E. K., J. D. Klemm, P. S. Kim and T. Alber.** (1991). X-ray structure of the GCN4 leucine zipper, a two-stranded, parallel coiled coil. *Science* **254**, 539-544.
- Ofir, R., V. J. Dwarki, D. Rashid and I. M. Verma.** (1990). Phosphorylation of the C terminus of Fos protein is required for transcriptional transrepression of the *c-fos* promoter. *Nature*, **348**, 80-82.
- Ogata, K., S. Morikawa, H. Nakamura, A. Sekikawa, T. Inoue, H. Kanai, A. Sarai, S. Ishii and Y. Nishimura.** (1994). Solution structure of a specific DNA complex of the Myb DNA-binding domain with cooperative recognition helices. *Cell*, **79**, 639-648.
- Palombella, V. J., O. J. Rando, A. L. Goldberg and T. Maniatis.** (1994). The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF- κ B1 precursor protein and the activation of NF- κ B. *Cell*, **78**, 773-785.
- Payne, J. M., P. J. Laybourn and M. E. Dahmus.** (1989). The transition of RNA polymerase II from initiation to elongation is associated with phosphorylation of the carboxy-terminal domain of subunit II α . *J. Biol. Chem.*, **264**, 19621-19629.
- Pellerin, I., C. Schnabel, K. M. Catron and C. Abate.** (1994). Hox proteins have different affinities for a consensus DNA site that correlate with the positions of their genes on the *hox* cluster. *Mol. Cell Biol.*, **14**, 4532-4545.
- Pessac, B. and G. Calothy.** (1974). Transformation of chick embryo neuroretinal cells by Rous sarcoma virus *in vitro*: induction of proliferation. *Science*, **185**, 709-710.
- Phelan, M. L., R. Sadoul and M. S. Featherstone.** (1994). Functional differences between HOX proteins conferred by two residues in the homeodomain N-terminal arm. *Mol. Cell Biol.*, **14**, 5066-5075.
- Pierani, A.** (1994). Etude d'un gène spécifique de la neurorétine et de sa régulation transcriptionnelle en fonction du développement et de la prolifération (*v-src*)., Thèse de l'Université de Paris XI Orsay.
- Plaza, S., C. Dozier and S. Saule.** (1993). Quail Pax-6 (Pax-QNR) encodes a transcription factor able to bind and transactivate its own promoter. *Cell Growth Differ.*, **4**, 1041-1050.
- Pugh, B. and R. Tjian.** (1990). Mechanism of transcriptional activation by Sp1 : Evidence for coactivators. *Cell*, **61**, 1187-1197.
- Pugh, B. and R. Tjian.** (1991). Transcription from a TATA-less promoter requires a multisubunit TFIID complex. *Genes & Dev.*, **5**, 1935-1945.
- Purnell, B., P. Emanuel and D. Gilmour.** (1994). TFIID sequence recognition of the initiator and sequences farther downstream in *Drosophila* class II genes. *Genes & Dev.*, **8**, 830-842.

- Queva, C.** (1993). Expression et fonction des proto-oncogènes *c-myb* et *c-ets-1*., Thèse de l'Université des Sciences et Techniques de Lille-Flandres-Artois.
- Qian, Y. Q., M. Billeter and G. Otting.** (1989). The structure of the *Antennapedia* homeodomain determined by NMR spectroscopy in solution : comparison with prokaryotic repressors. *Cell*, **59**, 573-580.
- Quiring, R., U. Walldorf, U. Kloter and W. J. Gehring.** (1994). Homology of the *eyeless* gene of *Drosophila* to the *Small eye* gene in mice and *Aniridia* in humans. *Science*, **265**, 785-789.
- Rabault, B. and J. Ghysdael.** (1994). Calcium-induced phosphorylation of ETS1 inhibits its specific DNA binding activity. *J. Biol. Chem.*, **269**, 28143-28151.
- Rauskolb, C. and E. Wieschaus.** (1994). Coordinate regulation of downstream genes by *extradenticle* and the homeotic selector proteins. *EMBO J.*, **13**, 3561-3569.
- Roberts, S. G., I. Ha, E. Maldonado, D. Reinberg and M. R. Green.** (1993). Interaction between an acidic activator and transcription factor TFIIB is required for transcriptional activation. *Nature*, **363**, 741-744.
- Rosenfeld, M. G.** (1991). POU-domain transcription factors : pou-er-ful developmental regulators. *Genes & Dev.*, **5**, 897-907.
- Roy, A., M. Meisterernst, P. Pognonec and R. Roeder.** (1991). Cooperative interaction of an initiator-binding transcription initiation factor and the helix-loop-helix activator USF. *Nature*, **354**, 245-248.
- Roy, A. L., C. Carruthers, T. Gutjahr and R. G. Roeder.** (1993). Direct role for Myc in transcription initiation mediated by interactions with TFII-I. *Nature*, **365**, 359-361.
- Ruppert, S., E. H. Wang and R. Tjian.** (1993). Cloning and expression of human TAF_{II}250 : A TBP-associated factor implicated in cell-cycle regulation. *Nature*, **362**, 175-179.
- Ryseck, R.-P. and R. Bravo.** (1991). c-JUN, JUN B and JUN D differ in their binding affinities to AP-1 and CRE consensus sequences : effect of FOS proteins. *Oncogene*, **6**, 633-642.
- Sandaltzopoulos, R., T. Blank and T. B. Becker.** (1994). Transcriptional repression by nucleosomes but not H1 in reconstituted preblastoderm *Drosophila* chromatin. *EMBO J.*, **13**, 373-379.
- Sauer, F. and H. Jäckle.** (1993). Dimerization and the control of transcription by *Krüppel*. *Nature*, **364**, 454-456.
- Schaeffer, L., R. Roy, S. Humbert, V. Moncollin, W. Vermeulen, J. H. J. Hoeijmakers, P. Chambon and J. M. Egly.** (1993). DNA repair helicase: A component of BTF-2 (TFIIH) basic transcription factor. *Science*, **260**, 58-63.
- Schäfer, B. W., T. Czerny, M. Bernasconi, M. Genini and M. Busslinger.** (1994). Molecular cloning and characterization of a human PAX-7 cDNA expressed in normal and neoplastic myocytes. *Nucl. Acids Res.*, **22**, 4574-4582.
- Schier, A. F. and W. J. Gehring.** (1993). Functional specificity of the homeodomain protein fushi tarazu : the role of DNA-binding specificity *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 1450-1454.

- Schild, C., F.-X. Claret, W. Wahli and A. P. Wolffe.** (1993). A nucleosome-dependent static loop potentiates estrogen-regulated transcription from the *Xenopus* vitellogenin B1 promoter *in vitro*. *EMBO J.*, **12**, 423-433.
- Schüle, R., K. Umesono, D. J. Mangelsdorf, J. Bolado, J. W. Pike and R. M. Evans.** (1990). Jun-Fos and receptors for vitamins A and D recognize a common response element in the human osteocalcin gene. *Cell*, **61**, 497-504.
- Schüle, R. and R. M. Evans.** (1991). Cross-coupling of signal transduction pathways : zinc finger meets leucine zipper. *TIG*, **7**, 377-381.
- Serfling, E.** (1989). Autoregulation - a common property of eukaryotic transcription factors? *TIG*, **5**, 131-133.
- Serizawa, H., J. W. Conaway and R. C. Conaway.** (1993). Phosphorylation of C-terminal domain of RNA polymerase II is not required in basal transcription. *Nature*, **363**, 371-374.
- Seto, E., Y. Shi and T. Shenk.** (1991). YY1 is an initiator sequence-binding protein that directs and activates transcription *in vitro*. *Nature*, **354**, 241-245.
- Seto, E., A. Usheva, G. P. Zambetti, J. Momand, N. Horishoki, R. Weinmann, A. J. Levine and T. Shenk.** (1992). Wild-type p53 binds to TATA-binding protein and represses transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 12028-12032.
- Shi, Y., E. Seto, L.-S. Chang and T. Shenk.** (1991). Transcriptional repression by YY1, a human GL1-Kruppel-related protein, and relief of repression by adenovirus E1A protein. *Cell*, **67**, 377-388.
- Simpson-Brose, M., J. Treisman and C. Desplan.** (1994). Synergy between the Hunchback and Bicoid morphogens is required for anterior patterning in *Drosophila*. *Cell*, **78**, 855-865.
- Smale, S. and D. Baltimore.** (1989). The "initiator" as a transcriptional element. *Cell*, **57**, 103-113.
- Smale, S., M. Schmidt, A. Berk and D. Baltimore.** (1990). Transcriptional activation by Sp1 as directed through TATA or initiator : specific requirements for mammalian transcription factor IID. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 4509-4513.
- Smeal, T., B. Binetruy, D. A. Mercolas, M. Birrer and M. Karin.** (1991). Oncogenic and transcriptional cooperation with Ha-Ras requires phosphorylation of c-Jun on serines 63 and 73. *Nature*, **354**, 494-496.
- Smeal, T., B. Binetruy, D. Mercola, A. Grover-Bardwick, G. Heidecker, U. R. Rapp and M. Karin.** (1992). Oncoprotein-mediated signalling cascade stimulates c-Jun activity by phosphorylation of serines 63 and 73. *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 307-3513.
- Smeal, T., M. Hibi and M. Karin.** (1994). Altering the specificity of signal transduction cascades : positive regulation of c-Jun transcriptional activity by protein kinase A. *EMBO J.*, **13**, 6006-6010.
- Stein, B., A. S. Baldwin Jr, W. Ballard, W. C. Greene, P. Angel and P. Herrlich.** (1993a). Cross-coupling of the NF- κ B p65 and Fos/Jun transcription factors produces potentiated biological function. *EMBO J.*, **12**, 3879-3891.

- Stein, B., P. C. Cogswell and A. S. J. Baldwin.** (1993b). Functional and physical associations between NF- κ B and C/EB β family members : a rel domain-bZIP interaction. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 3964-3974.
- Strachan, T. and A. P. Read.** (1994). PAX genes. *Curr. Opin. Genet. Develop.*, **4**, 427-438.
- Straka, C. and W. Hörz.** (1991). A functional role for nucleosomes in the repression of a yeast promoter. *EMBO J.*, **10**, 361-368.
- Su, H., T. J. Boss, F. S. Monteclaro and P. K. Vogt.** (1991). *Jun* inhibits myogenic differentiation. *Oncogene*, **6**, 1759-1766.
- Sumimoto, H., Y. Okhuma, T. Yamamoto, M. Horikoshi and R. Roeder.** (1990). Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II : Identification of general transcription factor TFIIG. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 9158-9162.
- Sun, X.-H. and D. Baltimore.** (1991). An inhibitory domain of E12 transcription factor prevents DNA binding in E12 homodimers but not in E12 heterodimers. *Cell*, **64**, 459-470.
- Suzuki, T., H. Okuno, T. Yoshida, T. Endo, H. Nishina and H. Iba.** (1991). Difference in transcriptional regulatory function between c-Fos and Fra-2. *Nucl. Acids Res.*, **19**, 5537-5542.
- Takada, R., Y. Nakatani, A. Hoffmann, T. Kokubo, S. Hasegawa, R. Roeder and M. Horikoshi.** (1992). Identification of human TFIID components and direct interaction between a 250-kD polypeptide and the TATA box-binding protein (TFIID τ). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 11809-11813.
- Tanese, N., B. Pugh and R. Tjian.** (1991). Coactivators for a proline-rich activator purified from the multisubunit human TFIID complex. *Genes & Dev.*, **5**, 2212-2224.
- Temblay, P. and P. Gruss.** (1994). PAX: genes for mice and men. *Pharmac. Ther.*, **61**, 205-226.
- Thanos D. and T. Maniatis.** (1995). NF- κ B: a lesson in Family values. *Cell*, **80**, 529-532.
- Tjian, R. and T. Maniatis.** (1994). Transcriptional activation : A complex puzzle with few easy pieces. *Cell*, **77**, 5-8.
- Ton, C. C. T., H. Hirvonen, H. Miwa, M. M. Weil, P. Monaghan, T. Jordan, V. van Heyningen, N. D. Hastie, H. Meijers-Heijboer, M. Dreschler, B. Royer-Pokora, F. Collins, A. Swaroop, L. C. Strong and G. F. Saunders.** (1991). Positional cloning and characterization of a Paired Box- and Homeobox-containing gene from the aniridia region. *Cell*, **67**, 1059-1074.
- Treacy, M. N., L. I. Neilson, E. E. Turner, X. He and M. G. Rosenfeld.** (1992). Twin of I-POU : a two amino acid difference in the I-POU homeodomain distinguishes an activator from an inhibitor of transcription. *Cell*, **68**, 491-505.
- Treier, M., L. M. Staszewski and K. Bohmann.** (1994). Ubiquitin-dependent c-Jun degradation *in vivo* is mediated by the δ domain. *Cell*, **78**, 787-798.
- Treisman, J., P. Gönczy and M. Vashistha.** (1989). A single amino acid can determine the DNA binding specificity of homeodomain proteins. *Cell*, **59**, 553-562.
- Treisman, J., E. Harris and C. Desplan.** (1991). The paired box encodes a second DNA-binding domain in the Paired homeo domain protein. *Genes & Dev.*, **5**, 594-604.

- Tsai, S. Y., J. Carlstedt-Duke, N. L. Weigeln, K. Dahlman, J.-Å. Gustafsson and B. W. O'Malley.** (1988). Molecular interactions of steroid hormone receptor with its enhancer element: evidence for receptor dimer formation. *Cell*, **50**, 701-709.
- Turque, N., S. Plaza, F. Radvanyi, C. Carrière and S. Saule.** (1994). *Pax-QNR/Pax-6*, a paired box- and homeobox-containing gene expressed in neurons, is also expressed in pancreatic endocrine cells. *Molec. Endocrinol.*, **8**, 929-938.
- Umesono, K., K. K. Murakami, C. C. Thompson and R. M. Evans.** (1991). Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D₃ receptors. *Cell*, **65**, 1255-1266.
- Urbanek, P., Z.-Q. Wang, I. Fetka, E. F. Wagner and M. Busslinger.** (1994). Complete block of early B cell differentiation and altered patterning of the posterior midbrain in mice lacking Pax5/BSAP *Cell*, **79**, 901-912.
- Usheva, A., E. Maldonado, A. Goldring, H. Lu, C. Houbavi, D. Reinberg and Y. Aloni.** (1992). Specific interactions between the nonphosphorylated form of RNA polymerase II and the TATA-binding protein. *Cell*, **69**, 871-881.
- van Dijk, M. A. and C. Murre.** (1994). *extradenticle* raises the DNA binding specificity of homeotic selector gene products. *Cell*, **78**, 617-624.
- Verrijzer, C. P., M. J. Alkema and W. W. van Weperen.** (1992). The DNA binding specificity of the bipartite POU domain and its subdomains. *EMBO J.*, **11**, 4993-5003.
- Verrijzer, C., K. Yokomori, J.-L. Chen and R. Tjian.** (1994). *Drosophila* TAF_{II}150 : similarity to yeast gene TSP-1 and specific binding to core promoter DNA. *Science*, **264**, 933-941.
- Walther, C., J.-L. Guenet, D. Simon, U. Deutsch, B. Jostes, M. D. Goulding, D. Plachov, R. Balling and P. Gruss.** (1991). PAX: A Murine Multigene Family of Paired Box-Containing Genes. *Genomics*, **11**, 424-434.
- Walther, C. and P. Gruss.** (1991). *Pax-6*, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development*, **113**, 1435-1449.
- Wang, E. H. and R. Tjian.** (1994). Promoter-selective transcriptional defect in cell cycle mutant ts13 rescued by hTAF_{II}250. *Science*, **263**, 811-814.
- Wasylyk, B., C. Wasylyk, P. Flores, A. Bègue, D. Leprince and D. Stéhelin.** (1990). The *c-ets* proto-oncogenes encode transcription factors that cooperate with c-Fos and c-Jun for transcriptional activation. *Nature*, **346**, 191-193.
- Wegner, M., D. W. Drolet and M. G. Rosenfeld.** (1993). POU-domain proteins: structure and function of developmental regulators. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **5**, 488-498.
- Weintraub, H., T. Genetta and T. Kadash.** (1994). Tissue-specific gene activation by MyoD : determination of specificity by *cis*-acting repression elements. *Genes & Dev.*, **8**, 2203-2211.
- Weinzierl, R., S. Ruppert, B. Dynlacht, N. Tanese and R. Tjian.** (1993a). Cloning and expression of *Drosophila* TAF_{II}60 and human TAF_{II}70 reveal conserved interactions with other subunits of TFIID. *EMBO J.*, **12**, 5303-5309.

- Weinzierl, R., B. Dynlacht and R. Tjian. (1993b). Largest subunit of *Drosophila* transcription factor IID directs assembly of a complex containing TBP and a coactivator. *Nature*, **362**, 512-517.
- Weis, L. and R. Reinberg. (1992). Transcription by RNA polymerase II : Initiator-directed formation of transcription-competent complexes. *FASEB J.*, **6**, 3300-3309.
- Weisz, A. and R. Rosales. (1990). Identification of an estrogen response element upstream of the human c-fos gene that binds the estrogen receptor and the AP-1 transcription factor. *Nucl. Acids Res.*, **18**, 5097-5106.
- Wiley, S., R. Kraus and J. Mertz. (1992). Functional binding of the "TATA" box binding component of transcription factor TFIID to the -30 region of TATA-less promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 5814-5818.
- Wilson, D., G. Sheng, T. Lecuit, N. Dostatni and C. Desplan. (1993). Cooperative dimerization of Paired class homeo domains of DNA. *Genes & Dev.*, **7**, 2120-2124.
- Wisdom, R. and I. M. Verma. (1993). Transformation by Fos proteins requires a C-terminal transactivation domain. *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 7429-7438.
- Wolberger, C., A. K. Vershon and B. Liu. (1991). Crystal structure of a MAT α 2 homeodomain-operator complex suggests a general model for homeodomain-DNA interactions. *Cell*, **67**, 517-528.
- Wolffe, A. P. (1994). Nucleosome positioning and modification : chromatin structures that potentiate transcription. *TIBS*, **19**, 240-244.
- Workman, J. L. and R. E. Kingston. (1992). Nucleosome core displacement in vitro via a metastable transcription factor-nucleosome complex. *Science*, **258**, 1780-1784.
- Xanthoudakis, S. and T. Curran. (1992). Identification and characterization of Ref-1, a nuclear protein that facilitates AP-1 DNA-binding activity. *EMBO J.*, **11**, 653-665.
- Xanthoudakis, S., G. Miao, F. Wang, Y.-C. E. Pan and T. Curran. (1992). Redox activation of Fos-Jun DNA binding activity is mediated by a DNA repair enzyme. *EMBO J.*, **11**, 3323-3335.
- Xu, W., M.A. Rould, S. Jun, C. Desplan, and C. O. Pabo. (1995). Crystal structure of a paired domain -DNA complex at 2,5 Å resolution reveals structural basis for pax developmental mutations. (1995). *Cell*, **80**, 639-650.
- Xu, X., C. Prorock, H. Ishikawa, E. Maldonado, Y. Ito and C. Gélinas. (1993). Functional interaction of the v-Rel and c-Rel oncoproteins with the TATA-binding protein and association with transcription factor IIB. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 6733-6741.
- Yen, J., R. M. Wisdom, I. Tratner and I. M. Verma. (1991). An alternative spliced form of FosB is a negative regulator of transcriptional activation and transformation by Fos proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 5077-5081.
- Yeung, K., J. Inostroza, F. Mermelstein, C. Kannabiran and D. Reinberg. (1994). Structure-function analysis of the TBP-binding protein DR1 reveals a mechanism for repression of class II gene transcription. *Genes & Dev.*, **8**, 2097-2109.

- Yokomori, K., J.-L. Chen, A. Admon, S. Zhou and R. Tjian.** (1993). Molecular cloning and characterization of dTAF_{II}30 α and dTAF_{II}30 β ; two small subunits of *Drosophila* TFIID. *Genes & Dev.*, **7**, 2587-2597.
- Young, R. A.** (1991). RNA polymerase II. *Annu. Rev. Biochem.*, **60**, 689-715.
- Zannini, M., H. Francis-Lang, D. Plachov and R. Di Lauro.** (1992). Pax-8, a paired domain-containing protein binds to a sequence overlapping the recognition site of a homeodomain and activates transcription from two thyroid-specific promoters. *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 4230-4241.
- Zappavigna, V., D. Sartori and F. Mavilio.** (1994). Specificity of HOX protein function depends on DNA-protein and protein-protein interactions, both mediated by the homeo domain. *Genes & Dev.*, **8**, 732-744.
- Zawell, L. and R. Reinberg.** (1993). Initiation of transcription by RNA polymerase II : A multi-step process. *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.*, **44**, 67-108.
- Zhou, Q., P. Lieberman, T. Boyer and A. Berk.** (1992). Holo-TFIID supports transcriptional stimulation by diverse activators and from a TATA-less promoter. *Genes & Dev.*, **6**, 1964-1974.
- Zhou, Q., T. Boyer and A. Berk.** (1993). Factors (TAFs) required for activated transcription interact with TATA-box binding protein conserved core domain. *Genes & Dev.*, **7**, 180-187.
- Zhu, H. and R. Prywes.** (1992). Identification of a coactivator that increases activation of transcription by serum response factor and GAL4-VP16 *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 5291-5295.
- Zwilling, S., A. Annweiler and T. Wirth.** (1994). the POU domains of the Oct1 and Oct2 transcription factors mediate specific interaction with TBP. *Nucl. Acids Res.*, **22**, 1655-1662.