

Thèse de l'Université des Sciences et Technologies de LILLE

pour l'obtention du grade de

Docteur en Sciences de la Vie et de la Santé
spécialité : Biologie Moléculaire et Cellulaire

présentée le 18 Novembre 1996

par **Frédéric GILLES**

devant la commission d'examen :

Président : **Jean-Jacques CURGY**, Professeur,
"Dynamique des Cellules Embryonnaires et Cancéreuses"
Centre de Biologie Cellulaire (EA 1030, EA 1033)
SN3, Université des Sciences et Technologies de Lille
59655 VILLENEUVE D'ASCQ CEDEX (FRANCE)
Tel : (33) 03.20.43.40.14 Fax : (33) 03.20.43.49.95

Rapporteurs : **Nicolas WERNERT**, Professeur.
Pathologisches Institut der Universität Bonn.
Postfach 2120. 53011 BONN, FRG (GERMANY)
Tel : (49) 228.287.53.71 Fax : (49) 228.287.50.30

Rudi BEYAERT, Ph.D.
Laboratory of Molecular Biology. University of Gent.
K.L. Ledeganckstraat 35. 9000 GENT (BELGIUM)
Tel : (32) 9.264.51.43 Fax : (32) 9.264.53.48

Membres : **Bénoni BOILLY**, Professeur,
Directeur du Laboratoire "Dynamique des Cellules Embryonnaires et Cancéreuses".
Centre de Biologie Cellulaire (EA 1030, EA 1033)
SN3 Université des Sciences et Technologies de Lille
59655 VILLENEUVE D'ASCQ CEDEX (FRANCE)
Tel : (33) 03.20.43.30.60 Fax : (33) 03.20.43.49.95

Dominique STEHELIN, Professeur,
Directeur de recherches CNRS,
Directeur de l'Unité d'Oncologie Moléculaire CNRS URA 1160,
Directeur de l'Institut de Biologie de Lille.
Institut Pasteur de Lille. 1, rue Calmette. 59019 LILLE (FRANCE)
Tel : (33) 03.20.87.79.78 Fax : (33) 03.20.87.79.08

Bernard VANDENBUNDER, Docteur,
Directeur de recherches CNRS.
Unité d'Oncologie Moléculaire CNRS URA 1160
Institut Pasteur de Lille. 1, rue Calmette. 59019 LILLE (FRANCE)
Tel : (33) 03.20.87.79.12 Fax : (33) 03.20.87.79.08



REMERCIEMENTS

à Louise, Rosa et Pierrette

Je voudrais tout d'abord remercier Dominique STEHELIN de m'avoir accueilli dans son laboratoire, et de m'avoir assuré pendant les six années un cadre de travail agréable et efficace.

Je tiens tout particulièrement à remercier Bernard VANDENBUNDER d'avoir cru en mes capacités de recherche, d'avoir accepté de m'encadrer pour mon DEA et ma thèse, et de m'avoir encouragé jusqu'au bout !

Merci à Jean-Jacques CURGY pour sa haute valeur ajoutée qu'il ne distille qu'à quelques élus, pour m'avoir fait découvrir un petit coin de paradis, et pour m'avoir donné l'envie d'entreprendre ces longues études. C'est une immense joie pour moi de l'accueillir dans mon jury à la place d'honneur.

Grand merci également à Véronique FAFEUR pour le chemin que nous avons parcouru ensemble, et pour m'avoir abreuvé de ses multiples conseils notamment pour la culture cellulaire.

Je tiens particulièrement à remercier Nicolas WERNERT, Rudi BEYAERT et Bénoni BOILLY qui ont accepté avec beaucoup de diligence d'examiner le travail qui est présenté ici.

Je remercie tous ceux qui m'ont aidé un jour ou l'autre dans ce travail, notamment les membres de l'Unité d'Oncologie Moléculaire et de l'Institut Pasteur auprès de qui je me suis beaucoup enrichi.

Je voudrais en particulier remercier Marie-Berthe, pour son charme, sa convivialité et son humour, qui ont illuminé mes jours passés à la paillassse voisine. Merci de m'avoir transmis quelques uns de ses secrets techniques et de m'avoir mis le pied à l'étrier des Northern blots, même si l'élève n'est pas encore parvenu à égaler le maître.

Un grand merci également à Chantal pour sa patience, son aide précieuse et son soutien moral. Qu'elle soit louée pour ses nombreuses qualités et compétences, que sa trop grande discrétion ne met pas assez en valeur.

Merci à Nicole et à Marie-Christine pour leur efficacité et leur altruisme, et pour l'huile qu'elles répandent dans les rouages du labo pour que tout tourne bien. Je n'oublierai pas les agréables repas de 11h30 passés également en charmante compagnie de Jean et de Christian.

Merci tous ceux qui sont restés intègres dans leurs sentiments et dans leur attitude et qui ont supporté depuis le début de ce parcours initiatique, mes joies et mes peines : Nathalie, Anne, Fatima, Sophana, Stéphane ...

Je me souviendrai toujours de mes premiers pas en PCR guidés par le duo de choc Vincent-Catherine, à qui je suis reconnaissant.

Merci à Thierry pour son aide précieuse lors des pannes informatiques, et surtout pour les petites phrases d'encouragement qui font mouche à tous les coups.

Merci à tous les membres du groupe *in situ*.

Merci enfin à nos chers disparus dont le souvenir est encore douloureux.

SOMMAIRE

	Page
PRESENTATION DU MEMOIRE	4
RESUME	6
ABSTRACT	7
LISTE DES ILLUSTRATIONS	8
ABREVIATIONS	9

PREMIERE PARTIE

EXPRESSION DU PROTO-ONCOGENE *c-ets1* DANS DES FIBROBLASTES DE CARCINOMES INVASIFS

I - INTRODUCTION	10
A - LE PROTO-ONCOGENE <i>c-ets1</i>	10
1 - Le gène <i>c-ets1</i> et ses produits	10
a) - La structure génomique du gène <i>c-ets1</i>	
b) - Les transcrits <i>c-ets1</i>	
c) - Les facteurs de transcription Ets1	
d) - Les gènes cibles des facteurs de transcription Ets	
e) - Coopération de Ets avec d'autres facteurs de transcription	
2 - Les sites d'expression de <i>c-ets1</i>	15
a) - Les cellules lymphoïdes	
b) - Les cellules endothéliales lors de l'angiogenèse	
c) - Les cellules du mésenchymateuses lors de processus invasifs	
3 - Les propriétés oncogéniques de <i>c-ets1</i>	18
B - LES CARCINOMES	20
1 - La structure histologique des carcinomes	20
a) - Le parenchyme et le stroma	
b) - La composition du stroma tumoral	
c) - La formation du stroma tumoral	
2 - Les mécanismes moléculaires de l'invasion	23
a) - De la tumeur primaire aux métastases	
b) - La dégradation de la matrice extracellulaire	
3 - La régulation de l'activité des protéinases	27
C - ORIENTATION DE LA RECHERCHE	28
II - RESULTATS	29
ARTICLE 1	
III - CONCLUSION	30

DEUXIEME PARTIE

REGULATION DE L'EXPRESSION DE *c-ets-1* DANS DES FIBROBLASTES HUMAINS PAR DES CYTOKINES FIBROGENIQUES

I - INTRODUCTION	33
A - LES FACTEURS DE CROISSANCE ET LES CYTOKINES DANS LES TUMEURS	33
B - LA REGULATION DE L'ACTIVITE DES FIBROBLASTES	34
1 - La prolifération des fibroblastes	36
2 - La production des composants matriciels	37
3 - Le remaniement de la matrice extracellulaire	38
C - LA REGULATION DE L'EXPRESSION DU GENE <i>c-ets1</i>	38
1 - La régulation de l'activité promotrice	38
2 - La régulation et la stabilité des transcrits <i>c-ets1</i>	39
3 - La régulation de l'activité des protéines Ets1	40
a) - Les isoformes des protéines Ets1	
b) - La phosphorylation des protéines Ets1	
D - ORIENTATION DE LA RECHERCHE	42
II - RESULTATS	43
A - ARTICLE 2	43
B - RESULTATS COMPLEMENTAIRES	45
1 - Les transcrits alternatifs du gène <i>c-ets1</i>	45
2 - Activation transcriptionnelle de <i>c-ets1</i> par le TNF α	47
a) - <i>Run On</i>	
b) - RT-PCR intronique	
3 - La stabilité des transcrits du gène <i>c-ets1</i>	50
III - CONCLUSION	51

TROISIEME PARTIE

SIGNALISATION INTRACELLULAIRE DU TNF α REGULANT L'EXPRESSION DE *c-ets-1* DANS DES FIBROBLASTES

I - INTRODUCTION	52
A - LE TUMOR NECROSIS FACTOR ET LA LYMPHOTOXINE	53
B - LES RECPTEURS POUR LE TNF	53
1 - TNF-R1 et TNF-R2	53
2 - Les fonctions cellulaires attribuées à TNF-R1 et à TNF-R2	54
3 - Les protéines associées aux récepteurs pour le TNF	55
C - LES PHOSPHOLIPASES ET LES SECONDS MESSAGERS	57
1 - La PLA ₂ et l'acide arachidonique	58
2 - La PC-PLC et le diacylglycérol	58
3 - Les SMases et le céramide	60
a) - La voie de la sphingomyéline	
b) - Les cibles moléculaires du céramide	
c) - Les seconds messagers métabolites du céramide	
4 - Les activités antagonistes des glycérolipides et des sphingolipides	65
D - LES PROTEINES G	67

E - LES PROTEINE KINASES ET PHOSPHATASES	68
1 - Les protéine kinases A	68
2 - Les protéine kinases C	69
a) - Les isoformes de PKCs	
b) - Les PKCs impliquées dans la signalisation du TNF α	
3 - Les protéine kinases "dirigées par la proline"	72
a) - La CAPK, protéine kinase activée par le céramide	
b) - Les MAP kinases	
1) - Les ERKs	
2) - Les JNKs	
3) - La p38/RK	
4 - La protéine phosphatase activée par le céramide	77
5 - Les tyrosine protéine kinases	78
F - ORIENTATION DE LA RECHERCHE	79
II - RESULTATS	80
A - ARTICLE 3	P3 - 1 à 26
B - RESULTATS COMPLEMENTAIRES	82
1) - Quel type de sphingomyélinasé est impliqué dans l'activation de <i>c-ets1</i> par le TNF α ?	82
a) - Le D609	
b) - Les poisons des lysosomes	
c) - L'action du diacylglycérol	
d) - Les fibroblastes NPD-A	
e) - <i>c-ets1</i> et la sénescence	
2) - Quelles sont les cibles moléculaires du céramide qui médient l'activation de <i>c-ets1</i> par le TNF α ?	88
a) - La CAPP	
b) - La CAPK	
c) - La PKC ζ	
d) - Effet différentiel des pseudosubstrats inhibiteurs de PKCs selon le type cellulaire	
3) - Y a-t-il une corrélation entre l'expression de <i>c-ets1</i> et l'apoptose ?	94
III - CONCLUSION	97
DISCUSSION GENERALE	99
I - LE PROTO-ONCOGENE <i>c-ets1</i> EST UNE CIBLE COMMUNE POUR DES STIMULI VARIÉS	99
II - LA DIVERSITE DES STIMULI SE RETROUVE AU NIVEAU DES SECONDS MESSAGERS	100
III - QUEL TYPE DE SPHINGOMYELINASE EST IMPLIQUE DANS L'ACTIVATION DE <i>c-ets1</i> PAR LE TNF α ?	102
IV - LE ROLE DE <i>Ets1</i> DANS LES REPONSES CELLULAIRES AU TNF α DEPEND DU TYPE DE MAPK IMPLIQUE DANS L'EXPRESSION DU GENE <i>c-ets1</i>	105
CONCLUSION	108
ANNEXE	109
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	110

PRESENTATION DU MEMOIRE

Depuis une vingtaine d'années et la découverte du premier oncogène, des progrès considérables ont été réalisés dans la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la formation et le développement des cancers. La modification qualitative ou quantitative de certains gènes participe à la genèse d'une tumeur ou à la progression tumorale. Ces gènes peuvent être formellement classés en trois catégories : (1) les oncogènes et anti-oncogènes dont les produits participent au contrôle de la prolifération cellulaire ; (2) les gènes dont les produits activent ou bloquent la mort cellulaire programmée par apoptose ; (3) les gènes qui interviennent dans la réparation de l'ADN, dont des produits altérés favorisent l'accumulation de mutations somatiques (Kahn, 1995). Les produits des oncogènes et de leurs précurseurs cellulaires normaux, les proto-oncogènes, sont impliqués dans les signaux de croissance cellulaire, dans les mécanismes par lesquels ces signaux sont reçus par la cellule, et dans les relais intracellulaires qui médient l'activation de gènes impliqués dans la croissance cellulaire, la différenciation et le développement.

L'un des oncogènes isolés dans le laboratoire du Professeur Dominique STEHELIN, *v-ets*, est issu du proto-oncogène *c-ets1* qui gouverne la synthèse des facteurs de transcription Ets1. De nombreuses études ont porté sur la structure et la fonction des produits du gène *c-ets1*. Cependant, peu de données existent sur les mécanismes qui régulent son expression en relation avec le développement tumoral. L'étude de ces mécanismes fait l'objet du travail de recherches présenté dans ce mémoire. Partant de l'observation d'une expression de *c-ets1 in vivo* dans des fibroblastes du stroma de carcinomes invasifs, nous avons abordé différents niveaux de régulation de *c-ets1* dans des fibroblastes normaux en culture : (1) au niveau cellulaire sous l'influence de facteurs de croissance et de cytokines, (2) au niveau génique en déterminant les caractéristiques de la régulation de l'expression des produits du gène *c-ets1*, (3) au niveau des réseaux de signalisations intracellulaires qui relie l'activation des récepteurs de surface cellulaire, en particulier celui pour le Tumor Necrosis Factor-alpha à l'expression du gène *c-ets1*.

La thèse comporte trois parties qui décrivent une exploration d'abord descriptive puis de plus en plus mécanistique de l'expression et de la régulation de l'expression du proto-oncogène *c-ets1* dans les fibroblastes humains. Chaque partie se compose d'une introduction qui présente les principaux éléments utiles à sa compréhension, des résultats expérimentaux dont l'essence est exposée sous la forme d'articles complétés de données non publiées, suivis d'une conclusion.

La première partie décrit la localisation préférentielle de l'expression du proto-oncogène *c-ets1* *in vivo* dans des fibroblastes du stroma de carcinomes invasifs humains, ainsi que la mise en place d'un modèle d'études *in vitro* constitué de cultures primaires de fibroblastes humains normaux. La seconde partie est consacrée à la recherche de facteurs extracellulaires, cytokines et facteurs de croissance, qui induisent l'expression de *c-ets1* dans ces fibroblastes. Cette étude nous a permis de sélectionner en particulier une cytokine capable d'induire une expression rapide et élevée de *c-ets1* : le Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF α). L'étude des modalités d'action du TNF α a permis de dégager quelques caractéristiques de la régulation des produits du gène *c-ets1* : cinétique d'expression, régulation transcriptionnelle, stabilité des transcrits et des protéines. La troisième partie est ensuite consacrée à la recherche des voies de transduction qui transportent au niveau intracellulaire le signal du TNF α jusqu'au gène *c-ets1*. Par une étude pharmacologique, nous avons démontré que l'activation de la voie de la sphingomyéline était l'événement premier dans la signalisation intracellulaire médiant l'induction de l'expression du gène *c-ets1* par le TNF α . Ces travaux ont également révélé un réseau complexe de régulations positives et négatives de l'expression du gène *c-ets1* par différentes voies de transduction.

Cette recherche nous a conduit à émettre des hypothèses d'une part sur quelques éléments impliqués dans le contrôle de la mort cellulaire programmée (apoptose), d'autre part sur les rôles possibles du facteur de transcription Ets1 dans ce contrôle. Ces éléments sont rassemblés dans la discussion finale qui intègre également les perspectives de recherches qu'ouvre cette étude.

RESUME

Le proto-oncogène *c-ets1* code les facteurs de transcription Ets1 qui sont potentiellement impliqués *in vitro* dans la régulation de gènes codant des protéinases qui dégradent la matrice extracellulaire. Nous montrons qu'*in vivo*, dans des fibroblastes du stroma de carcinomes invasifs humains, et *in vitro*, dans des fibroblastes en culture primaire stimulés par des facteurs de croissance et des cytokines, l'expression de *c-ets1* est corrélée avec celle de ces protéinases. Ceci suggère que les facteurs de transcription Ets1 sont impliqués dans la régulation de l'expression des protéases qui dégradent la matrice lors de l'invasion tumorale. Dans les fibroblastes en culture, les cytokines pro-inflammatoires (TNF α et IL-1 α) induisent l'expression des ARNs et des protéines *c-ets1* avec une meilleure efficacité que les facteurs de croissance (PDGF, bFGF, EGF). De plus, nous montrons que le gène *c-ets1* est un nouveau gène de réponse précoce au TNF α .

L'étude de la signalisation intracellulaire révèle par ailleurs que cette induction de l'expression de *c-ets1* par le TNF α requiert l'activation d'une Ser/Thr protéine kinase qui est différente des protéine kinases sensibles à l'AMPc (PKA) ou aux esters de phorbol (PKC). Par contre, différents agonistes de la voie de la sphingomyéline induisent l'expression de *c-ets1* dans les fibroblastes, et le TNF α active effectivement cette voie de transduction. La voie de la sphingomyéline est donc impliquée dans la transduction des signaux membranaires du TNF α pour induire l'expression de *c-ets1*. De plus, *c-ets1* est induit par différents stress cellulaires. Ceci suggère que la cascade des protéine kinases activées par le stress est le lien manquant entre l'activation de la voie de la sphingomyéline dans la membrane et la transcription du gène *c-ets1*. Par ailleurs, des stress, des agonistes de la voie de la sphingomyéline et différents inhibiteurs pharmacologiques sont capables d'induire à la fois l'expression de *c-ets1* et l'apoptose des fibroblastes. Ceci suggère que le facteur de transcription Ets1 est impliqué dans la régulation de l'apoptose ou de la résistance des cellules à l'apoptose.

ABSTRACT

The *c-ets1* proto-oncogene encodes Ets1 transcription factors that may be involved *in vitro* in the regulation of genes for matrix-degrading proteinases. We show that *in vivo* in stromal fibroblasts of human invasive carcinomas, and *in vitro* in primary cultures of human fibroblasts stimulated with growth factors and cytokines, *c-ets1* expression correlates with that of these proteases. This suggests that Ets1 transcription factors are involved in the regulation of matrix-degrading proteases expression during tumor invasion. In cultures of fibroblasts, pro-inflammatory cytokines (TNF α et IL-1 α) are more efficient than growth factors (PDGF, bFGF, EGF) in inducing either *c-ets1* transcript and protein expression. Moreover, we demonstrate that *c-ets1* is a new early response gene for TNF α .

The investigation of TNF α intracellular signaling reveals that *c-ets1* expression requires the activation of a Ser/Thr protein kinase different to cAMP- (PKA) and phorbol ester- (PKC) sensitive protein kinases. In contrast, various agonists for the sphingomyelin pathway induce *c-ets1* expression in fibroblasts, and TNF α indeed activates this pathway. This demonstrates that the sphingomyelin pathway is involved in the transduction of TNF α membrane signals for the induction of *c-ets1* expression. Moreover, *c-ets1* is induced by various cellular stress. This suggests that the stress-activated protein kinase cascade is the missing link between the activation of the sphingomyelin pathway in the membrane and the transcription of the *c-ets1* gene. However, stress, agonists for the sphingomyelin pathway and several pharmacologic inhibitors are either able to induce *c-ets1* expression and fibroblasts apoptosis. This suggests that the Ets1 transcription factor is involved in regulating apoptosis or cell resistance to apoptosis.

LISTE DES ILLUSTRATIONS

	Page
Figure 1 : Structure du gène <i>c-ets1</i> et de ses produits	12
Figure 2 : Classification des membres de la famille Ets.	14
Tableau 1 : Exemples de promoteurs régulés par les facteurs de transcription Ets	16
Figure 3 : Schéma de la cascade métastatique	25
Tableau 2 : Les protéinases de la matrice et leurs substrats	26
Figure 4 : Contrôle extracellulaire de l'activité des protéinases de la matrice	27
Figure 5 : Modèle illustrant le rôle de Ets1 dans la réaction stromale	32
Tableau 3 : Principaux facteurs surexprimés dans les tumeurs	34
Figure 6 : Recouvrement des activités des cytokines impliquées dans la formation du tissu de granulation.	35
Tableau 4 : Récapitulatif des activités préférentielles des cytokines fibrogéniques sur les fibroblastes	36
Figure 7 : Caractérisation du promoteur du gène <i>c-ets1</i> humain	39
Figure 8 : Détection des transcrits alternatifs de <i>c-ets1</i> par RT-PCR	46
Figure 9 : Mesure de l'activité transcriptionnelle du gène <i>c-ets1</i> par la technique du <i>Run On</i>	48
Figure 10 : Mise en évidence des néo-transcrits de <i>c-ets1</i> par RT-PCR	48
Figure 11 : La cycloheximide, mais pas le TNF α , stabilise les transcrits <i>c-ets1</i>	50
Figure 12 : Les protéines associées aux récepteurs pour le TNF	56
Figure 13 : La phospholipase A2 et l'acide arachidonique	59
Figure 14 : Les sphingolipides	61
Figure 15 : Les sphingomyélinases dans la signalisation du TNF α	63
Figure 16 : Interactions entre les voies métaboliques de la phosphatidylcholine et de la sphingomyéline	66
Tableau 5 : Les protéine kinases C	70
Tableau 6 : Les activateurs des cascades de MAP kinases	74
Figure 17 : Les cascades des MAP kinases	75
Figure 18 : L'inhibiteur de PC-PLC, D609, induit l'expression de <i>c-ets1</i> bien qu'il inhibe l'activation de la sphingomyélinase acide	83
Figure 19 : Evidences de l'augmentation de l'expression de <i>c-ets1</i> lors de l'inhibition de l'activation ou de l'activité de l'A-SMase	85
Figure 20 : L'induction de <i>c-ets1</i> par le DAG dépend de PKCs sensibles au PMA	87
Figure 21 : L'A-SMase n'est pas indispensable pour l'induction de <i>c-ets1</i> par le TNF α	87
Figure 22 : L'expression de <i>c-ets1</i> augmente avec la sénescence des fibroblastes	87
Figure 23 : Utilisation de lipopeptides pour inhiber la CAPK et la PKC ζ	90
Figure 24 : Induction différentielle de l'apoptose par les inhibiteurs de PKC α et PKC ζ	93
Figure 25 : Différents stress induisent conjointement l'apoptose des fibroblastes et l'expression de <i>c-ets1</i>	96
Figure 26 : Modèle de la signalisation intracellulaire du TNF α impliquée dans l'activation du gène <i>c-ets1</i> dans les fibroblastes	98

ABBREVIATIONS

AA	acide arachidonique
AC	adenylate cyclase
Act D	actinomycine D
A-SMase	sphingomyélinase acide
bFGF	facteur de croissance des fibroblastes de type basique (FGF-2)
CAPK	protéine kinase activatée par le ceramide
CAPP	protéine phosphatase activatée par le ceramide
CHX	cycloheximide
CTX	toxine de cholera
DAG	1,2-diacylglycerol
db-AMPC	dibutyryl AMP cyclique
EGF	facteur de croissance épidermique
HFF	fibroblaste de prépuce humain
IL-1 α	interleukine-1 alpha
MAPKs	protéine kinases activatées par les mitogènes
MMP	métalloproteinase dégradant la matrice
N-SMase	sphingomyélinase neutre
PAI	inhibiteur de l'activateur du plasminogène
PC	phosphatidylcholine
PDGF	facteur de croissance dérivé des plaquettes
PI	phosphatidylinositol
PLA ₂	phospholipase A ₂
PLC	phospholipase C
PLD	phospholipase D
PK	protéine kinase
PKA	protéine kinase dépendant de l'AMP cyclique
PKC	protéine kinase C
PMA	phorbol 12-myristate 13-acetate
PP	protéine phosphatase
PTX	toxine de pertussis
SAPK	protéine kinases activées par les stress
SM	sphingomyéline
SMase	sphingomyélinase
SPN	sphingosine
SPP	sphingosine-1-phosphate
TGF α	transforming growth factor-alpha
TGF β	transforming growth factor-beta
TNF α	tumor necrosis factor-alpha
TNF-R	tumor necrosis factor receptor
tPA	activateur du plasminogène de type tissulaire
uPA	activateur du plasminogène de type urokinase

PREMIERE PARTIE

**EXPRESSION DU PROTO-ONCOGENE *c-ets1*
DANS DES FIBROBLASTES DE CARCINOMES INVASIFS**

PREMIERE PARTIE

EXPRESSION DU PROTO-ONCOGENE *c-ets1* DANS DES FIBROBLASTES DE CARCINOMES INVASIFS

I - INTRODUCTION

A - LE PROTO-ONCOGENE *c-ets1*

1 - Le gène *c-ets1* et ses produits

a) - La structure génomique du gène *c-ets1*

Le proto-oncogène *c-ets1* est l'homologue cellulaire normal de l'oncogène *v-ets* isolé à partir du génome du rétrovirus leucémogène aviaire E26 (Leprince et al., 1983; Nunn et al., 1983). Dans le génome humain, le locus du gène *c-ets1* est localisé sur le bras long du chromosome 11 (11q23-24) et s'étend sur une portion d'ADN génomique de plus de 60 kb (De Taisne et al., 1984). Le gène *c-ets1* comporte huit exons dénommés A, III, IV, V, VI, VII, VIII et IX, précédés d'une région promotrice de 2 kb (Figure 1) (Jorcyk et al., 1991). L'analyse de la séquence du promoteur du gène *c-ets1* montre qu'il est dépourvu des motifs classiques TATA ou CCAAT trouvés dans la plupart des gènes transcrits par l'ARN polymérase II (Jorcyk et al., 1991; Oka et al., 1991). L'initiation de la transcription pourrait par contre être contrôlée par l'un des deux autres mécanismes d'initiation de la transcription dirigés respectivement par des "boîtes GC" ou par un "initiateur" (pour revue, voir Smale and Baltimore, 1989). Le promoteur *c-ets1* contient d'une part de nombreux sites potentiels de liaison pour le facteur de transcription Sp1 (Oka et al., 1991); ces sites riches en nucléotides G et C, "boîtes GC", sont retrouvés le plus souvent dans des gènes de ménage (*housekeeping genes*) constitutivement exprimés. Le promoteur *c-ets1* contient d'autre part un motif en partie similaire à la séquence d'un "initiateur" (Inr, *initiator*) (Oka et al., 1991), qui est présent notamment dans des gènes régulés lors de la différenciation ou du développement (gènes homéotiques de drosophile, gènes régulés pendant l'immunodifférenciation chez les mammifères).

b) - Les transcrits *c-ets1*

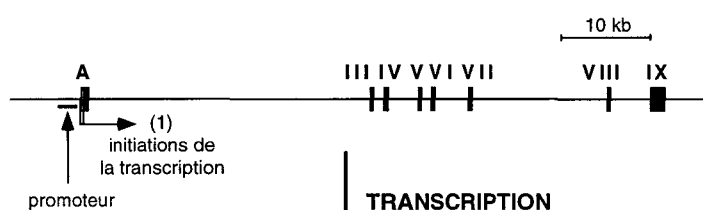
Le proto-oncogène *c-ets1* s'exprime majoritairement sous la forme d'un ARN messager d'une taille apparente de 6,8 kb. Cependant, plusieurs variants transcriptionnels ont été mis en évidence : ils diffèrent par l'utilisation de différents sites d'initiation de la transcription, par l'épissage alternatif des exons IV et/ou VII et par une terminaison de la transcription à des sites de polyadénylation différents (Figure 1) :

- L'hétérogénéité de l'extrémité 5' des transcrits *c-ets1* résulte de l'imprécision de l'initiation de la transcription, qui peut s'opérer au niveau de sites multiples. Ceux-ci sont regroupés dans une portion d'environ 14 paires de bases située à une cinquantaine de bases en amont du site d'initiation de la traduction (Jorcyk et al., 1991; Oka et al., 1991).

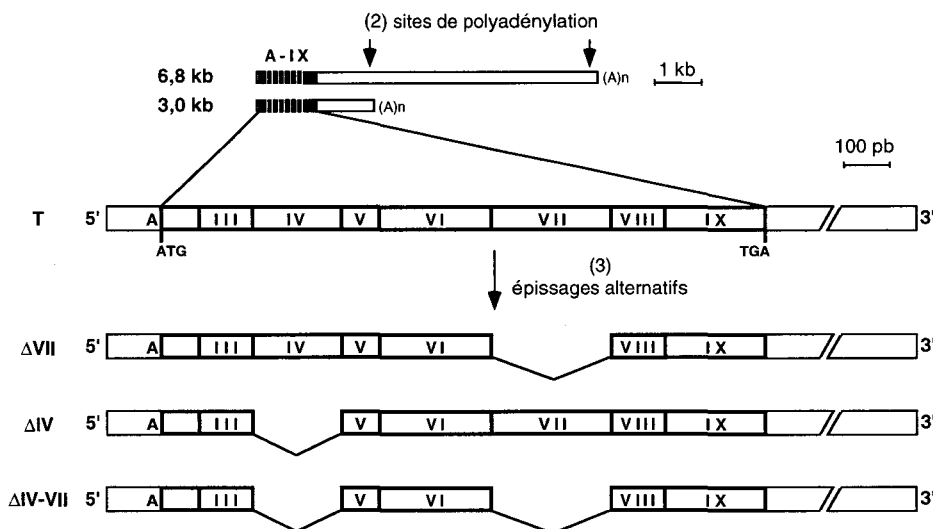
- L'observation directe des transcrits *c-ets1* par la technique de Northern blot fait apparaître des transcrits d'environ 6,8 et 3,0 kb. Alors que le transcrit de 6,8 kb est le produit majoritairement exprimé à partir du gène *c-ets1*, celui de 3,0 kb résulte d'un arrêt prématuré de la transcription à un site de polyadénylation mineur situé en aval (3') de la région codante (Collyn-d'Hooghe et al., 1993). L'utilisation de ce site de polyadénylation alternatif n'altère donc pas la capacité des transcrits de 3,0 kb à permettre la synthèse de protéines Ets1 de pleine longueur.

- L'épissage alternatif des exons IV et/ou VII a été mis en évidence dans plusieurs types de lignées cellulaires (Reddy and Rao, 1988; Koizumi et al., 1990; Jorcyk et al., 1991). Des transcrits sans exon IV; sans exon VII, ou sans les deux exons IV et VII sont exprimés, bien que très minoritairement par rapport aux transcrits de pleine longueur (avec les exons IV et VII). Ces quatre types de transcrits ont une même taille apparente de 6,8 kb, et seule la technique de RT-PCR permet de les distinguer. Les exons IV et VII étant codants, les transcrits alternatifs génèrent des isoformes protéiques présentant des différences fonctionnelles (voir la deuxième partie, paragraphe I-C-3).

Le gène *c-ets1*



Les transcrits *c-ets1*



Les protéines Ets1 synthétisées à partir des transcrits de pleine longueur (T)

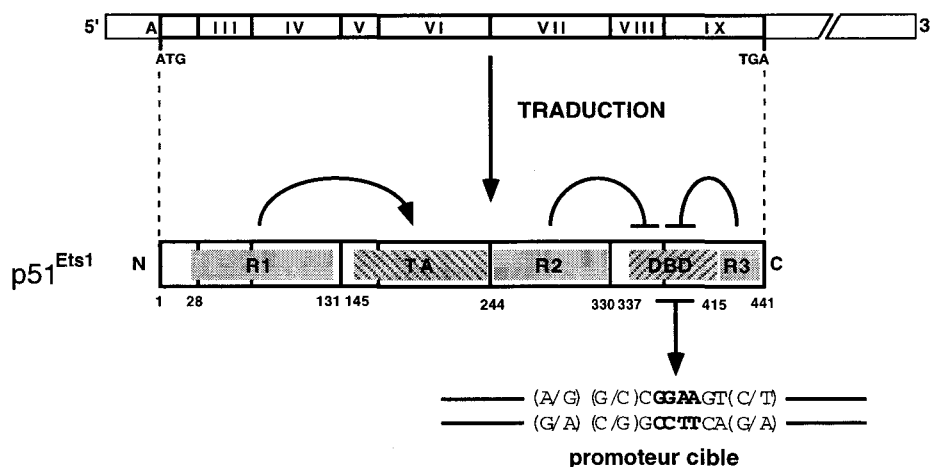


Figure 1 : Structure du gène *c-ets1* et de ses produits. En aval d'un promoteur de 2 kb, le gène *c-ets1* comprend 8 exons, A et III à IX, répartis sur plus de 60 kb. Différents types d'ARN messagers sont exprimés à partir du gène *c-ets1* et diffèrent par (1) l'initiation de la transcription, (2) la terminaison de la transcription déterminé par leur site de polyadénylation, (3) l'épissage alternatif des exons IV et/ou VII (Δ IV, Δ VII, Δ IV-VII). La région codante est indiquée en noir. Les protéines Ets1 synthétisées à partir des transcrits de pleine longueur (T), comprennent différents domaines : TA, le domaine de transactivation ; DBD (DNA binding domain), le domaine de liaison à l'ADN sur des séquences spécifiques (3) ; R1, R2, R3 des domaines de régulation positive (\rightarrow) ou négative (\leftarrow) de l'activité transactivatrice ou de la liaison à l'ADN. Ces domaines sont repérés par le numéro des acides aminés bordants.

c) - Les facteurs de transcription Ets1

Les transcrits *c-ets-1* de pleine longueur de 6,8 kb dirigent la synthèse de protéines Ets-1 de 441 acides aminés et de taille apparente de 51 kDa. Les protéines Ets-1 sont des facteurs de transcription : localisées dans le noyau, elles sont capables de se lier à l'ADN sur des séquences nucléotidiques spécifiques pour réguler l'activité de gènes cibles. La caractérisation de mutants de délétion des protéines Ets1 a mis en évidence différents domaines : le domaine transactivateur (Schneikert et al., 1992), le domaine de liaison à l'ADN comportant un signal de localisation nucléaire (Boulukos et al., 1989), et trois domaines de régulation intramoléculaire, R1, R2 et R3, qui modulent les activités de liaison à l'ADN et de transactivation des protéines Ets1 (Hagman and Grosschedl, 1992; Wasylyk et al., 1992) (Figure 1).

Le domaine de liaison à l'ADN et le site de localisation nucléaire des protéines Ets1, sont situés dans une portion d'environ 85 acides aminés qui est très conservée entre les protéines Ets1 de différentes espèces d'eucaryotes, et qui est également présent dans d'autres protéines apparentées. Ce domaine, appelé domaine Ets, a permis de regrouper l'ensemble de ces protéines dans une nouvelle famille de facteurs de transcription, la famille Ets (Figure 2). Plus d'une trentaine de membres de cette famille ont d'ores et déjà été identifiés dans de nombreuses espèces de métazoaires allant de la *Drosophile* à l'Homme (Lautenberger et al., 1992; MacLeod et al., 1992; Laudet et al., 1993; Wasylyk et al., 1993). Parmi ces protéines se distinguent notamment Ets-2, Erg et Fli-1 (ErgB) qui sont les plus proches parents de Ets1, avec qui ils partagent une deuxième région d'homologie dans leur partie amino-terminale.

d) - Les gènes cibles des facteurs de transcription Ets

Par leur domaine Ets, les protéines de la famille Ets fixent spécifiquement une séquence d'ADN riche en purines appelée EBS (*Ets Binding Site*) ou PEA3 (*Polyoma Enhancer Activator-3*). La comparaison des sites de fixation des protéines Ets dans différents promoteurs cibles a permis de définir la séquence consensuelle reconnue par les protéines Ets : (A/G)C(C/A)GGA(A/T)GT. Dans cette séquence, le coeur central de type GGA(A/T) positionné dans le grand sillon de la double hélice d'ADN, donne la spécificité de fixation pour les membres de la famille Ets par

rapport aux autres familles de facteurs de transcription. Les nucléotides flanquants déterminent la spécificité de liaison entre les différents membres de la famille Ets (Bosselut et al., 1993), et la séquence la mieux reconnue par les protéines Ets1 est CCGGAAGT (Fisher et al., 1991; Mavrothalassitis et al., 1994). Selon le gène cible et le type cellulaire, les facteurs de transcription Ets peuvent activer ou réprimer la transcription (pour revue, voir Bhat et al., 1996). Les cibles des facteurs de transcription Ets comprennent des promoteurs viraux ou cellulaires (quelques exemples sont donnés dans le Tableau 1).

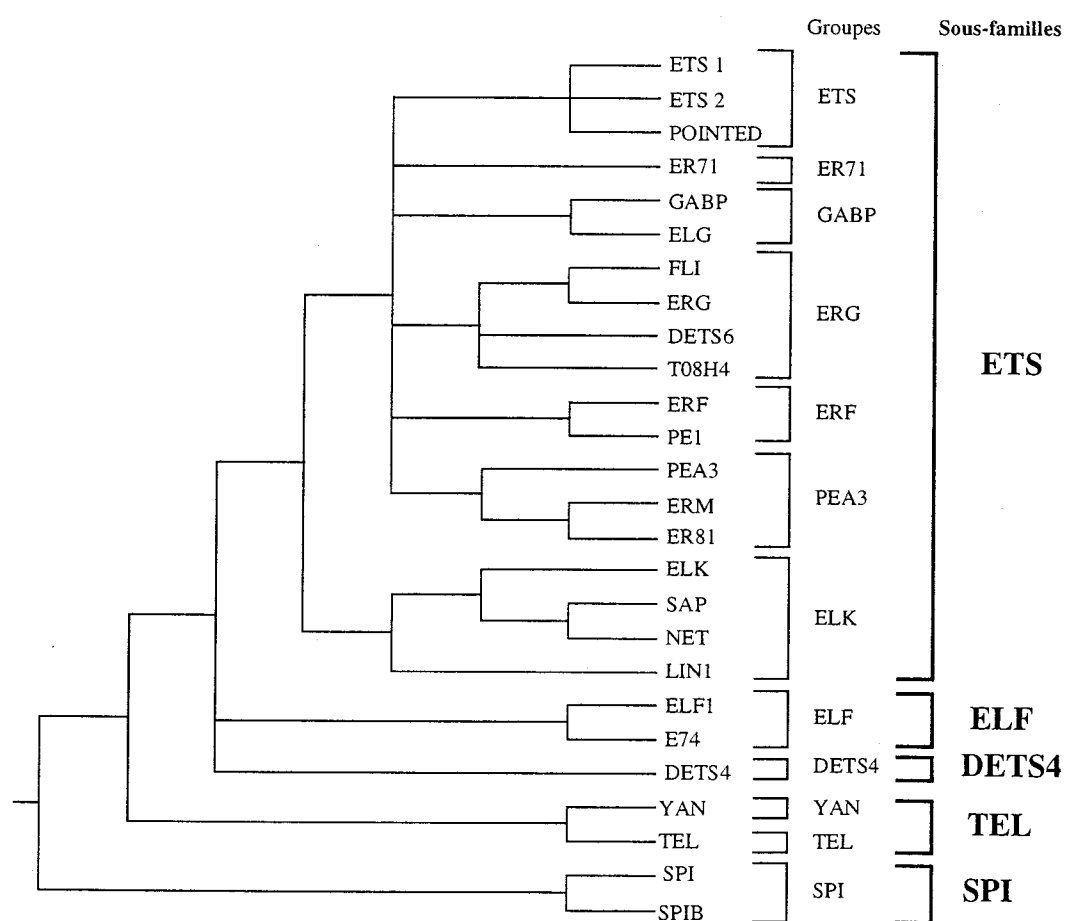


Figure 2 : Classification des membres de la famille Ets. Arbre phylogénétique établi en 1996 à partir d'une compilation de résultats de différentes méthodes permettant de déterminer le niveau de divergence des membres de la famille Ets au niveau de la séquence de leur domaine de liaison à l'ADN (d'après Laudet V., communication personnelle).

e) - Coopération de Ets avec d'autres facteurs de transcription

Les protéines de la famille Ets qui se lient à l'ADN en tant que monomères, sont de faibles régulateurs transcriptionnels *in vitro* quand ils agissent seuls. Leur capacité à réguler l'expression de gènes cibles *in vivo* dépend principalement de leur aptitude à interagir avec d'autres facteurs de transcription plutôt que de leur liaison spécifique à des séquences d'ADN appropriées (pour revue voir Janknecht and Nordheim, 1993; Crepieux et al., 1994). Les protéines Ets1 coopèrent notamment avec les facteurs de transcription Sp1 (Gégonne et al., 1993), AP-1 (Nerlov et al., 1992), GATA-1 (Lemarchandel et al., 1993) ou le facteur CBF (Wotton et al., 1994) par des interactions protéine-protéine. Cependant, Sp1 et CBF potentialisent la liaison à l'ADN des protéines Ets1, alors que AP-1 et GATA-1 accroissent l'activité transactivatrice des protéines Ets1.

Bien que les facteurs de transcription Ets soient potentiellement capables de réguler l'expression d'un grand nombre de gènes *in vitro*, les interactions des protéines Ets avec d'autres facteurs de transcription permettent de sélectionner ces gènes en fonction du type cellulaire et des stimuli, et déterminent le type de régulation (activation/répression) de ces gènes.

2 - Les sites d'expression de *c-ets1*

a) - Les cellules lymphoïdes

Dans l'embryon, une expression élevée de *c-ets1* est détectée dans des organes lymphoïdes tels que le thymus, la moelle osseuse, la rate et la bourse de Fabricius (chez les oiseaux) (Chen, 1985; Ghysdael et al., 1986; Bhat et al., 1987). Dans le thymus foetal, l'expression de *c-ets1* coïncide avec l'apparition de la sous-population de thymocytes matures CD4+/CD8- qui se différencie à partir des thymocytes corticaux CD4+/CD8+ (Bhat et al., 1989). Dans l'organisme adulte, l'expression de *c-ets1* est faible dans les lymphocytes T périphériques CD4+ (*helper/inducer*) qui se développent à partir des thymocytes CD4+/CD8- (Bhat et al., 1989). Ceci suggère que les produits du gène *c-ets1* sont impliqués dans le développement et la maturation fonctionnelle des thymocytes en lymphocytes T périphériques CD4+.

A Liste de gènes dont les promoteurs contiennent des sites de fixation pour les protéines de la famille Ets.

virus

enhancer du virus du Polyome
 LTR du Murine Sarcoma Virus
 LTR de HIV-1
 enhancer de HIV-2
 LTR de HTLV-1
 enhancer de E1A de l'adénovirus
 promoteur du gène E4 de l'adénovirus
 enhancer du Moloney-Murine Leukemia Virus
 promoteur précoce de l'Herpes Simplex Virus

récepteurs

chaîne α des récepteurs des cellules T (TCR α)
 chaîne β des récepteurs des cellules T (TCR β)
 récepteur α pour l'interleukine-2
 récepteur pour la transferrine

protéinases de la matrice extracellulaire

stromélysine-1
 collagénase-1
 activateur du plasminogène de type urokinase (uPA)
 collagénase-IV de 72 kDa (gélatinase A)

facteurs de croissance

sous-unité α du NGF murin
 interleukine-2 (IL-2)
 interleukine-3 (IL-3)
 interleukine-4 (IL-4)
 interleukine-6 (IL-6)

proto-oncogènes

c-myc
c-fms
c-jun
 junB
 junD
c-ets1
c-fos

autres

CD2, CD3, CD4
 CMH-I murin gène H2-K
 CMH-II murin gène 1-A β
 enhancer 3' du gène de l'Ig kappa
 etc.

B Promoteurs régulés par les facteurs de transcription de la famille Ets en coopération avec les facteurs de transcription AP-1.

<p style="text-align: center;">EBS →</p> <p style="text-align: center;">CGAGGA AGT GACT AA</p> <p style="text-align: center;">AP-1 →</p>	<p>virus du polyome (Wasylyk et al., 1990)</p>
<p style="text-align: center;">EBS →</p> <p style="text-align: center;">-24 41 AGGAGGAAATGAAGTCATCTG</p> <p style="text-align: center;">AP-1 →</p>	<p>Mo-uPA (Stacey et al., 1995)</p>
<p style="text-align: center;">EBS →</p> <p style="text-align: center;">-2 18 GACAGGA AGCACTTCCTGGA</p> <p style="text-align: center;">EBS →</p>	<p>Hu-Stromélysine-1 (Wasylyk et al., 1990)</p>
<p style="text-align: center;">EBS →</p> <p style="text-align: center;">-9 0 GAGGATGTTATAA AGCATGAGTCA</p> <p style="text-align: center;">AP-1 →</p>	<p>Hu-Collagénase-1 (Gutman and Wasylyk, 1991)</p>
<p style="text-align: center;">EBS →</p> <p style="text-align: center;">+7 96 AGCGGATGTGGCTAAGGCTGAGTCATC</p> <p style="text-align: center;">AP-1 →</p>	<p>Hu-Kératine-18 (Pankov et al., 1994)</p>
<p style="text-align: center;">AP-1 →</p> <p style="text-align: center;">-8 56 GATGA GT AATGCGT CCAGGAAGCCTG</p> <p style="text-align: center;">EBS →</p>	<p>Hu-TIMP-1 (inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases) (Logan et al., 1996)</p>

Tableau 1 : Exemples de promoteurs régulés par les facteurs de transcription Ets. Abréviations : CMH, complexe majeur d'histocompatibilité ; LTR, Long Terminal Repeat ; EBS, site de fixation pour les facteurs de transcription Ets/PEA3 ; AP-1, site de fixation pour les facteurs de transcription AP-1 (Jun-Jun ou Jun-Fos). (d'après Wasylyk et al., 1993; Janknecht and Nordheim, 1993; Crépieux et al., 1994).

Par ailleurs, l'expression du gène *c-ets1* est élevée dans différentes lignées de cellules hématopoïétiques transformées, en particulier dans des lignées de lymphocytes T et B (Chen, 1985; Collyn-d'Hooghe et al., 1993; Romano-Spica et al., 1994). Différentes études montrent que l'expression de *c-ets1* est modulée en réponse à l'activation des cellules T (Pognonec et al., 1988). Dans des lymphocytes T périphériques cultivés *ex vivo*, l'expression élevée du gène *c-ets1* s'éteint transitoirement suite à une activation mitogénique *via* le complexe récepteur des cellules T (TCR)/CD3, par des esters de phorbol ou par l'ionomycine (Bhat et al., 1990). Inversement, la stimulation de l'activité cytotoxique d'un hybridome T murin (CTL, *cytotoxic T lymphocytes*) induit l'augmentation rapide et transitoire de l'expression de *c-ets1* indépendamment de la prolifération cellulaire (Kaufmann et al., 1987).

L'exploration de l'expression de *c-ets1* dans le système hématopoïétique *in vivo* et *in vitro* montre que certaines fonctions pour les facteurs de transcription Ets1 sont associées au développement des thymocytes dans l'embryon et à l'activation des lymphocytes T périphériques chez l'adulte.

b) - Les cellules endothéliales lors de l'angiogenèse

Au cours du développement, *c-ets1* s'exprime transitoirement dans les cellules endothéliales lors de la mise en place du système vasculaire de l'embryon par vasculogenèse ou angiogenèse. Cette expression s'éteint ensuite lorsque les vaisseaux sont formés (Vandenbunder et al., 1989). Chez l'adulte, l'expression de *c-ets1* dans les cellules endothéliales peut réapparaître lors de processus normaux ou pathologiques qui impliquent une angiogenèse tels que de l'implantation de l'embryon et la placentation (Grevin et al., 1993), la cicatrisation des blessures (Wernert et al., 1992), ou la vascularisation des tumeurs (Wernert et al., 1992; Vandenbunder et al., 1993).

Les facteurs de transcription Ets1 sont donc susceptibles de participer à un second processus biologique, l'angiogenèse.

c) - Les cellules du mésenchyme lors de processus invasifs

Des analyses d'hybridation *in situ* sur des embryons de Poulet ou de Souris ont montré que l'expression de *c-ets1* n'est pas restreinte aux seules cellules endothéliales et hématopoïétiques, mais est également localisée dans une grande variété de cellules du mésoderme. L'expression de *c-ets1* est d'abord détectée au cours de la gastrulation, dans le mésoderme au moment de la mise en place des feuilletts embryonnaires (Queva et al., 1993). Au cours des stades ultérieurs du développement embryonnaire, l'expression de *c-ets1* est généralement absente des épithélia, qu'ils soient dérivés de l'ectoderme, du mésoderme ou de l'endoderme (Kola et al., 1993; Queva et al., 1993). Par contre, *c-ets1* s'exprime dans des cellules de la crête neurale qui se dissocient à partir de l'épithélium du tube neural, ainsi que dans des cellules du mésenchyme adjacentes à des structures épithéliales lors de l'induction d'interactions épithélio-mésenchymateuses. Cette expression a notamment été décrite dans le derme avant la formation des structures cutanées, dans le bourgeon de membre, dans le mésenchyme entourant le gésier ou l'intestin, dans le poumon, et lors de la tubulogenèse dans le rein (Desbiens et al., 1991; Kola et al., 1993; Queva et al., 1993; Maroulakou et al., 1994). Au cours des stades ultérieurs du développement embryonnaire et dans la plupart des tissus adultes correspondants, l'expression de *c-ets1* est absente des cellules mésenchymateuses. L'expression transitoire de *c-ets1* dans le mésenchyme au cours de l'organogenèse et de la morphogenèse de l'embryon suggère un troisième type de fonctions pour les facteurs de transcription Ets1 en relation avec l'occurrence de processus invasifs qui requièrent des interactions entre des cellules du mésenchyme et des structures épithéliales.

Au cours du développement tumoral, de telles interactions sont à nouveau requises et interviennent notamment dans la formation du stroma tumoral et dans les processus d'envahissement des cellules cancéreuses lors de l'invasion et de la métastase.

3 - Les propriétés oncogéniques de *c-ets1*

Différents arguments suggèrent que les facteurs de transcription Ets1 pourraient avoir un rôle dans la transformation cellulaire :

- L'oncogène *v-ets* a initialement été isolé au sein du génome du rétrovirus de l'érythroblastose aviaire E26 (Leprince et al., 1983; Nunn et al., 1983). L'effet leucémogène et transformant de E26 résulte de l'intégration dans son génome de deux oncogènes d'origine cellulaire, *v-myb* et *v-ets*, qui s'expriment dans E26 sous la forme d'une protéine de fusion, la P135^{gag-myb-ets}. E26 induit des leucémies mixtes érythroïde et myéloïde ainsi que des lymphomes chez le Poulet, et transforme des fibroblastes, des érythroblastes et des myéloblastes *in vitro* (pour revue, voir Bhat et al., 1996). L'oncogène *v-myb*, transduit seul dans un autre rétrovirus aviaire, AMV (*avian myeloblastosis virus*), confère à celui-ci la capacité de transformer des cellules myéloïdes. L'oncogène *v-ets*, co-transduit avec *v-myb* dans le génome du rétrovirus E26 permet à celui-ci de transformer en plus des cellules érythroïdes (Metz and Graf, 1991 ; Metz and Graf, 1991; Rossi et al., 1996).

- Le locus *c-ets1*, situé dans la région q23-24 du chromosome 11, est un site de fréquentes cassures chromosomiques impliquées dans un certain nombre de leucémies et de lymphomes spécifiques (Rovigatti et al., 1986; Sacchi et al., 1986). Dans certaines formes de leucémies infantiles acquises résultant d'une translocation entre les chromosomes 11 et 4, le point de cassure sur le chromosome 11 survient à proximité du gène *c-ets1* (Sacchi et al., 1986).

- La transfection de lignées de fibroblastes murins NIH3T3 par un vecteur permettant la surexpression du gène *c-ets1* suffit à induire leur transformation : ces cellules deviennent capables de former des clones en agar mou et d'induire des tumeurs dans des souris *nude* (Seth and Papas, 1990).

- Des expériences de recombinaison homologue chez la Souris en utilisant le système de complémentation RAG-2^{-/-} et des cellules souches embryonnaires (ES), démontrent que les protéines Ets1 sont nécessaires pour l'activation mitogène et la survie des cellules des lignées T et B (Bories et al., 1995; Muthusamy et al., 1995). L'inactivation du gène *c-ets1* se traduit par une augmentation de la mort cellulaire par apoptose spontanée de ces cellules *in vitro*.

B - LES CARCINOMES

1 - La structure histologique des carcinomes

a) - Le parenchyme et le stroma

Les carcinomes sont des "tumeurs solides" d'origine épithéliale. Ils sont composés de deux compartiments distincts et interdépendants, le parenchyme et le stroma (pour revue, voir Dvorak, 1988; Delpech, 1991).

Le parenchyme est constitué des cellules néoplasiques qui résultent de la transformation de cellules normales de l'hôte par une série d'événements cancérogènes. Ces événements : infection par un virus, irradiation, exposition à des agents chimiques, etc., altèrent les mécanismes normaux du contrôle de la prolifération cellulaire. La division anarchique des cellules néoplasiques forme des foyers de cellules cancéreuses étroitement associées les unes aux autres par des jonctions intercellulaires complexes.

Les cellules cancéreuses sont dispersées dans un tissu de soutien particulier qu'elles induisent, le stroma, qui leur fournit le support structural et nourricier nécessaire pour l'accroissement de la masse tumorale au delà de 1 à 2 mm de diamètre. Dans les carcinomes, une lame basale sépare souvent le parenchyme du stroma.

Par définition, le stroma est l'ensemble des formations cellulaires et extracellulaires qui accompagnent les cellules cancéreuses pour réaliser une tumeur. Il est toujours présent dans les carcinomes. Il est plus ou moins développé selon l'origine de la tumeur, particulièrement important dans toutes les formes de carcinomes invasifs. Le stroma réalise l'interface obligée entre la tumeur et le reste de l'organisme, à travers laquelle se font les échanges nutritifs et respiratoires et l'élimination des déchets qui sont nécessaires au maintien et à l'accroissement de la masse tumorale. Aux premiers stades de développement de la tumeur, le stroma sert également de support structural au parenchyme et encapsule celui-ci pour l'isoler des tissus sains de l'hôte.

b) - La composition du stroma tumoral

Le stroma résulte d'une modification du tissu conjonctif pré-existant. Il est constitué comme celui-ci d'éléments provenant du sang circulant (eau, protéines plasmatiques, cellules inflammatoires de différents types telles que des macrophages, polynucléaires ou lymphocytes) ainsi que d'éléments présents dans les tissus conjonctifs environnants (matrice extracellulaire interstitielle, fibroblastes, vaisseaux sanguins, vaisseaux lymphatiques et filets nerveux) (pour revue, voir Dvorak, 1988; Delpéch, 1991).

La matrice extracellulaire interstitielle est constituée d'un enchevêtrement de macromolécules, glycosaminoglycannes et protéines fibreuses, principalement synthétisées par les fibroblastes. Elle a à la fois un rôle structural et un rôle fonctionnel. D'une part, les macromolécules de la matrice constituent une charpente architecturale qui stabilise la structure physique des tissus. D'autre part, elle régule le comportement des cellules et influence la prolifération, la différenciation, la migration, la forme et les fonctions métaboliques des cellules. Elle constitue aussi un réservoir de facteurs de croissance.

La lame basale qui entoure les foyers de cellules épithéliales néoplasiques et également d'autres types de tissus tels que les muscles et les vaisseaux sanguins, est constituée d'une matrice extracellulaire spécialisée organisée en feuillets denses. Elle sert de filtre moléculaire hautement sélectif, détermine la polarité des cellules épithéliales, influence le métabolisme cellulaire et organise les protéines dans les membranes plasmiques des cellules adjacentes. Dans les carcinomes invasifs, la lame basale est souvent rompue notamment au niveau de sites d'invasion tumorale. Dans les autres types de tumeurs telles que des lymphomes ou des sarcomes, les cellules malignes sont directement en contact avec les éléments du stroma.

Bien qu'étant dérivé du tissu conjonctif, le stroma tumoral présente des différences qualitatives et quantitatives quant aux macromolécules qui constituent sa matrice extracellulaire. Le stroma se caractérise par une surabondance de fibres de collagène et de fibres élastiques qui lui donnent une consistance fibreuse (ou scirrheuse), qui s'apparente au tissu de granulation qui se forme transitoirement lors de l'inflammation et de la cicatrisation de blessures. La surproduction des

composants de la matrice est réalisée par les fibroblastes, mais également par des myofibroblastes. Ceux-ci sont notamment abondants dans la plupart des cancers mammaires et proviennent de la différenciation et de la prolifération de fibroblastes sous l'action de facteurs solubles (notamment le TGF β) produits par les cellules cancéreuses. Les myofibroblastes possèdent des propriétés contractiles dues à la présence dans leur cytoplasme de microfilaments d' α -SM-actine semblables à ceux des cellules de muscle lisse des vaisseaux sanguins. Ils induisent une contraction de la matrice interstitielle qui pourrait faciliter le développement de la tumeur et limiter les réponses cellulaires immunes (Grégoire and Lieubeau, 1995).

De plus, dans les tumeurs, les vaisseaux sanguins néoformés se caractérisent par une hyperperméabilité persistante pour le plasma et les protéines plasmatiques, ainsi que par une incapacité à répondre à des changements dans le métabolisme tissulaire en modulant le flux sanguin.

c) - La formation du stroma tumoral

On peut distinguer trois étapes dans la formation du stroma tumoral : une infiltration de cellules inflammatoires, une réaction vasculaire résultant d'une angiogenèse, et une desmoplasie du tissu conjonctif préexistant.

Quelques cellules inflammatoires (macrophages, polynucléaires, lymphocytes) sont attirées dans le stroma par chimiotactisme. Ces cellules sont cependant peu actives et semblent généralement ne pas pouvoir accomplir leur rôle normal de défense de l'hôte, notamment par des mécanismes de cytotoxicité cellulaire.

L'angiogenèse est la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir du réseau vasculaire préexistant à proximité de la tumeur (pour revue, voir Weinstat-Saslow and Steeg, 1994). Elle se réalise en plusieurs étapes : la dissolution de la membrane basale qui entoure les cellules endothéliales, généralement au niveau des veinules post-capillaires ; la migration des cellules endothéliales vers la tumeur ; la prolifération des cellules endothéliales au front de migration ; la canalisation, le branchement et la formation des boucles vasculaires ; la formation d'une nouvelle membrane basale autour des vaisseaux sanguins. L'angiogenèse est induite par les cellules

tumorales et est indispensable au maintien et au développement de la masse tumorale, sans quoi la tumeur peut régresser voire se nécroser. Le réseau vasculaire néoformé se développe vers la tumeur et lui fournit les nutriments et les échanges gazeux essentiels à la prolifération des cellules cancéreuses. De plus, il favorise par la suite la progression des cellules cancéreuses vers des tissus de l'hôte plus éloignés où elles pourront établir des tumeurs secondaires.

La desmoplasie est la formation en excès de tissu conjonctif situé à l'intérieur et au contact de la tumeur. Elle résulte d'une prolifération des fibroblastes du tissu conjonctif préexistant, et de leur activation pour la production des différents composants de la matrice extracellulaire interstitielle (Grégoire and Lieubeau, 1995).

2 - Les mécanismes moléculaires de l'invasion

a) - De la tumeur primaire aux métastases

Des tumeurs bénignes deviennent malignes quand certaines cellules néoplasiques acquièrent des propriétés invasives qui leur permettent de s'échapper de la tumeur primitive, de franchir les barrières anatomiques telles que les membranes basales, de migrer dans le stroma interstitiel, et de former des métastases dans des organes éloignés de la tumeur primitive (Figure 3).

Dans les tumeurs invasives, deux processus d'invasion coexistent : l'envahissement des tissus normaux adjacents par les cellules cancéreuses, et l'invasion de la tumeur par les cellules endothéliales des capillaires sanguins. Par l'intermédiaire des vaisseaux lymphatiques et des capillaires sanguins qui irriguent la tumeur, les cellules malignes sont capables de s'échapper de la tumeur primitive et de se disséminer dans le système circulatoire ; ce qui permet à certaines d'entre elles d'atteindre d'autres tissus et d'y former des tumeurs secondaires à distance de la tumeur primaire.

La transition d'une tumeur *in situ* en tumeur invasive résulte de la perte des systèmes d'ancrage qui relient les cellules cancéreuses les unes aux autres ou à la matrice extracellulaire, de l'acquisition de la motilité par les cellules cancéreuses, et de la dégradation de la matrice extracellulaire qui compose l'espace intercellulaire et les membranes basales qui entourent les tissus.

b) - La dégradation de la matrice extracellulaire

L'invasion des tissus normaux de l'hôte nécessite la dégradation au moins temporaire de certains composants des matrices extracellulaires qui composent les lames basales et le stroma interstitiel. Cette dégradation résulte d'un déséquilibre entre la synthèse et la dégradation des composants de la matrice, l'activation et l'inactivation d'enzymes qui dégradent ces composants. Diverses études ont établi une corrélation entre la sécrétion d'hydrolases par différentes lignées de cellules cancéreuses en culture et les propriétés invasives de celles-ci. Ces activités hydrolases sont nécessaires à toutes les étapes de la cascade métastatique : (1) l'échappement des cellules cancéreuses de la tumeur primaire et le franchissement de la lame basale ; (2) la progression des cellules cancéreuses dans le stroma pour atteindre les vaisseaux sanguins ; (3) le franchissement de la lame basale qui entoure les vaisseaux sanguins par intravasation pour gagner la circulation sanguine ; (4) la sortie du système circulatoire au niveau du tissu cible ; (5) l'envahissement du tissu cible et l'établissement d'une tumeur secondaire ou métastase (Figure 3).

Les hydrolases sont classées en quatre catégories : sérine protéinases, métalloprotéinases, cystéine protéinases, et glycosidases (pour revue, voir Matrisian, 1990; Mignatti and Rifkin, 1993; Wolf et al., 1994).

Les principales sérine protéinases sont les activateurs du plasminogène (PA) de type urokinase (uPA) ou de type tissulaire (tPA). Bien qu'étant tous deux impliqués dans l'activation de la plasmine, le tPA et l'uPA ont des rôles physiologiques distincts : le tPA est principalement impliqué dans la lyse des caillots alors que l'uPA régule des processus de "remodelage" tissulaire. L'activité des activateurs du plasminogène est modulée par des inhibiteurs de sérine protéinases appartenant à la superfamille des serpins tels que l'inhibiteur des PA de type 1 (PAI-1), de type 2 (PAI-2), et la protéase nexine 1 (PN-1).

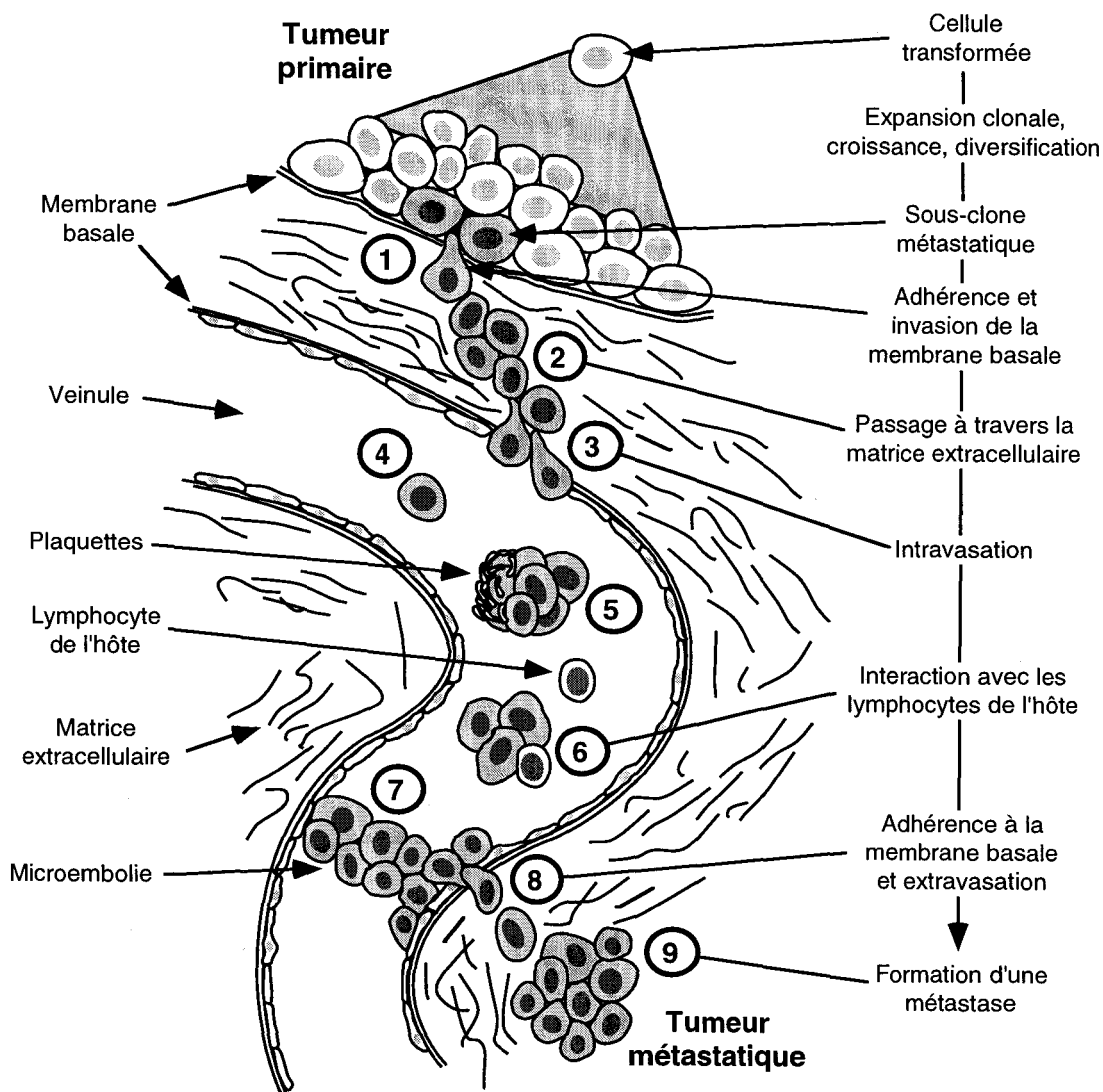


Figure 3 : Schéma de la cascade métastatique. Illustration schématique des étapes séquentielles impliquées dans la dissémination d'une tumeur par le système circulatoire. (1) Une cellule ou un groupe de cellules s'échappe de la tumeur primaire et prolifère. (2) Par un jeu de mutations-sélections, un certain nombre de cellules meurent et seules subsistent celles qui s'adaptent aux conditions locales. (3) Ces cellules ont la capacité de franchir la paroi des vaisseaux sanguins ou lymphatiques, (4) sont transportées dans les vaisseaux où (5) elles peuvent éventuellement proliférer ou former des microagrégats. (6) Là encore, seules les cellules ayant un avantage sélectif (celles qui sont, en particulier, immunorésistantes) survivront. (7) Ces cellules s'arrêtent de migrer, et se fixent à la paroi du vaisseau formant une microembolie. (8) Les cellules ayant réussi à résister aux conditions locales et à franchir la paroi du capillaire migrent dans le tissu interstitiel et y prolifèrent. (9) Après un nouveau cycle de mutations-sélections, une tumeur secondaire se reforme. (D'après Boyer et al., 1990).

Les métalloprotéinases (MMP, *matrix metalloproteinases*) produites par les cellules invasives ont des caractéristiques communes : (1) elles contiennent un ion zinc dans leur site actif ; (2) elles ont des homologues de séquence entre elles; (3) elles sont sécrétées sous la forme de proenzymes inactives et deviennent actives par clivage protéolytique nécessaire partiel ; (4) elles sont inhibées par des inhibiteurs tissulaires spécifiques de métalloprotéinases (TIMPs). La famille des métalloprotéinases se subdivise en trois sous-classes :

- les collagénases interstitielles dont l'activité principale est celle de la collagénase de type I ;
- les gélatinases qui comprennent les collagénases de type IV de 72 kDa et de 92 kDa ;
- les stromélysines qui comprennent les stromélysine 1, stromélysine 2, stromélysine 3, et PUMP1 (putative metalloproteinase-1).

Les protéinases ont des spécificités de substrats différentes (Tableau 2), et les matrices extracellulaires qui composent le stroma et la lame basale sont différentes. Leur dégradation implique donc l'activation des protéases distinctes. Par exemple, le franchissement de la lame basale requiert la dégradation du collagène de type IV par des gélatinases, alors que la migration dans le stroma nécessite la dégradation des collagènes de types I et III notamment par la collagénase I.

Enzymes (Autres noms usuels)	Substrats <i>in vivo</i> (<i>in vitro</i> seulement)
Sérine protéinases	
plasmine	gélatine, fibronectine, laminine, protéoglycanes
élastases	gélatine, élastine, protéoglycanes, (collagènes I, III, IV)
cathepsine G	gélatine, élastine, (collagènes I, III, IV)
Métalloprotéinases	
collagénase interstitielle (MMP-1, collagénase de type I)	collagènes I, II, III, VII, X
collagénase de type IV 72-kDa (MMP-2, gélatinase 72-kDa)	collagènes IV, V, VII, X, gélatine, fibronectine, élastine
collagénase de type IV 92-kDa (MMP-9, gélatinase 92-kDa)	collagènes IV, V, VII, X, gélatine, fibronectine
stromélysine-1 (MMP-3, transine)	gélatine, fibronectine, laminine, protéoglycanes (élastine, collagènes I, IV, V, IX)
stromélysine-2 (MMP-10, transine-2)	gélatine, fibronectine, (collagènes IV, V, IX)
PUMP-1 (MMP-7)	gélatine, fibronectine, protéoglycanes
Elastase	gélatine, élastine, protéoglycanes, (collagènes I, III, IV)
Cystéine protéinases	
cathepsines B et D	gélatine, fibronectine, protéoglycanes (collagènes I, III)
Glycosidases	protéoglycanes

Tableau 2 : Les protéinases de la matrice et leurs substrats.
(d'après Woessner, 1991; Mignatti and Rifkin, 1993)

3) La régulation de l'activité des protéinases

La dégradation de la matrice extracellulaire est contrôlée à différents niveaux : (1) la transcription des gènes codant des activateurs du plasminogène et des métalloprotéinases, (2) l'activation des proenzymes sécrétés par clivage protéolytique dans le milieu extracellulaire, et (3) l'inhibition des protéases par des inhibiteurs tissulaires spécifiques (Figure 4).

L'expression génique des enzymes qui dégradent la matrice extracellulaire n'est généralement pas constitutive, et peut être induite par des promoteurs de tumeur (tel que l'ester de phorbol TPA), des facteurs de croissance (bFGF, PDGF, etc.), ou des produits d'oncogènes non nucléaires (*Ha-ras*, *v-src*, *v-mos*). L'action de ces différents activateurs sur les promoteurs des gènes codant les collagénase I, stromélysine I, uPA, et TIMP-1, s'exerce par l'intermédiaire d'éléments de type TORU (unité de réponse aux oncogènes et au TPA) (Gutman and Wasylyk, 1990; Rorth et al., 1990; Nerlov et al., 1991; Wasylyk et al., 1991; Edwards et al., 1992; Nerlov et al., 1992). Les éléments TORU sont caractérisés par la juxtaposition de sites de fixation pour les facteurs de transcription des familles AP-1 et Ets/PEA3. Les facteurs de transcription Ets sont effectivement capables de transactiver les promoteurs des gènes pour la stromélysine-1 et la collagénase I (Wasylyk et al., 1991; Buttice and Kurkinen, 1994), l'uPA (Rorth et al., 1990) et TIMP-1 (Edwards et al., 1992).

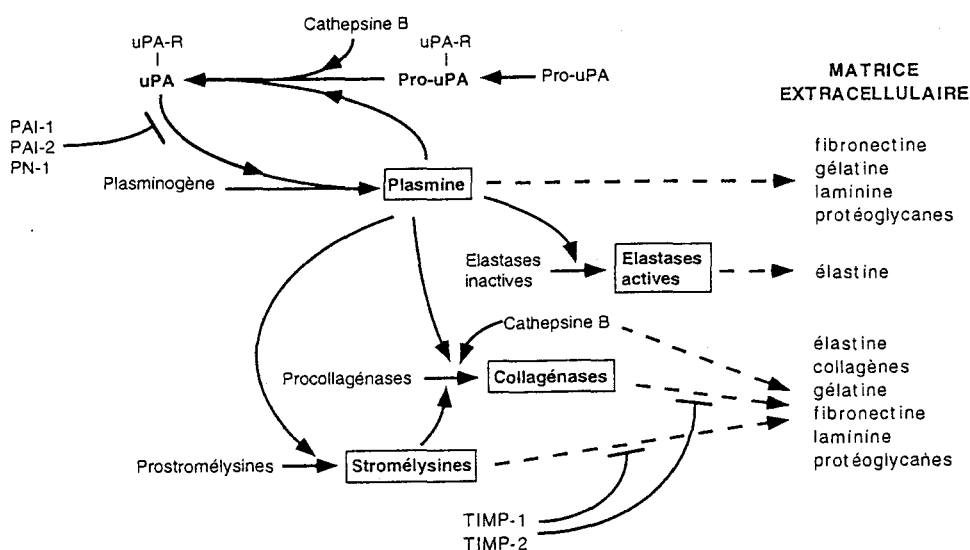


Figure 4 : Contrôle extracellulaire de l'activité des protéinases de la matrice.

→ Activation ; - - → Dégradation ; —| Inhibition.

C - ORIENTATION DE LA RECHERCHE

Au cours du développement embryonnaire, le gène *c-ets1* s'exprime transitoirement dans les cellules du mésenchyme qui sont en interaction avec les cellules épithéliales lors des processus invasifs de l'organogenèse. Chez l'adulte, des processus invasifs similaires peuvent être réactivés notamment au cours du développement tumoral. La transition d'un carcinome *in situ* en carcinome invasif nécessite une dégradation de la matrice extracellulaire, qui est réalisée par des protéinases. L'expression de certaines d'entre elles, la collagénase I, la stromélysine I et l'activateur du plasminogène de type urokinase (uPA), est en partie régulée *in vitro* par des facteurs de transcription de la famille Ets. Ceci suggère que les facteurs de transcription Ets pourraient être impliqués dans l'occurrence de processus invasifs en activant l'expression de protéases qui dégradent la matrice extracellulaire.

Dans l'étude décrite ci-dessous, nous avons apprécié la cohérence de cette hypothèse *in vivo* en établissant des corrélations entre l'expression du gène *c-ets1*, celle des protéases de la matrice (collagénase I, stromélysine I, uPA), et le caractère invasif de carcinomes humains. Nous avons ensuite développé des cultures primaires de fibroblastes humains normaux et évalué la cohérence du modèle par rapport aux observations faites *in vivo*.

II - RESULTATS

ARTICLE 1

**L'expression stromale du facteur de transcription *c-ets1*
est corrélée avec l'invasion tumorale**

**Stromal expression of *c-ets1* transcription factor
correlates with tumor invasion**

Nicolas Wernert, Frédéric Gilles, Véronique Fafeur, Fatima Bouali, Marie-Berthe Raes, Charles Pyke, Thierry Dupressoir, Gerhard Seitz, Bernard Vandebunder, et Dominique Stéhelin

[CANCER RESEARCH 54, 5683-5688, November 1, 1994]

Résumé

La réaction stromale a un rôle important dans la croissance tumorale, l'invasion et la métastase. Dans différents carcinomes invasifs humains, comme dans un modèle murin pour l'invasion tumorale, les transcrits codant le facteur de transcription c-Ets1 sont détectés dans les fibroblastes du stroma alors qu'ils sont absents des cellules épithéliales tumorales. Cette expression de *c-ets1* est souvent augmentée dans les fibroblastes directement adjacents des cellules néoplasiques. Les cellules endothéliales des capillaires du stroma sont également positives pour l'expression de *c-ets1*. Par contre, les fibroblastes des lésions non-invasives correspondantes sont systématiquement négatifs. Dans des cultures de fibroblastes humains stimulées par du bFGF et du TNF α , l'expression de *c-ets1* est corrélée avec l'accumulation des transcrits pour des gènes cibles potentiels, la collagénase-1 et la stromélysine-1. La même corrélation est observée dans certains des carcinomes invasifs étudiés. Ces résultats suggèrent que c-Ets1 participe à la régulation de l'invasion tumorale *in vivo*.

Stromal Expression of c-Ets1 Transcription Factor Correlates with Tumor Invasion¹

Nicolas Wernert, Frédéric Gilles, Véronique Fafeur, Fatima Bouali, Marie-Berthe Raes, Charles Pyke, Thierry Dupressoir, Gerhard Seitz, Bernard Vandebunder,² and Dominique Stéhelin

CNRS URA 1160, Institut Pasteur, 1 Rue Calmette, 59019 Lille Cédex, France [N. W., F. G., V. F., F. B., M.-B. R., T. D., B. V., D. S]; Service d'Anatomie et de Cytologie Pathologique, Hôpital Calmette, 59000 Lille, France [N. W.]; Finsen Laboratory, Rigshospitalet, DK-2100 Copenhagen, Denmark [C. P.]; and Institute of Pathology, University of the Saarland, 6650 Homburg/Saar, Germany [G. S.]

ABSTRACT

The stroma reaction has an important role in tumor growth, invasion, and metastasis. In various invasive human carcinomas, as well as in a mouse model for tumor invasion, transcripts encoding the transcription factor c-Ets1 were detected within stromal fibroblasts, whereas they were absent in epithelial tumor cells. This expression of c-Ets1 was often increased in fibroblasts directly adjacent to neoplastic cells. Endothelial cells of stromal capillaries were also positive for c-Ets1 expression. In contrast, fibroblasts of corresponding noninvasive lesions and of normal tissues were consistently negative. In cultured human fibroblasts stimulated by basic fibroblast growth factor and tumor necrosis factor α , the expression of c-Ets1 correlated with the accumulation of transcripts for potential target genes, collagenase-1 and stromelysin-1. The same correlation was observed in some of the invasive carcinomas investigated. These results suggest that c-Ets1 participates in the regulation of tumor invasion *in vivo*.

INTRODUCTION

The *c-ets1* proto-oncogene has been identified as the cellular progenitor of the viral oncogene *v-ets* that is associated with *v-myb* in the genome of the avian leukemia retrovirus E26 (1, 2). The Ets1 proteins are very conserved in species ranging from *Drosophila* to human (3); they are the founders of a new family of transcriptional regulators (reviewed in Refs. 4 and 5). The proteins belonging to this "Ets family" share a sequence of about 85 amino acids, the DNA binding domain that recognizes target DNA sequences containing a central GGAA/T core motif (6-9). Although little is known about the cellular genes regulated by c-Ets1 *in vivo*, it appears that c-Ets1 can either contribute to positive transcriptional activation, as shown on the long terminal repeat of the Moloney murine sarcoma virus (10), or to negative regulation, as shown by its repressive activity on the T-cell receptor- β enhancer (11). In addition, the activity of c-Ets1 can be modulated by its interaction with other transcription factors; c-Ets1 cooperates with the c-Fos/c-Jun complex, AP1, for transcriptional activation of the polyoma virus enhancer (12), and it activates the HTLV1 long terminal repeat synergistically with SP1 (13).

Initial studies in hatched chicken (14, 15) and in mouse tissues (16) have shown that *c-ets1* mRNAs are preferentially detected in lymphoid organs. However, *in situ* analysis of developing embryos revealed a broader expression pattern. In chick (17) and mouse (18, 19) embryos, *c-ets1* mRNAs are also expressed in mesenchymal cells adjacent to epithelial structures, when inductive epithelio-mesenchymal interactions occur (19, 20). This expression has been described in the dermis before the formation of epithelial cutaneous structures (21), in the limb bud, in the mesenchyme surrounding the gizzard and the gut, and during branching morphogenesis in the kidney and in the lung

near growing and invading epithelial buds (19, 20). *c-ets1* transcripts are also abundant during neural crest migration and new blood vessel formation (17, 18), which are physiological examples of tissue invasion.

In malignant tumors, invasion is one of the crucial steps in the metastatic cascade in which changes in cell adhesion and extensive remodeling of the extracellular matrix occur (22). Matrix degrading proteases such as u-PA,³ collagenase-1, and stromelysin-1 are involved in this process (23). Although their biological activity is thought to be highly regulated at a posttranslational level (Ref. 24; reviewed in Ref. 25), several evidences indicate also a regulation at the transcriptional level (26-29). Transcription factors that take part in the induction of protease genes include AP1 (30, 31) and also c-ets1; in transient cotransfection assays, *c-ets1* overexpression leads to transactivation of the stromelysin-1 promoter (7) and might contribute to transcriptional activation of the collagenase-1 gene (32). In addition, a regulatory element containing juxtaposed binding sites for Ets and AP1 proteins in the human u-PA promoter has been shown to be crucial for its transcriptional activity in different cell lines (33).

In this work, we examined the expression patterns of *c-ets1* mRNAs in various human carcinomas and compared them with corresponding benign tumors and other noninvasive lesions. We also investigated *c-ets1* expression in a mouse model for tumor invasion and in cultured human foreskin fibroblasts. In parallel to *c-ets1*, we investigated the expression of u-PA, collagenase-1, and stromelysin-1 mRNAs, both *in vitro* and *in vivo*. Our results suggest that c-ets1 participates in the regulation of tumor invasion, presumably by controlling the transcriptional activation of matrix-degrading proteases genes in stromal fibroblasts.

MATERIALS AND METHODS

Tissues. The human carcinomas investigated in this study comprised two squamous cell and one adenocarcinoma of the lung, two ductal breast cancers from females, two adenocarcinomas of the colon, one ductal cell adenocarcinoma of the pancreas, one papillary thyroid carcinoma, and one glandular prostate cancer (grade 3, according to Ref. 34). For comparison, we examined several benign and noninvasive tumors (four adenomas of the colon without significant dysplasias, one fibroadenoma of the breast, one benign cystadenofibroma of the ovary, and one of the borderline-type), nontumor-associated fibrotic lesions (one fibrocystic breast disease presenting focal epithelial proliferations without nuclear atypias and two arteriosclerotic intimal plaques from coronary arteries), and normal tissues from colon, lung, breast, and prostate. All samples were from adults (ages 39 to 74 years).

To produce the experimental mouse model, 1 mm³ pieces of a human undifferentiated ovarian carcinoma from a 59-year-old Caucasian woman were s.c. transplanted into SCID mice ("Cb 17," generously provided by J. Y. Cesbron, Institut Pasteur de Lille, France). The tumors were allowed to grow to approximately 1 cm³ before the animals were sacrificed; then the tumors were excised with the surrounding tissues.

³ The abbreviations used are: u-PA, urokinase-type plasminogen activator; SCID, severe combined immunodeficiency; cDNA, complementary DNA; PAI-1, plasminogen activator inhibitor type 1; TNF α , tumor necrosis factor α ; TGF β , transforming growth factor β ; PDGF, platelet-derived growth factor; bFGF, basic fibroblast growth factor; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate.

Received 5/4/94; accepted 8/30/94.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported by the CNRS, the Institut Pasteur de Lille, the Association pour la Recherche sur le Cancer, the Ligue Nationale Française contre le Cancer, and the Groupement des Entreprises Françaises dans la Lutte contre le Cancer.

² To whom requests for reprints should be addressed.

Table 1 Expression of *c-ets1*, *uPA*, *collagenase-1*, and *stromelysin-1* mRNAs within human carcinomas

		Tumor cells ^a				Stromal fibroblasts			
		<i>c-ets1</i>	coll 1	strom 1	u-PA	<i>c-ets1</i>	coll 1	strom 1	u-PA
Squamous cell carcinoma of the lung	1	-	-	-	-	+++	+++	+	+++
	2	-	+	-	+++	++	++	-	-
Adenocarcinoma of the lung	1	-	-	-	+	++	-	++	++
Ductal breast carcinoma	1	-	-	-	-	++	-	-	-
	2	-	-	-	+	++	(+)	-	+++
Adenocarcinoma of the colon	1	-	-	ND	-	+++	+++	ND	+++
	2	-	-	-	+	++	+	+	+
Ductal cell adenocarcinoma of the pancreas	1	-	+	-	+	(+)	-	-	+
Papillary thyroid carcinoma	1	-	-	-	-	+++	-	-	-
Prostatic adenocarcinoma	1	-	-	-	-	- ^b	- ^b	- ^b	- ^b

^a Semiquantitative estimation of positive cells: +, <10%; ++, 10-50%; +++, >50%; -, no signal; ND, not determined; coll 1, collagenase-1; strom 1, stromelysin-1.

^b Preexistent fibromuscular prostate stroma.

Probes. RNA probes for *in situ* hybridization and nick-translated probes for Northern blot analysis were prepared from the following cDNA fragments: a 825-base pair fragment of human *c-ets1* (nucleotides 260-1086, as described in Ref. 35) cloned into pSP64 and pSP65 (Promega) that does not cross-hybridize with *c-ets1* mRNAs (36); the 1.6-kilobase *SacI-KpnI* fragment of mouse *c-ets1* cDNA (37) cloned into Bluescript SK (Stratagene; these human and mouse probes gave species-specific hybridization signals); a fragment of human u-PA described by Pyke *et al.* (27) and cloned into Bluescript KS (Stratagene) for *in situ* hybridization and the 600-base pair, *EcoRI-PstI* fragment of the human u-PA cDNA for Northern blot analysis; the *HincII-PstI* fragment of the bovine PAI-1 cDNA; the complete cDNA of human collagenase-1 (30) cloned into pSP 64 for *in situ* hybridization and a 1.6-kilobase *XbaI* fragment for Northern blot analysis; the 1.5-kilobase *EcoRI* fragment of the human stromelysin-1 cDNA; and a 301-base pair fragment of the human stromelysin-1 cDNA cloned into pGEM 3 (Promega; Biotech), which extends 221 base pairs into the 3' untranslated region and is specific for stromelysin-1 versus stromelysin-2 and stromelysin-3 (38).

In Situ Hybridization. The detailed procedures for fixation, embedding of the tissue samples, and *in situ* hybridization were as described previously (27, 39). Both ³⁵S-labeled antisense and control sense RNA probes were used, and the sense probes gave negative results on all tissue sections examined. In order to compare the localization of positive signals for *c-ets1* mRNAs on one hand and for the three proteases transcripts on the other, hybridizations with the different probes were carried out on neighboring sections. We used May-Grünwald-Giemsa, hematoxylin and eosin, or fluorescent (Hoechst 33258) counterstaining, depending on the intensity of the signals. The *c-ets1* hybridization signals were sometimes low, and they were in these cases most easily visualized by dark-field illumination of sections after fluorescent counterstain. Under these circumstances, hybridizations and hematoxylin and eosin staining were carried out on different sections.

Cell Culture and Northern Blot Analysis. Primary cultures of human foreskin fibroblasts from passages 11 to 28 (kindly provided by Dr. Thomas Jones, Lederle Laboratories, Pearl River, NY) were maintained and propagated in Dulbecco's modified Eagle's medium (GIBCO) supplemented with 10% fetal calf serum and antibiotics. When subconfluence was reached, the cells were washed and incubated in Dulbecco's modified Eagle's medium-0.5% fetal calf serum in the presence or absence of the following factors: recombinant human TNF α (Genzyme), natural human TGF β -1 (Genzyme), natural porcine PDGF type B-B (British Biotechnology, Ltd.), recombinant human bFGF (Collaborative Biomedical Products), and PMA (Sigma Chemical Co.). After 19 h, the cells were processed for RNA extraction. Conditioned media were obtained by collecting serum-free media incubated for 2 days with confluent monolayers of HeLa, Colo A320, and MCF7 cells.

Total RNAs were extracted in guanidium isothiocyanate, according to Chirgwin *et al.* (40). RNAs (15 μ g) were separated on 1.2% agarose gels and transferred onto nitrocellulose membranes (Hybond-C extra; Amersham). Membranes were baked and hybridized with cDNA probes labeled by nick translation (Amersham).

RESULTS

Expression of *c-ets1* within the Stromal Fibroblasts of Human Carcinomas. Several invasive human carcinomas from lung, breast, colon, pancreas, thyroid, and prostate (Table 1) were examined. They revealed usual histological features and had induced, with the exception of the prostate cancer, a typically developed stromal component composed of varying amounts of fibroblasts with collagen fibers, new blood vessels, and inflammatory cells, which were mainly lymphocytes. As usually observed (41), the prostate cancer invaded the preexisting fibromuscular stroma without a remarkable stromal component.

In situ hybridization revealed positive signals for *c-ets1* within the stromal fibroblasts of all carcinomas which had induced a fibrous stroma (Table 1; Fig. 1). The pancreatic carcinoma was the only tumor where positive fibroblasts formed only a few clusters within the stroma. The preexisting fibromuscular prostate stroma was negative for *c-ets1* expression. The *c-ets1* transcripts were frequently found within the fibroblasts directly adjacent to the invasive tumor formations, whereas no transcripts were detected in more distant fibroblasts (Fig. 1, A and B) and in fibroblasts of neighboring mature normal connective tissues. As previously reported in well vascularized human tumors (36), we found an expression of *c-ets1* within the endothelial cells of stromal capillaries and within stromal lymphocytes (data not shown). In contrast, mature blood vessels of larger size were always negative. The epithelial tumor cells in all cases studied never presented positive signals for the *c-ets1* antisense probe.

Expression of *c-ets1* within the Fibrous Stroma of Noninvasive Tissues. In order to compare the transcription of *c-ets1* between invasive and noninvasive tissues, we examined several benign and noninfiltrating tumors (colon adenomas, a fibroadenoma of the breast, and two cystadenofibromas of the ovary), nontumor-associated fibrotic lesions as fibrocystic breast disease, and arteriosclerosis as well as samples from normal lung, breast, colon, and prostate. The stromal component of these tissues revealed usual histological features, with the presence of varying numbers of fibroblasts. As usually seen, the cellular stroma of the ovarian cystadenofibromas resembled the normal ovarian stroma; the borderline tumor (Fig. 2C) showed atypical papillary epithelial proliferations without invasion.

Without exception, all of these tissues were negative for *c-ets1* expression, both within their fibrous or fibromuscular stroma and within their epithelial constituents (Fig. 2). As previously reported (36), normal lymphocytes were positive.

Expression of *c-ets1* within SCID Mice after Transplantation of a Human Tumor. To evaluate whether human tumor cells could trigger *c-ets1* expression in another host, we investigated the stroma

reaction of SCID mice to a s.c. implanted human ovarian carcinoma. The tumor was poorly differentiated and locally invaded the mouse tissues. It had induced in the host a pronounced stroma reaction analogous to that found in human carcinomas. With a mouse-specific *c-ets1* probe, positive signals were observed within stromal fibroblasts and capillaries (Fig. 3), whereas no positive signals were detected with the human *c-ets1* probe (data not shown), which proved the mouse origin of the tumor stroma. As for the human carcinomas described above, the expression within stromal fibroblasts could also be found directly adjacent to the invasive tumor front (Fig. 3B). No hybridization signals were detected for either probe on normal fibrous tissues and blood vessels of the mouse-host or on the human tumor cells themselves.

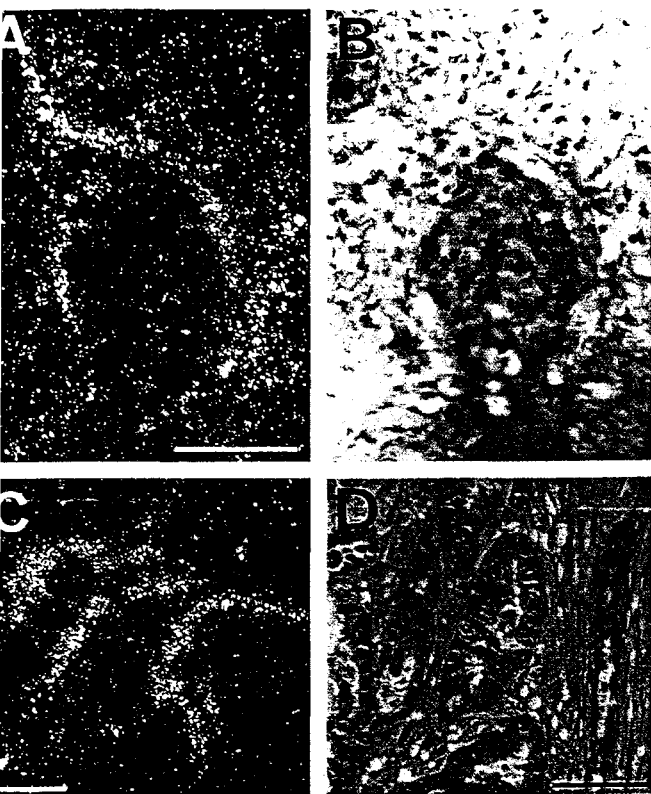


Fig. 1. Expression of *c-ets1* within the fibroblastic stroma of invasive human tumors. **A** and **B**, poorly differentiated human colon adenocarcinoma. Positive signals were seen directly adjacent to the invasive formations. Dark-field (**A**) and bright-field (**B**) illumination of the same section counterstained with May-Grünwald-Giemsa. **C** and **D**, well-differentiated glandular breast carcinoma. **C**, dark-field illumination of a section counterstained with Hoechst 33258. **D**, neighboring section counterstained with hematoxylin and eosin showing tumor morphology with a fibroblast rich stroma. Bar, 100 μ m.

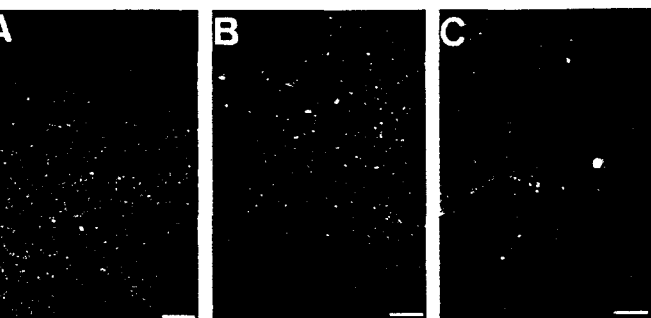


Fig. 2. Absence of *c-ets1* expression in a normal colon mucosa (**A**), in a fibroadenoma of the breast of the so-called intracanalicular type (**B**), and in a proliferating cystadenoma of the ovary of the borderline type (**C**). Dark-field illumination after fluorescent counterstaining of the nuclei. Bar, 100 μ m.

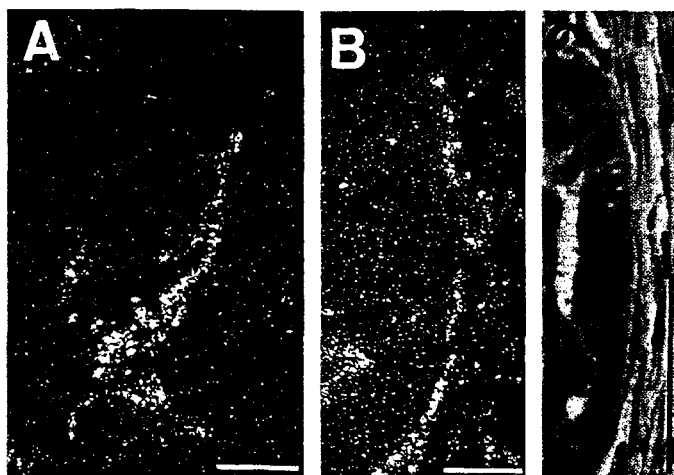


Fig. 3. Expression of *c-ets1* in the reactive stroma after transplantation of a poorly differentiated human tumor into a SCID mouse. **A**, positive signals for mouse *c-ets1* mRNAs within the fibroblastic stroma of inner parts of the tumor. **B**, mouse *c-ets1* transcripts within the stromal fibroblasts directly adjacent to the front of invasion, as demonstrated by the mouse antisense probe. **C**, hematoxylin and eosin counterstained neighboring section of **B**. **A** and **B** were obtained by dark-field illumination of sections counterstained with Hoechst 33258. The human *c-ets1* antisense probe gave negative results. Bar, 100 μ m.

c-ets1, Collagenase-1, Stromelysin-1, and u-PA Gene Expression in Cultured Human Fibroblasts in Response to Cytokines or PMA.

We subsequently investigated whether cytokines, which might be secreted by tumor cells, activated macrophages, or mast cells in the tumor stroma (42–44) could induce *c-ets1* expression in cultured fibroblasts. In a first series of experiments, we found that conditioned media (see “Materials and Methods”) of various tumor-derived epithelial cell lines, HeLa, Colo 320, and MCF7 cells, induced *c-ets1* expression in subconfluent human foreskin fibroblasts (data not shown). Using purified cytokines, we found that bFGF and TNF α increased the amount of *c-ets1* mRNAs (Fig. 4) and proteins,⁴ whereas TGF β 1 or PDGF had only little or no effect (Fig. 4).

Since cotransfection experiments have shown that *c-ets1* might be involved in the transcriptional regulation of u-PA, collagenase-1, and stromelysin-1 genes (7, 32, 33), we were interested to examine the relationship between *c-ets1* expression and the transcription of these protease genes. In human foreskin fibroblasts, the amounts of *c-ets1* mRNAs induced by bFGF, TNF α , TGF β 1, or PDGF correlated with the levels of collagenase-1 and stromelysin-1 mRNAs (Fig. 4). Only bFGF strongly induced the accumulation of u-PA transcripts. In addition, the phorbol ester PMA, which is known to activate the expression of extracellular matrix-degrading proteases (45, 46), also increased the amount of *c-ets1* mRNAs as well as the amount of u-PA, collagenase-1, and stromelysin-1 transcripts (Fig. 4). This correlation between the expression of *c-ets1* and the accumulation of these protease gene transcripts was also observed in human embryonic lung fibroblasts (MRC5 cells; data not shown).

Correlation between *c-ets1*, u-PA, Collagenase-1, and Stromelysin-1 Gene Transcription in Invasive Human Carcinomas.

In view of these *in vitro* correlations, we examined the expression of u-PA, collagenase-1, and stromelysin-1 gene transcripts within human carcinomas in comparison with that of *c-ets1*. Seven of the nine tumors were positive for at least two of the proteases (Table 1). The transcripts were mainly found, as for *c-ets1*, within the fibroblastic tumor stroma. In five cases, there were additional focal, positive signals within the tumor cells. On neighboring sections, the two squamous cell carcinomas of the lung showed, within the stromal

⁴ F. Gilles, manuscript in preparation.

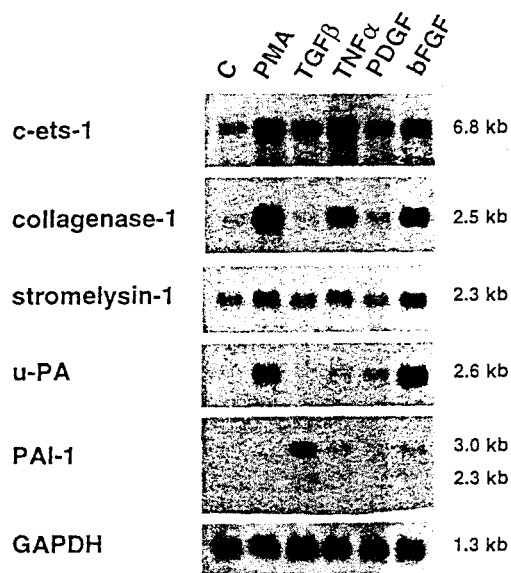


Fig. 4. Induction of *c-ets-1*, collagenase-1, stromelysin-1, u-PA, and PAI-1 gene mRNAs by cytokines in cultured fibroblasts. Subconfluent human foreskin fibroblasts were stimulated for 19 h by PMA (10 ng/ml), TGF β (5 ng/ml), TNF α (10 ng/ml), PDGF (10 ng/ml), and bFGF (10 ng/ml). RNAs from control (C) or stimulated cells were extracted and analyzed by Northern blotting. The activity of TGF β 1 on these foreskin fibroblasts was confirmed by the increase in PAI-1 mRNAs (45, 46). A glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase probe was used as a control for RNA loading.

fibroblasts, a topographical colocalization of the positive signals for *c-ets1* and those for collagenase-1 (Fig. 5, compare B and C). In one of these tumors, this colocalization was also observed for u-PA transcripts (data not shown). In the glandular lung carcinoma, a topographical coexpression for *c-ets1* and stromelysin-1 could be seen within the fibroblastic stroma (Fig. 5, compare E and F). In the other tumors that expressed protease transcripts in stromal fibroblasts, a superposition with the positive signals for *c-ets1* was found in restricted areas. Endothelial cells and stromal lymphocytes were negative for all three proteases. The prostate cancer was negative within the preexisting fibromuscular stroma for all three enzymes, as it was for *c-ets1* (data not shown). The noninvasive lesions and normal tissues have been investigated for collagenase-1 and stromelysin-1 expression; they were, without exception, negative (data not shown).

DISCUSSION

In the present study, we have detected *c-ets1* transcripts within the stromal fibroblasts of different invasive human carcinomas. Conversely, fibroblasts were negative in the stroma of corresponding noninvasive tumors, nontumor-associated fibrotic lesions, and normal tissues. Epithelial tumor cells never expressed *c-ets1*. The features of *c-ets1* expression in human carcinomas are reminiscent of the pattern observed in chicken and mouse embryos (17–19), where *c-ets1* transcripts accumulate in the mesenchyme surrounding growing and invading epithelial buds (19, 20). As for neoplastic epithelia, embryonic epithelia are negative for *c-ets1* (17). Thus, *c-ets1* mRNAs are expressed during the course of epithelio-mesenchymal interactions, occurring both during embryonic development or in the stroma reaction to invasive tumors. In this respect, the prostate carcinoma investigated here constitutes an interesting exception. The preexisting fibromuscular prostate stroma invaded by the tumor showed negative for *c-ets1*. This absence of a remarkable stromal reaction is usually seen (41, 47) but poorly understood.

The fact that *in vivo* positive signals for *c-ets1* are often seen within fibroblasts adjacent to the invasive tumor formations suggests that

c-ets1 transcription might be triggered directly or indirectly by diffusible factors released from the tumor cells. Our *in vitro* studies using human fibroblasts identify both TNF α and bFGF as possible candidates for such an effect. In favor of this hypothesis, bFGF is commonly expressed by tumor cell lines (43), and TNF α is mainly produced by macrophages activated at the site of neoplastic transformation (42, 44). The fact that both bFGF and TNF α can stimulate the expression of *c-ets1* mRNAs, whereas TGF β and PDGF have no effect, suggest that this stimulation does not correlate with fibroblast proliferation since both bFGF and PDGF are mitogenic for these cells. However, whether the *in vitro* effects of these cytokines on *c-ets1* expression reflect their activity *in vivo* remains an open question since the responsiveness of cells to cytokines can be markedly affected by their extracellular matrix environment (48).

The serine protease u-PA and the metalloproteinases collagenase-1 and stromelysin-1 belong to a complex enzymatic cascade that degrades the extracellular matrix and might open the way to invading tumor cells (reviewed in Ref. 22). Cotransfection experiments and mutational analysis of promoter sequences have demonstrated that Ets-binding sites within the promoters of u-PA (33, 49) and collagenase-1 genes (32, 50) are essential for their transcriptional activation and that Ets1 proteins are effective in activating the stromelysin-1 gene promoter (7). In several tumors, the expression of *c-ets1* superimposed with that of the investigated proteases. In these tumors, it is tempting to speculate that the c-Ets1 transcription factors take part in the transcriptional control of protease genes expression, either independently or in cooperation with other transcription factors. However, this model does not account for all tumors investigated. In tumors showing positive for *c-ets1* mRNAs, but in contrast negative for at least one of these proteases, transcription factors cooperating with *c-ets1* might be absent; alternatively in these tumors, c-Ets1 might be involved in the transcriptional regulation of other genes implicated in tumor invasion, such as the collagenase-4, tissue inhibitor of metalloproteinase-1, or α 4-integrin genes that contain essential Ets binding sites in their promoters (51–53). In addition, when protease genes are expressed by tumor cells in which *c-ets1* is not detected, it is possible that other factors, such as AP1 (33, 54) or other members of the Ets family, take part in their transcriptional regulation.

Surprisingly, in the stroma of all tumors investigated, we found endothelial cells to be constantly negative for collagenase-1, stromelysin-1, and uPA, as also reported by others (26, 27). Examination of *in vivo* angiogenesis models (55) have suggested that angiogenesis requires the degradation of the extracellular matrix, and *in vitro* studies (46, 56–59) have shown that angiogenic factors can induce the accumulation of u-PA and collagenase-1 transcripts in cultured endothelial cells. Among other possibilities, one may hypothesize that the expression of proteases in endothelial cells has not been detected *in vivo* because other cell types contribute to extracellular matrix degradation during angiogenesis (reviewed in Ref. 60).

Tumor growth and metastasis appear to involve a variety of interactions between the tumor cells and their surrounding stroma (61, 62). The molecular actors of the stroma reaction characterized thus far are growth factors, matrix-degrading proteases, and adhesion molecules (reviewed in Refs. 22, 25, and 63). To our knowledge, c-Ets1 is the first transcription factor to be detected during the stroma reaction to invasive tumors.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Klaus Remberger (Homburg, RFA) and Bernard Gosselin (Lille, France) for their help in collecting surgical specimens, Ji Hshiang Chen for the gift of the mouse *c-ets1* probe, Pascale Verde for the human u-PA probe, Michael Pepper for the bovine PAI-1 probe, Peter Angel for the human

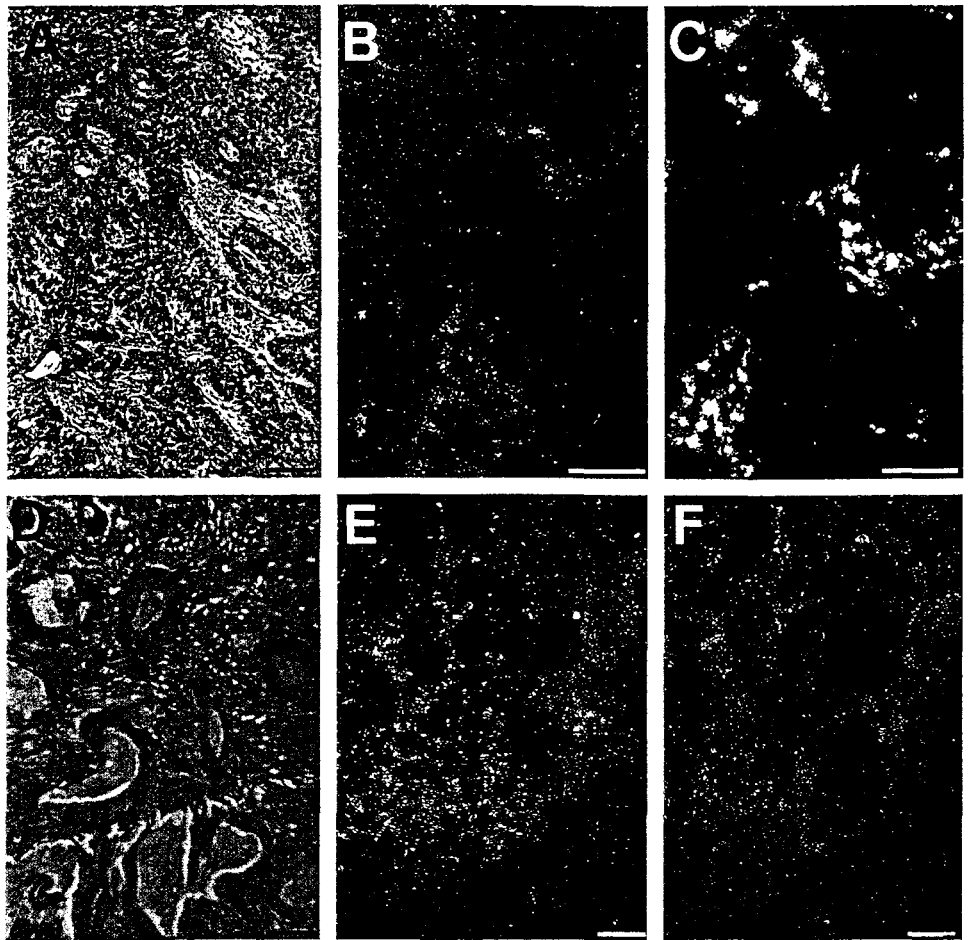


Fig. 5. Expression of *c-ets1* and protease RNAs within the fibroblastic stroma of a squamous cell (A-C) and a glandular (D-F) lung carcinoma. A and D, hematoxylin and eosin counterstained sections showing tumor morphology with a fibroblast-rich stroma. Positive signals for *c-ets1* (B and E), collagenase-1 (C), and stromelysin-1 (F) RNAs. Differences between the intensities of the hybridization signals with the stromelysin-1 and collagenase-1 probes probably result from differences between the length of these probes (301 bases versus 2.1 kilobases). Within both tumors, *c-ets1* and the protease signals were found on neighboring sections at corresponding places (compare B and C and E and F; dark-field illumination after Hoechst 33258 counterstaining of the nuclei). Bar, 100 μ m.

collagenase-1 probe, and Susan Quinones for the human stromelysin-1 probe. We thank Jean-Yves Cesbron (Pasteur Institute, Lille) for the generous gift of the SCID mice. We also thank R. Lafyatis, J. H. Chen, and Y. de Launoit for critical reading of this manuscript and Nicole Devassine for patient typing.

REFERENCES

- Leprince, D., Gégonne, A., Coll, J., Taisne, C., Schneeberger, A., Lagrou, C., and Stéhelin, D. A putative second cell-derived oncogene of the avian leukaemia retrovirus E26. *Nature (Lond.)*, **306**: 395-397, 1983.
- Nunn, M. F., Seeburg, P. H., Moscovici, C., and Duesberg, P. H. Tripartite structure of the avian erythroblastosis virus E26 transforming gene. *Nature (Lond.)*, **306**: 391-395, 1983.
- Laudet, V., Nié, C., Duterque-Coquillaud, M., Leprince, D., and Stéhelin, D. Evolution of the *ets* gene family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **190**: 8-14, 1993.
- MacLeod, K., Leprince, D., and Stéhelin, D. The *ets* gene family. *Trends Biochem. Sci.*, **17**: 251-256, 1992.
- Wasylyk, B., Hahn, S. L., and Giovane, A. The Ets family of transcription factors. *Eur. J. Biochem.*, **277**: 7-18, 1993.
- Fisher, R. J., Mavrothalassitis, G., Kondoh, A., and Papas, T. S. High-affinity DNA-protein interactions of the cellular ETS1 protein: the determination of the ETS binding motif. *Oncogene*, **6**: 2249-2254, 1991.
- Wasylyk, C., Gutman, A., Nicholson, R., and Wasylyk, B. *c-ets* oncoprotein activates the stromelysin promoter through the same elements as several non-nuclear oncoproteins. *EMBO J.*, **10**: 1127-1134, 1991.
- Woods, D. B., Ghysdael, J., and Owen, M. J. Identification of nucleotide preferences in DNA sequence recognised specifically by *c-Ets-1* protein. *Nucleic Acids Res.*, **20**: 699-704, 1992.
- Wang, C. Y., Petryniak, B., Ho, I. C., Thompson, C. B., and Leiden, J. M. Evolutionarily conserved Ets family members display distinct DNA binding specificities. *J. Exp. Med.*, **175**: 1391-1399, 1992.
- Gunther, C. V., Nye, J. A., Bryner, R. S., and Graves, B. J. Sequence-specific DNA binding of the proto-oncoprotein *ets-1* defines a transcriptional activator sequence within the long terminal repeat of the Moloney murine sarcoma virus. *Genes Dev.*, **4**: 667-679, 1990.
- Prosser, H. M., Wotton, D., Gégonne, A., Ghysdael, J., Wang, S., Speck, N. A., and Owen, M. J. A phorbol ester response element within the human T-cell receptor β -chain enhancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**: 9934-9938, 1992.
- Wasylyk, B., Wasylyk, C., Flores, P., Begue, A., Leprince, D., and Stéhelin, D. The *c-ets* proto-oncogenes encode transcription factors that cooperate with *c-fos* and *c-jun* for transcriptional activation. *Nature (Lond.)*, **346**: 191-193, 1990.
- Gégonne, A., Bosselut, R., Bailly, R. A., and Ghysdael, J. Synergistic activation of the HTLV1 LTR Ets-responsive region by transcription factors Ets1 and Sp1. *EMBO J.*, **12**: 1169-1178, 1993.
- Chen, J. H. The proto-oncogene *c-ets1* is preferentially expressed in lymphoid cells. *Mol. Cell. Biol.*, **5**: 2993-3000, 1985.
- Ghysdael, J., Gégonne, A., Pognonec, P., Dernis, D., Leprince, D., and Stéhelin, D. Identification and preferential expression in thymic and bursal lymphocytes of a *c-ets1* oncogene-encoded *M*, 54,000 cytoplasmic protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 1714-1718, 1986.
- Bhat, N. K., Fisher, R. J., Fujiwara, S., Ascione, R., and Papas, T. S. Temporal and tissue-specific expression of mouse *ets* genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 3161-3165, 1987.
- Vandenbunder, B., Pardanaud, L., Jaffredo, T., Mirabel, M. A., and Stéhelin, D. Complementary patterns of expression of *c-ets1*, *c-myb* and *c-myc* in the blood-forming system of the chick embryo. *Development*, **107**: 265-274, 1989.
- Grevin, D., Chen, J. H., Raes, M. B., Stéhelin, D., Vandenbunder, B., and Desbiens, X. Involvement of the proto-oncogene *c-ets 1* and the urokinase plasminogen activator during mouse implantation and placentation. *Int. J. Dev. Biol.*, **37**: 519-529, 1993.
- Kola, I., Brookes, S., Green, A. R., Garber, R., Tymms, M., Papas, T. S., and Seth, A. The Ets1 transcription factor is widely expressed during murine embryo development and is associated with mesodermal cells involved in morphogenic processes such as organ formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**: 7588-7592, 1993.
- Queva, C., Leprince, D., Stéhelin, D., and Vandenbunder, B. *p54^{c-ets-1}* and *p68^{c-ets-1}*, the two transcription factors encoded by the *c-ets-1* locus, are differentially expressed during the development of the chick embryo. *Oncogene*, **8**: 2511-2520, 1993.
- Desbiens, X., Queva, C., Jaffredo, T., Stéhelin, D., and Vandenbunder, B. The relationship between cell proliferation and the transcription of the nuclear oncogenes *c-myc*, *c-myb* and *c-ets-1* during feather morphogenesis in the chick embryo. *Development*, **111**: 699-713, 1991.
- Liotta, L. A., Steeg, P. S., and Stetler, S. W. G. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell*, **64**: 327-336, 1991.
- Blood, C. H., and Zetter, B. R. Tumor interactions with the vasculature: angiogenesis and tumor metastasis. *Biochim. Biophys. Acta*, **1032**: 89-118, 1990.
- Goldberg, G. I., Marmer, B. L., Grant, G. A., Eisen, A. Z., Wilhelm, S., and He, C. Human 72-kilodalton type IV collagenase forms a complex with a tissue inhibitor of

- metalloproteases designated TIMP-2. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989: 8207-8211, 1989.
25. Matrisian, L. M., and Bowden, G. T. Stromelysin/transin and tumor progression. Semin. Cancer Biol., 1: 121-125, 1990.
 26. Polette, M., Clavel, C., Muller, D., Abecassis, J., Binnering, I., and Birembaut, P. Detection of mRNAs encoding collagenase 1 and stromelysin 2 in carcinomas of the head and neck by *in situ* hybridization. Invasion Metastasis, 11: 76-83, 1991.
 27. Pyke, C., Kristensen, P., Ralfkiaer, E., Grondahl-Hansen, J., Eriksen, J., Blasi, F., and Dano, K. Urokinase-type plasminogen activator is expressed in stromal cells and its receptor in cancer cells at invasive foci in human colon adenocarcinomas. Am. J. Pathol., 138: 1059-1067, 1991.
 28. Grondahl-Hansen, J., Ralfkiaer, E., Kirkeby, L. T., Kristensen, P., Lund, L. R., and Dano, K. Localization of urokinase-type plasminogen activator in stromal cells in adenocarcinomas of the colon in humans. Am. J. Pathol., 138: 111-117, 1991.
 29. Gray, S. T., Wilkins, R. J., and Yun, K. Interstitial collagenase gene expression in oral squamous cell carcinoma. Am. J. Pathol., 141: 301-306, 1992.
 30. Angel, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R. J., Rahmsdorf, H. J., Jonat, C., Herrlich, P., and Karin, M. Phorbol ester-inducible genes contain a common *cis* element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. Cell, 49: 729-739, 1987.
 31. Buttice, G., Quinones, S., and Kurkinen, M. The AP-1 site is required for basal expression but is not necessary for TPA-response of the human stromelysin gene. Nucleic Acids Res., 19: 3723-3731, 1991.
 32. Wasylyk, C., and Wasylyk, B. Oncogenic conversion alters the transcriptional properties of ets. Cell Growth & Differ., 3: 617-625, 1992.
 33. Nerlov, C., Rorth, P., Blasi, F., and Johnsen, M. Essential AP-1 and PEA3 binding elements in the human urokinase enhancer display cell type-specific activity. Oncogene, 6: 1583-1592, 1991.
 34. Böcking, A. Reproducible grading of prostatic carcinoma based on cytological criteria of malignancy. Aktuel Urol., 12: 278-282, 1981.
 35. Watson, D. K., McWilliams, M. J., Lapis, P., Lautenberger, J. A., Schweinfest, C. W., and Papas, T. S. Mammalian *ets-1* and *ets-2* genes encode highly conserved proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 7862-7866, 1988.
 36. Wernert, N., Raes, M. B., Lassalle, P., Dehouck, M. P., Gosselin, B., Vandebunder, B., and Stéhelin, D. The *c-ets-1* proto-oncogene is a transcription factor expressed in endothelial cells during tumor vascularization and other forms of angiogenesis in man. Am. J. Pathol., 140: 119-127, 1992.
 37. Chen, J. H. Cloning, sequencing, and expression of mouse *c-ets-1* cDNA in baculovirus expression system. Oncogene Res., 5: 277-285, 1990.
 38. Saus, J., Quinones, S., Otani, Y., Nagase, H., Harris, E. D., and Kurkinen, M. The complete primary structure of human matrix metalloproteinase-3. J. Biol. Chem., 263: 6742-6745, 1988.
 39. Quéva, C., Ness, S. A., Graf, T., Vandebunder, B., and Stéhelin, D. Expression patterns of *c-myb* and of *v-myb* induced myeloid-1 (*mim-1*) gene during the development of the chick embryo. Development, 114: 125-133, 1992.
 40. Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., Mac Donald, R. J., and Rutter, W. J. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. Biochemistry, 18: 5294-5299, 1979.
 41. Dhom, G. Histopathology of prostate carcinoma. Diagnosis and differential diagnosis. Pathol. Res. Pract., 179: 277-303, 1985.
 42. Beissert, S., Bergholz, M., Waase, I., Lepsien, G., Schauer, A., Pfizenmaier, K., and Krönke, M. Regulation of tumor necrosis factor gene expression in colorectal adenocarcinoma: *in vivo* analysis by *in situ* hybridization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 5064-5068, 1989.
 43. Rifkin, D. B., and Moscatelli, D. Recent developments in the cell biology of basic fibroblast growth factor. J. Cell Biol., 109: 1-6, 1989.
 44. Takeyama, H., Wakayama, N., O'Hara, C., Arthur, K., Niloff, J., Kufe, D., Sakurai, K., and Spriggs, D. Tumor necrosis factor expression by human ovarian carcinoma *in vivo*. Cancer Res., 51: 4476-4480, 1991.
 45. Frisch, S. M., Clark, E. J., and Werb, Z. Coordinate regulation of stromelysin and collagenase genes determined with cDNA probes. Biochemistry, 84: 2600-2604, 1987.
 46. Pepper, M. S., Belin, D., Montesano, R., Orci, L., and Vassalli, J. D. Transforming growth factor- β 1 modulates basic fibroblast growth factor-induced proteolytic and angiogenic properties of endothelial cells *in vitro*. J. Cell Biol., 111: 743-755, 1990.
 47. Bonkhoff, H., Wernert, N., Dhom, G., and Remberger, K. Distribution of basement membranes in primary and metastatic carcinomas of the prostate. Hum. Pathol., 23: 934-939, 1992.
 48. Nathan, C., and Sporn, M. Cytokines in context. J. Cell Biol., 113: 981-986, 1991.
 49. Rorth, P., Nerlov, C., Blasi, F., and Johnsen, M. Transcription factor PEA3 participates in the induction of urokinase plasminogen activator transcription in murine keratinocytes stimulated with epidermal growth factor or phorbol-ester. Nucleic Acids Res., 18: 5009-5017, 1990.
 50. Gutman, A., and Wasylyk, B. The collagenase gene promoter contains a TPA and oncogene-responsive unit encompassing the PEA3 and AP-1 binding sites. EMBO J., 9: 2241-2246, 1990.
 51. Edwards, D. R., Rocheleau, H., Sharma, R. R., Wills, A. J., Cowie, A., Hassel, J. A., and Heath, J. K. Involvement of AP1 and PEA3 binding sites in the regulation of murine tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) transcription. Biochim. Biophys. Acta, 1171: 41-55, 1992.
 52. Herrmann, J. L., Chen, J. H., Nakajima, M., and Nicolson, G. L. A *c-ets-1* proto-oncoprotein binding site in the 72-kDa type IV collagenase promoter of human metastatic melanoma cells. Clin. Exp. Metastasis, 10: 94, 1993.
 53. Rosen, G. D., Birkenmeier, T. M., and Dean, D. C. Characterization of the $\alpha 4$ integrin gene promoter. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 4094-4098, 1991.
 54. Angel, P., Baumann, I., Stein, B., Delius, H., Rahmsdorf, H. J., and Herrlich, P. 12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetate induction of the human collagenase gene is mediated by an inducible enhancer element located in the 5' flanking region. Mol. Cell Biol., 7: 2256-2266, 1987.
 55. Ausprunk, D. H., and Folkman, J. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. Microvasc. Res., 14: 53-65, 1977.
 56. Unemori, E. N., Ferrara, N., Bauer, E. A., and Amento, E. P. Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells. J. Cell. Physiol., 153: 557-562, 1992.
 57. Moscatelli, D., Presta, M., and Rifkin, D. B. Purification of a factor from human placenta that stimulates capillary endothelial cell protease production, DNA synthesis, and migration. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83: 2091-2095, 1986.
 58. Montesano, R. Regulation of angiogenesis *in vitro*. Eur. J. Clin. Invest., 22: 504-515, 1992.
 59. Mignatti, P., Tsuboi, R., Robbins, E., and Rifkin, D. B. *In vitro* angiogenesis on the human amniotic membrane: requirement for basic fibroblast growth factor-induced proteinases. J. Cell Biol., 108: 671-682, 1989.
 60. Meininger, C. J., and Zetter, B. R. Mast cells and angiogenesis. Semin. Cancer Biol., 3: 73-79, 1992.
 61. Dvorak, H. F. Tumors: wounds that do not heal. N. Engl. J. Med., 315: 1650-1659, 1986.
 62. Zipori, D. Stromal cells in tumor growth and regression. Cancer J., 3: 164-169, 1990.
 63. Zetter, B. R. Adhesion molecules in tumor metastasis. Semin. Cancer Biol., 4: 219-229, 1993.

III - CONCLUSION

Nous avons mis en évidence une expression du proto-oncogène *c-ets1* dans des fibroblastes du stroma de carcinomes invasifs, et l'absence d'expression de *c-ets1* dans les cellules épithéliales cancéreuses et dans les fibroblastes du stroma des carcinomes non invasifs. De plus, l'expression de *c-ets1* dans les fibroblastes s'effectue préférentiellement à proximité du front d'invasion des cellules cancéreuses, et est souvent colocalisée avec celle de protéinases (collagénase interstitielle, la stromélysine et l'uPA) dont les gènes sont potentiellement activés par les facteurs de transcription Ets1. Ceci suggère d'une part que l'expression de *c-ets1* dans les fibroblastes du stroma est probablement contrôlée par les facteurs solubles produits localement par les cellules cancéreuses ou par des cellules du stroma activées, telles que des macrophages. D'autre part, l'expression de *c-ets1* est corrélée à celle de protéinases qui dégradent la matrice extracellulaire interstitielle, ainsi qu'au caractère invasif des carcinomes.

Depuis la publication de nos travaux, d'autres équipes ont confirmé de manière extensive la relation entre l'expression de *c-ets1*, celle de la collagénase I et de l'uPA, et l'invasion tumorale dans des carcinomes du poumon (Bolon et al., 1995). Cette corrélation d'expression dans les tumeurs ne constitue cependant pas une preuve que ce sont bien les facteurs de transcription Ets1 qui gouvernent l'expression des protéinases *in vivo*. Nos travaux conjugués à ceux de la littérature permettent de proposer le modèle suivant (Figure 5) : les fibroblastes du stroma tumoral activés par des facteurs solubles expriment *c-ets1* ; les facteurs de transcription Ets1 activent les gènes pour la collagénase I, la stromélysine I et l'uPA, dont les produits sont sécrétés dans le milieu extracellulaire et y dégradent la matrice interstitielle ; ceci permet aux cellules cancéreuses de migrer dans le stroma pour y gagner les vaisseaux sanguins grâce auxquels elles se disséminent dans l'organisme et forment des métastases.

Cependant, la dégradation de la matrice extracellulaire interstitielle ne suffit pas à permettre l'invasion des cellules cancéreuses. Le franchissement des lames basales qui entourent les foyers de cellules cancéreuses et les vaisseaux sanguins nécessitent l'intervention de protéases différentes, telles que les gélatinases. L'activation de l'expression de celles-ci par des facteurs de transcription Ets1 reste à démontrer. Cette action pourrait également être réalisée par d'autres

membres de la famille Ets. Ainsi, un nouveau membre de la famille Ets récemment cloné, E1AF, active l'expression des gènes pour la collagénase interstitielle, la stromélysine I, et la gélatinase de 92 kDa. La transfection de E1AF dans des lignées cellulaires de cancer du sein MCF7 augmente l'expression de la gélatinase de 92 kDa et confère aux cellules des activités motiles et invasives (Kaya et al., 1996). Par ailleurs, dans des adénocarcinomes mammaires induits chez la souris par l'oncogène *neu*, le gène PEA3 est surexprimé aussi bien dans les tumeurs primaires invasives du sein que dans leurs métastases pulmonaires (Trimble et al., 1993). PEA3, comme d'autres membres de la famille Ets, pourrait participer à la régulation de l'expression de protéinases identiques ou différentes de celles régulées par Ets1.

De nombreuses études avaient permis d'associer l'altération ou la surexpression de gènes de la famille Ets avec la transformation de cellules hématopoïétiques et l'émergence de leucémies et de lymphomes. La mise en évidence de l'expression de *c-ets1* dans les cellules endothéliales et dans les fibroblastes du stroma de carcinomes invasifs suggère à présent un rôle pour les facteurs de transcription Ets dans la progression des tumeurs solides.

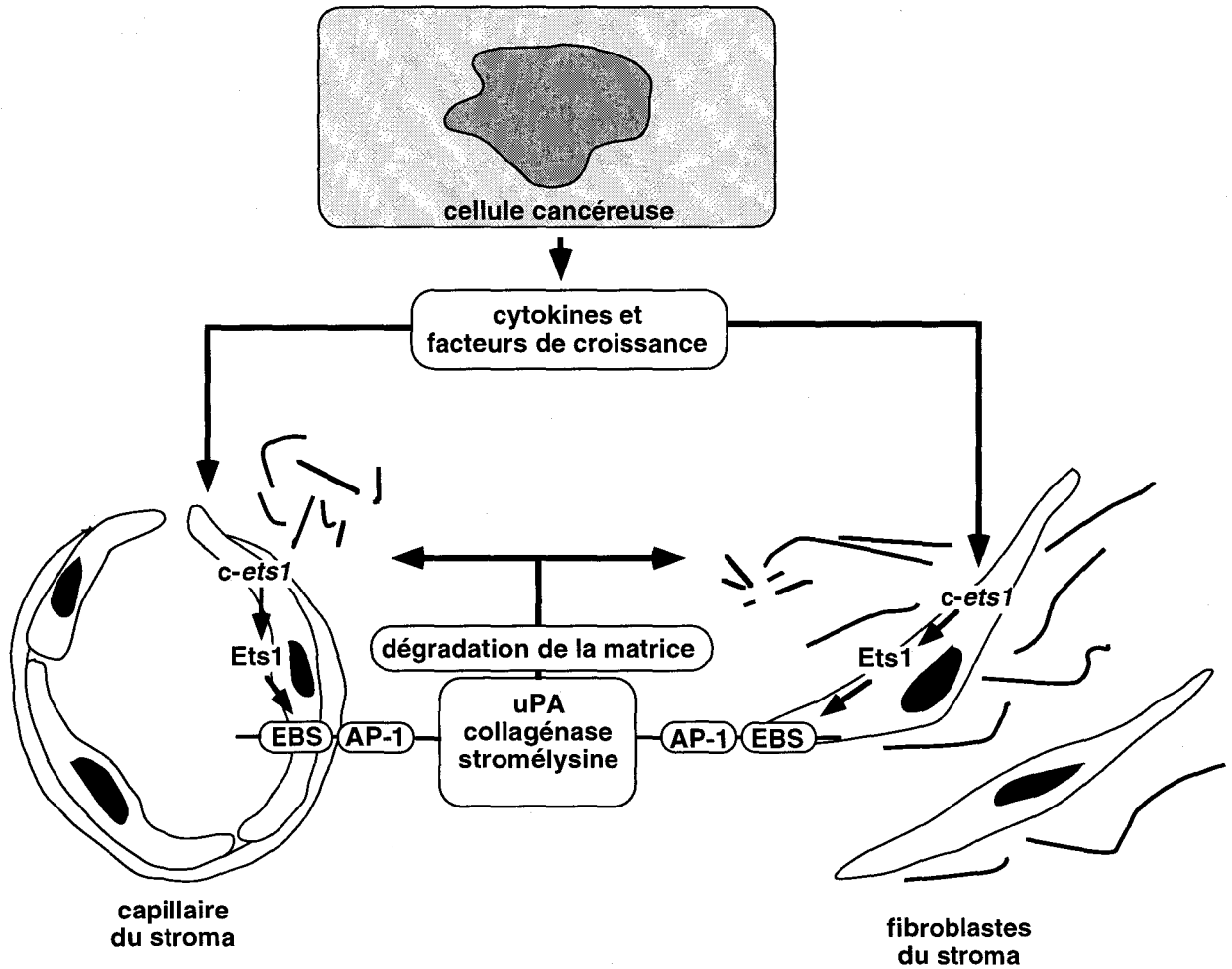


Figure 5 : Modèle illustrant le rôle de Ets1 dans la réaction stromale. Les cellules tumorales sécrètent des cytokines ou des facteurs angiogéniques qui diffusent dans le stroma et activent l'expression de *c-ets1* dans les fibroblastes voisins et dans les cellules endothéliales. Les protéines Ets1 se lient à leur séquence spécifique (EBS) dans le promoteur de gènes qui codent des protéases qui dégradent la matrice, et éventuellement activent la transcription de ces gènes. (d'après Vandebunder et al., 1994).

DEUXIEME PARTIE

**REGULATION DE L'EXPRESSION DE *c-ets1*
DANS DES FIBROBLASTES HUMAINS
PAR DES CYTOKINES FIBROGENIQUES**

DEUXIEME PARTIE

REGULATION DE L'EXPRESSION DE *c-ets-1* DANS DES FIBROBLASTES HUMAINS PAR DES CYTOKINES FIBROGENIQUES

I - INTRODUCTION

Dans la première partie, nous avons mis en évidence une expression élevée du proto-oncogène *c-ets1* dans des fibroblastes du stroma de divers carcinomes invasifs. Cette expression s'effectue préférentiellement à proximité des foyers de cellules cancéreuses, alors qu'elle est absente ou sporadique dans les fibroblastes plus distants. Ceci suggère que l'expression de *c-ets1* dans les fibroblastes est induite par des facteurs solubles produits par les cellules cancéreuses ou par les cellules du stroma activées par les cellules cancéreuses tels que les macrophages.

A - LES FACTEURS DE CROISSANCE ET LES CYTOKINES DANS LES TUMEURS

Les facteurs de croissance et les cytokines sont des facteurs solubles qui médient la communication entre des cellules d'un même tissu ou de tissus voisins. Ces facteurs ont des activités biologiques variées et multiples qui dépendent du type cellulaire auquel ils s'adressent. Ils contrôlent la croissance cellulaire, la différenciation, la composition de la matrice extracellulaire, la migration, l'expression des antigènes de surface, la balance nutritionnelle et le métabolisme de cellules.

Les facteurs de croissance et les cytokines ont un rôle déterminant dans l'établissement et la progression des tumeurs où ils orchestrent les différents aspects de la communication entre les cellules normales de l'hôte et les cellules cancéreuses. On distingue en particulier des facteurs qui favorisent la prolifération cellulaire (facteurs mitogéniques), la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (facteurs angiogéniques), l'acquisition de propriétés invasives (facteurs de motilité et de dispersion), les réponses inflammatoires et immunes (cytokines).

De manière générale, l'expression et la production des cytokines et des facteurs de croissance, ainsi que de leurs récepteurs spécifiques de surface cellulaire sont augmentées dans différents types de lignées de cellules tumorales en culture *in vitro*, dans des cultures primaires de cellules tumorales, ou au sein de tumeurs *in vivo* (pour revue voir Sporn and Roberts, 1986; Balkwill, 1994 et Tableau 3). L'utilisation des techniques d'hybridation *in situ* et d'immunohistochimie montre que la production de ces facteurs est principalement détectée au niveau des îlots tumoraux, alors qu'elle n'est que sporadique dans les tissus sains. Les cellules tumorales et les macrophages infiltrants associés aux tumeurs sont les sources de cytokines et de facteurs de croissance les mieux documentées.

Facteur	Nom complet	Références
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor	(Sporn and Roberts, 1986; Bronzert et al., 1987; Craven et al., 1995)
a,bFGF	acidic-, basic-Fibroblast Growth Factor	(Morrisson et al., 1990; Penault-Llorca et al., 1995)
EGF	Epidermal Growth Factor	(Bauknecht et al., 1986; Derynck et al., 1987)
TGF α	Transforming Growth Factor-alpha	(Sporn and Roberts, 1986; Derynck et al., 1987)
IGF-1	Insulin-like Growth Factor-1	(Yee et al., 1991)
SF/HGF	Scatter Factor/Hepatocyte Growth Factor	(Joseph et al., 1995)
TGF β	Transforming Growth Factor-beta	(Derynck et al., 1987; Naylor et al., 1990; Gorsch et al., 1992)
M-CSF	Macrophage-Colony Stimulating Factor	(Baiocchi et al., 1991)
TNF α	Tumor Necrosis Factor-alpha	(Beissert et al., 1989; Naylor et al., 1990; Takeyama et al., 1991; Naylor et al., 1993; Miles et al., 1994)
IL-1	Interleukin-1	(Bennicelli et al., 1989; Köck et al., 1989)
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor	(Olson et al., 1994)

Tableau 3 : Principaux facteurs surexprimés dans les tumeurs.

B - LA REGULATION DE L'ACTIVITE DES FIBROBLASTES

La formation du stroma tumoral met en jeu des mécanismes similaires à ceux développés dans un premier temps lors de la cicatrisation pour la formation d'un tissu réactionnel fibreux (tissu de granulation). Les cellules tumorales sécrètent des facteurs chemoattractants qui induisent un afflux et une activation de macrophages sur le site de la tumeur. Les macrophages produisent des cytokines pro-inflammatoires dont la plupart sont des facteurs chemoattractants (chemokines) qui attirent les leucocytes et des cellules du mésenchyme telles que les fibroblastes, les cellules de

muscle lisse et les cellules endothéliales. Les différentes cellules recrutées et activées au site de la tumeur produisent une grande variété de facteurs solubles dont les activités biologiques cumulées régulent le développement du stroma, notamment l'angiogenèse et la synthèse de la matrice interstitielle, et la croissance des cellules cancéreuses.

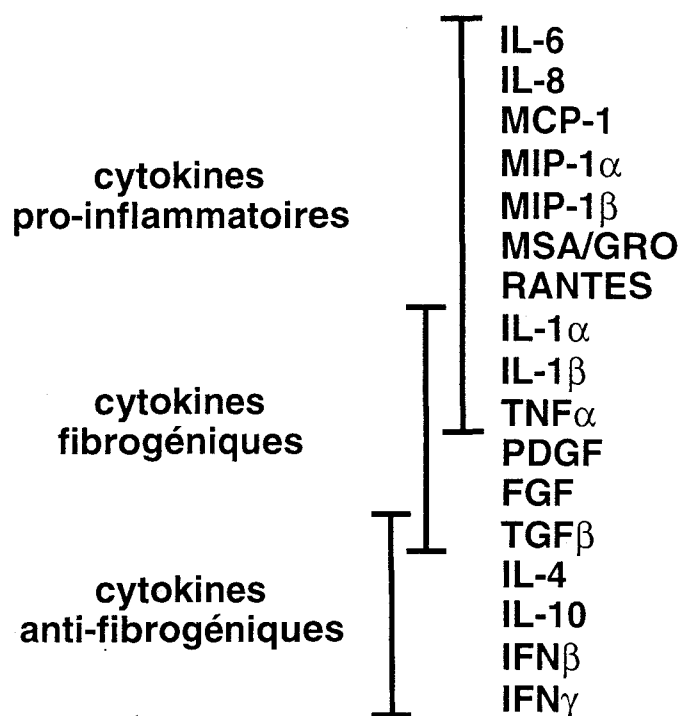


Figure 6 : Recouvrement des activités des cytokines impliquées dans la formation du tissu de granulation. Abréviations utilisées : FGF, Fibroblast Growth Factor ; IFN, Interferon ; IGF-1, Insulin-like Growth Factor-1 ; IL, Interleukin ; MCP, Monocyte Chemoattractant Protein ; MIP, Macrophage Inflammatory Protein ; PDGF, Platelet-Derived Growth Factor ; TGF, Transforming Growth Factor ; TNF, Tumor Necrosis Factor.

Certaines cytokines, qualifiées de fibrogéniques (voir Kovacs et al., 1995 et Figure 6), induisent directement la prolifération des fibroblastes et/ou stimulent la production des composants de la matrice par les fibroblastes. La plupart sont produites par les macrophages, mais plusieurs de ces facteurs peuvent être produits par d'autres types cellulaires tels que les lymphocytes, les cellules endothéliales et les fibroblastes eux-même. Par ailleurs, la plupart de ces cytokines sont mitogènes et/ou chemotactiques pour les cellules endothéliales et stimulent la croissance des capillaires par angiogénèse.

Les cytokines fibrogéniques peuvent être regroupées en différentes classes selon qu'elles favorisent plutôt la croissance cellulaire, la synthèse des composants de la matrice ou la dégradation de la matrice extracellulaire (Tableau 4). Ces activités sont potentiellement exclusives. En particulier, le remaniement de la matrice extracellulaire inhibe la prolifération des fibroblastes et la synthèse des composants matritiels (Fukamizu and Grinnell, 1990).

	Prolifération	Synthèse de la matrice	Dégradation de la matrice
EGF, FGF, PDGF, IGF-1, TGF α	++	(+)/0	+
TGF β	(+)/-	++	-
TNF α , IL-1	+/-	-	++

Tableau 4 : Récapitulatif des activités préférentielles des cytokines fibrogéniques sur les fibroblastes. Conventions : ++, activité majeure ; +, activité faible ; (+), activité sporadique ; 0, pas d'activité ; -, inhibition.

1 - La prolifération des fibroblastes

Les facteurs de croissance EGF, aFGF , bFGF, IGF-1, TGF α et surtout le PDGF sont de puissants mitogènes pour les fibroblastes (pour revue voir Kovacs, 1991; Kovacs and DiPietro, 1994). De plus, ces facteurs de croissance induisent la production de Scatter Factor/Hepatocyte Growth Factor (SF/HGF) par les fibroblastes (Gohda et al., 1994). Le SF/HGF est un facteur qui stimule la prolifération et induit la dispersion des cellules épithéliales, telles que les cellules cancéreuses. Il induit la rupture des jonctions intercellulaires et stimule la motilité cellulaire et la production de métalloprotéinases pour permettre l'invasion des cellules cancéreuses. Il stimule également la formation de nouveaux vaisseaux sanguins qui est nécessaire pour la croissance

tumorale et la dissémination des cellules tumorales dans l'organisme (Joseph et al., 1995). Le SF/HGF est sécrété sous forme d'un précurseur qui est activé par l'uPA (Naldini et al., 1992). *In vitro*, le TNF α et l'IL-1 sont également capables d'induire l'expression du SF/HGF dans les fibroblastes (Joseph et al., 1995). A l'inverse, le TGF β inhibe la production de SF/HGF par les fibroblastes induite par les facteurs de croissance (Gohda et al., 1994).

Différentes études ont pu attribuer au TNF α , à l'IL-1 ou au TGF β aussi bien des activités prolifératives qu'anti-prolifératives (pour revue voir Kovacs and DiPietro, 1994). Il semble que l'aptitude de ces facteurs à stimuler la croissance des fibroblastes dépende du type de fibroblaste, de la concentration utilisée et de la capacité à induire la synthèse de facteurs de croissance (notamment à induire l'expression de la chaîne A du PDGF). De manière générale, le TGF β est plutôt un inhibiteur de la prolifération des fibroblastes, des cellules endothéliales et des cellules épithéliales. L'activité mitogène du TNF α et de l'IL-1 α dépend de la concentration utilisée : une faible concentration stimule la prolifération de certaines lignées de fibroblastes alors qu'une concentration plus élevée est cytotoxique (Sugarman et al., 1985; Vilcek et al., 1986; Palombella and Vilcek, 1989). Cette activité mitogène dépend également du taux de confluence des fibroblastes : l'effet mitogène est observé dans des cultures confluentes plutôt qu'éparses (Le and Vilcek, 1987).

2 - La production des composants matriciels

Le TGF β favorise l'élaboration de la matrice extracellulaire en intervenant à trois niveaux de régulation : (1) il induit la production des constituants de la matrice tels que les collagènes I et III ou la fibronectine ; (2) il inhibe l'activité de protéases qui dégradent la matrice extracellulaire en stimulant la production de leurs inhibiteurs tels que PAI, l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène, ou TIMP, l'inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases de la matrice ; (3) il réprime l'expression des métalloprotéinases telles que la stromélysine-1, la collagénase-1 ou l'activateur du plasminogène (Edwards et al., 1987; Sporn et al., 1987; Heino and Heinenen, 1990).

Excepté le PDGF, les facteurs de croissance et les cytokines pro-inflammatoires n'induisent pas l'augmentation de la synthèse des composants de la matrice (Kovacs and DiPietro, 1994).

3 - Le remaniement de la matrice extracellulaire

Les cytokines pro-inflammatoires, TNF α et IL-1, induisent le remaniement de la matrice extracellulaire interstitielle en favorisant sa dégradation à trois niveaux : (1) ils induisent la synthèse des métalloprotéinases collagénase-1 et stromélysine-1, et celle de l'activateur du plasminogène de type urokinase (uPA) ; (2) ils inhibent l'expression de leurs inhibiteurs PAI, TIMP-1 et TIMP-2 ; (3) ils inhibent la synthèse des constituants de la matrice extracellulaire (Heino and Heinonen, 1990; Circolo et al., 1991; Hamilton et al., 1991; Mackay et al., 1992; Mauviel, 1993).

Les facteurs de croissance sont également capables d'induire l'expression des métalloprotéinases, bien qu'avec moins d'efficacité que le TNF α ou l'IL-1 (Edwards et al., 1987; Circolo et al., 1991). Par contre, le TGF β dont les activités sont antagonistes, inhibe la synthèse des métalloprotéinases induite par les facteurs de croissance, le TNF α ou l'IL-1 (Edwards et al., 1987).

C - LA REGULATION DE L'EXPRESSION DU GENE *c-ets1*

1 - La régulation de l'activité promotrice

La dissection moléculaire du promoteur du gène *c-ets1* humain a mis en évidence au moins deux domaines de régulation négative et deux domaines de régulation positive (Figure 7) :

- Le domaine de régulation positive majeur est nécessaire et suffisant pour l'activation du gène *c-ets1* par le sérum (Majerus et al., 1992). Il contient des motifs AP-1, AP-2 et EBS (Figure 7), qui sont respectivement les sites de liaison pour les facteurs de transcription AP-1 (dimères c-Jun/c-Jun ou c-Jun/c-Fos), AP-2 et Ets (EBS, *Ets binding site*). L'analyse fonctionnelle du promoteur montre que les facteurs de transcription c-Jun, AP-2 et Ets1 sont effectivement capables d'activer la transcription du gène *c-ets1* par leur fixation sur leur site respectif (Oka et al., 1991; Majerus et al., 1992). L'auto-régulation positive de *c-ets1* s'observe aussi bien dans le contexte artificiel des constructions plasmidiques que sur le promoteur endogène dans des cellules (Seth and Papas, 1990).

- Le deuxième domaine de régulation positive du promoteur de *c-ets1* contient notamment un site de fixation pour les facteurs de transcription PEA3 (une sous-famille de la famille Ets), et deux sites de fixation pour des facteurs de transcription de la famille Oct (Chen and Wright, 1993). Ces sites sont fonctionnels car des facteurs PEA3, Oct1 et Oct2 transactivent efficacement le promoteur en se fixant sur leurs sites respectifs.

- Deux régions importantes de régulation négative ont été caractérisées en amont du promoteur de *c-ets1* (Figure 7) (Chen et al., 1993; Chen and Wright, 1993). Bien que leurs éléments régulateurs n'aient pas encore été caractérisés, ceux-ci pourraient notamment comprendre le facteur de transcription p53 (Iotsova, article en préparation). Les régions de régulation négative pourraient néanmoins contribuer de manière importante à la faible activité naturelle ou induite du gène *c-ets1*, au contrôle strict de son expression *in vitro* comme *in vivo*, et à l'expression tissu-spécifique de *c-ets1*.

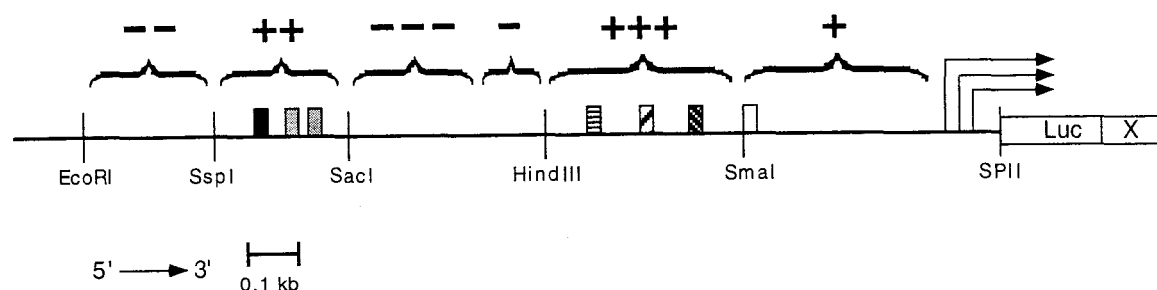


Figure 7 : Caractérisation du promoteur du gène *c-ets-1* humain. Sites d'initiation de la transcription multiples : flèches. Domaines de régulation positive/négative (+/-) et taux approximatifs d'activation/d'inhibition : +++ : x4 ; ++ : x1,5 ; + : basale ; --- : x0,3 ; -- : x0,4 ; - : x0,7. Principaux sites de liaison fonctionnels pour des facteurs de transcription : ■ PEA3 ; ▒ Oct ; ▨ AP-1 ; ▩ EBS ; ▪ AP-2 ; □ NF-KB-like.

2 - La régulation et la stabilité des transcrits *c-ets1*

Peu de publications rendent compte d'éléments extracellulaires et intracellulaires qui contrôlent l'expression du gène *c-ets1*. La répression de l'expression du gène *c-ets1* qui survient lors de l'activation de cellules T dépend d'une mobilisation du calcium intracellulaire, de l'activation de protéine kinases C et d'une néo-synthèse protéique (Bhat et al., 1990). La mesure de la stabilité des ARNs *c-ets1* dans des lignées de cellules T a révélé que les transcrits majoritaires de 6,8 kb

sont plus stables ($t_{1/2}$ ~5-6 h) que les transcrits minoritaires de 3,0 kb ($t_{1/2}$ ~1 h) (Collyn-d'Hooghe et al., 1993).

Par ailleurs, contrairement à celle de *c-ets2*, l'expression du gène *c-ets1* n'est ni superinduite ni stabilisée par la cycloheximide (qui est un inhibiteur de la synthèse protéique) dans des cellules épithéliales primaires (Bhat et al., 1987) ou dans des cellules T quiescentes (Bhat et al., 1990).

3 - La régulation de l'activité des protéines Ets1

D'autres niveaux de régulation se superposent au contrôle transcriptionnel de l'expression du gène *c-ets1*. L'activité des produits du gène *c-ets1* dépend de leur structure primaire (qui dépend notamment de l'épissage alternatif des exons IV et/ou VII) (Koizumi et al., 1990), de la stabilité des protéines Ets1, et de modifications post-traductionnelles par phosphorylation (Pognonec et al., 1989).

a) - Les isoformes des protéines Ets1

Les protéines Ets1 ont une durée de vie courte ($t_{1/2}$ ~90 min) et subissent un renouvellement rapide (Wasylyk et al., 1993).

Les transcrits *c-ets1* sont susceptibles de subir l'épissage alternatif des exons codants IV et VII. L'analyse électrophorétique des protéines Ets1 fait apparaître différentes isoformes ayant des tailles apparentes de 39, 42, 48, 49, 51 et 52 kDa. Celles-ci diffèrent d'une part par leur structure primaire (présence ou absence des domaines peptidiques correspondants aux exons IV et VII, voir ci-dessus), d'autre part par leur état de phosphorylation (Koizumi et al., 1990). Les isoformes de 49 et 52 kDa sont les formes phosphorylées respectives des protéines de 48 et 51 kDa, qui comportent notamment la séquence codée par l'exon VII. Celles de bas poids moléculaire, 39 et 42 kDa, sont en partie issues de transcrits alternatifs dépourvus d'exon VII (Koizumi et al., 1990). Par ailleurs, aucune modification post-traductionnelle par glycosylation n'a pu être détectée sur ces différentes isoformes.

b) - La phosphorylation des protéines Ets1

L'activation mitogénique des cellules lymphoïdes T et B induit une phosphorylation rapide et transitoire des protéines Ets1 qui dépend de la mobilisation du calcium intracellulaire (Pognonec et al., 1988; Koizumi et al., 1990; Fisher et al., 1991). Cette phosphorylation s'effectue sur des résidus sérine (notamment la Ser²⁸²) situés dans le domaine de régulation adjacent au domaine de liaison à l'ADN et codé par l'exon VII (Rabault and Ghysdael, 1994). Les isoformes de Ets1 correspondant aux transcrits alternatifs sans exon VII sont d'ailleurs insensibles à une phosphorylation dépendante du calcium (Koizumi et al., 1990; Pognonec et al., 1990). Le domaine de régulation codé par l'exon VII est impliqué dans un contrôle intramoléculaire de l'activité de liaison à l'ADN des protéines Ets1 (Wasylyk et al., 1992). Sa phosphorylation inhibe la capacité des facteurs de transcription Ets1 à se fixer à leurs séquences d'ADN spécifiques, sans altérer leur aptitude à migrer dans le noyau (Fisher et al., 1994; Rabault and Ghysdael, 1994). Les protéine kinases impliquées dans la phosphorylation calcium-dépendante des protéines Ets1 pourraient correspondre aux *myosin light chain* kinases (MLCK) plutôt qu'aux Ca²⁺/calmodulin kinases (CaMKII) (Fleischman et al., 1993; Fisher et al., 1994; Fleischman et al., 1995).

Par ailleurs, les protéines Ets1 sont susceptibles d'être phosphorylées au niveau de la thréonine 38 dans la partie amino-terminale de la protéine. Cette thréonine se trouve au sein d'une séquence consensuelle pour des kinases de la famille des *Mitogen-Activated Protein* (MAP) kinases. Elle est phosphorylée *in vitro* par des MAP kinases ou *in vivo* dans des fibroblastes en réponse au sérum ou à l'activation de Ras (Rabault and Ghysdael, 1994). La phosphorylation de la Thr³⁸ augmente l'activité transactivatrice des protéines Ets1 (Yang et al., 1996).

Le type de phosphorylation des protéines Ets1 semble corrélé à l'activité du gène *c-ets1*. La phosphorylation calcium-dépendante qui inhibe la liaison à l'ADN des protéines Ets1 s'accompagne d'une diminution de l'expression du gène *c-ets1* (Kaufmann et al., 1987). A l'inverse, le sérum stimule l'expression du gène *c-ets1* (Majerus et al., 1992), et augmente l'activité transactivatrice des protéines Ets1 (Rabault and Ghysdael, 1994). Ceci suggère que la boucle d'autorégulation du gène *c-ets1* par les facteurs de transcription qu'il code (Seth and Papas,

1990; Oka et al., 1991; Majerus et al., 1992) pourrait être un mécanisme important dans le contrôle de l'expression du gène *c-ets1*.

D - ORIENTATION DE LA RECHERCHE

Dans les fibroblastes du stroma tumoral, l'expression de *c-ets1* semble induite par des facteurs solubles produits et diffusés localement au niveau des foyers de cellules cancéreuses. Dans cette deuxième partie nous avons tout d'abord évalué cette hypothèse en mesurant l'effet de facteurs produits par des lignées de cellules tumorales ainsi que des facteurs fibrogéniques caractérisés sur l'expression de *c-ets1* dans les cultures primaires de fibroblastes humains. Après avoir déterminé différents facteurs capables de stimuler l'expression de *c-ets1* dans les fibroblastes, nous avons déterminé les modalités d'actions du plus efficace d'entre eux, le Tumor Necrosis Factor.

II - RESULTATS

A - ARTICLE 2

Le proto-oncogène *c-ets1* est un nouveau gène de réponse précoce différemment régulé par des cytokines et des facteurs de croissance dans les fibroblastes humains.

The *c-ets1* proto-oncogene is a new early-response gene differentially regulated by cytokines and growth factors in human fibroblasts.

Frédéric Gilles, Marie-Berthe Raes, Dominique Stéhelin, Bernard Vandebunder et
Véronique Fafeur.

[EXPERIMENTAL CELL RESEARCH 222, 370-378, 1996]

Résumé

Dans différentes tumeurs invasives humaines, les ARNs pour *c-ets1* sont sélectivement exprimés dans des fibroblastes du stroma. Nous avons à présent testé la possibilité que des facteurs solubles puissent réguler l'expression de *c-ets1* dans des cultures de fibroblastes humains. Nous avons montré qu'aussi bien des milieux conditionnés par des lignées de cellules tumorales, qu'un certain nombre de cytokines et facteurs de croissance caractérisés étaient capables d'induire l'expression de *c-ets1*. Le TNF α et l'IL-1 α se sont avérés être les stimulateurs les plus puissants, induisant une augmentation rapide (dans l'intervalle d'une heure) et durable (d'au moins 19 heures) de l'expression des transcrits et des protéines pour *c-ets1*. Par contre, le bFGF, l'EGF et le PDGF se sont révélés être des stimulateurs plus modérés et tardifs, avec un effet maximal détecté à 19 heures. De plus ces facteurs de croissance potentialisent l'induction précoce de *c-ets1* par le TNF α . Alors que tous ces facteurs sont capables de stimuler l'expression de *c-ets1*, le TGF β s'est montré inefficace. En utilisant des inhibiteurs de la transcription et de la traduction, nous

avons également montré que l'augmentation des transcrits *c-ets-1* par le $\text{TNF}\alpha$ provenait d'une néotranscription plutôt que d'une stabilisation, et ne nécessitait pas de nouvelle synthèse protéique. Ces résultats démontrent que *c-ets1* est une nouvelle cible nucléaire pour plusieurs facteurs, et se comporte comme un gène de réponse précoce au $\text{TNF}\alpha$.

The *c-ets-1* Proto-oncogene Is a New Early-Response Gene Differentially Regulated by Cytokines and Growth Factors in Human Fibroblasts

FRÉDÉRIC GILLES, MARIE-BERTHE RAES, DOMINIQUE STÉHELIN, BERNARD VANDENBUNDER,¹
AND VÉRONIQUE FAFEUR

Unité d'Oncologie Moléculaire (CNRS URA 1160), Institut Pasteur de Lille, Lille, France

In various invasive human tumors, *c-ets-1* mRNA was found to be selectively expressed in stromal fibroblasts. We have now investigated the possibility that soluble factors could regulate *c-ets-1* expression in cultured human fibroblasts. We show that both conditioned media from tumor cell lines and a number of characterized cytokines and growth factors were able to induce *c-ets-1* expression. TNF α and IL-1 α were the most potent *c-ets-1* stimulators, inducing rapid (within 1 h) and long-lasting (19 h) increases of *c-ets-1* mRNA and protein expression. In contrast, bFGF, EGF, and PDGF were mainly delayed stimulators, with maximal stimulation being detected by 19 h. In addition, these growth factors potentiated the rapid induction of *c-ets-1* by TNF α . While all these factors were able to stimulate *c-ets-1* expression, TGF β was found to be ineffective. Using inhibitors of transcription and translation, we also found that increase of *c-ets-1* mRNA by TNF α resulted from new transcription rather than from stabilization and did not require new protein synthesis. These results demonstrated that *c-ets-1* is a new nuclear target for several factors and behaves as an early-response gene for TNF α . © 1996 Academic Press, Inc.

INTRODUCTION

The *ets* oncogene (*v-ets*) was originally discovered within the genome of the avian leukemia virus E26 [1, 2], resulting from transduction of the *c-ets-1* proto-oncogene. *c-ets-1* is the founder of the Ets family of transcription factors, which is defined by a highly conserved DNA-binding domain of ca 85 amino acids which recognizes specific nucleotide sequences with a GGAA/T core sequence [3, 4]. The Ets transcription factors may transactivate many viral and cellular promoters,

including the promoters of growth factors genes, proto-oncogenes, genes encoding proteins important for immune functions, and extracellular matrix degrading proteases (for reviews see [5–8]). During the past few years, extensive investigations have led to a better understanding of the molecular structure and properties of the Ets-1 proteins (for reviews see [6–8]), but their role in biological processes and the mechanisms of their induction are still poorly understood.

The restricted patterns of *c-ets-1* mRNA expression observed during embryonic and tumor development suggested that Ets-1 transcription factors take part in various physiological and pathological processes. Initial studies in chicken [9] and mouse tissues [10] have shown that *c-ets-1* mRNAs are preferentially detected in lymphoid organs, and it has been suggested that Ets-1 could mediate some aspects of T-cell development and maturation in fetal thymus [11], as well as T-cell activation in adults [12, 13]. However, *in situ* analysis of developing embryos revealed that *c-ets-1* was also expressed in endothelial cells of new forming blood vessels [14, 15] and in mesenchymal cells at the vicinity of epithelia during branching morphogenesis in the kidney and in the lung or during limb bud formation [15–18]. In contrast, most epithelial cells did not express *c-ets-1* mRNA [15]. The features of *c-ets-1* expression in human tumors were reminiscent of the patterns of *c-ets-1* expression in the embryos. Transcripts for *c-ets-1* appeared to accumulate in endothelial cells of blood vessels that sprout to irrigate tumors, as well as in stromal fibroblasts at the front of tumor invasion. In contrast no expression of *c-ets-1* was detected in more distant stromal cells and in epithelial cancer cells [14, 19].

The spatial distribution of *c-ets-1* transcripts observed in various invasive tumors suggested that soluble factors produced by neighboring stromal or tumor cells may induce *c-ets-1* in human fibroblasts [19]. Cytokines and growth factors production has been described in different cancer cell lines, freshly isolated tumor cells, and within solid tumor islands *in vivo*. In con-

¹ To whom correspondence and reprint requests should be addressed at Unité d'Oncologie Moléculaire (CNRS URA 1160) Institut Pasteur de Lille, 1, rue Calmette, F-59019 Lille, France. Fax: (33)20.87.79.08.

trast, absent or low expression of these cytokines and growth factors was found in normal tissues distant from tumor. Tumor cells and infiltrating activated macrophages associated to tumor islands are the most documented sources of factors. The factors often reported in tumor microenvironment are TNF α [20–24], TGF β [21, 25], bFGF [26], IL-1 [27, 28], EGF, TGF α , PDGF, VEGF, and M-CSF [29, 30]. Such diffusible factors may orchestrate several aspects of the interactions between stromal and tumor cells.

In the present work, we investigated the regulation of *c-ets-1* gene expression by extracellular factors in primary cultures of normal human foreskin fibroblasts (HFF). We demonstrated that factors produced by tumor cell lines or at tumor sites increased the amount of *c-ets-1* transcript in fibroblasts. We then compared the abilities of TNF α , IL-1 α , bFGF, EGF, PDGF, and TGF β to stimulate *c-ets-1* transcripts and protein expression, and we evaluated the effects of the combination of TNF α with the other factors assayed. Finally, we investigated more precisely at which levels *c-ets-1* gene expression is activated by TNF α .

MATERIALS AND METHODS

Cells and cell culture. Primary cultures of human foreskin fibroblasts (HFF) were kindly provided by Dr. Thomas Jones, Lederle Laboratories (Pearl River, NY). Cells from passages 11 to 30 were used. Cells were plated in 100-mm cell culture dishes and maintained in culture in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS), 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, and 2 mM glutamine, in humidified air with 5% CO $_2$ at 37°C. Tumor cell lines HeLa (human epitheloid cervix carcinoma), Colo 320 HSR (human colorectal adenocarcinoma), and MCF7 (human breast adenocarcinoma) were obtained from the American Type Culture Collection and were cultured under similar conditions.

Preparation of conditioned media. Tumor cells were grown until subconfluence in DMEM containing 10% FCS. Cells were rinsed and maintained for 48 h in DMEM without FCS. The medium was removed, filtered on 0.45- μ m membranes, and stored at -20°C until use.

Cytokines, growth factors, and chemicals. Recombinant human tumor necrosis factor- α (TNF α), natural human transforming growth factor- β -type 1 (TGF β -1), porcine natural platelet derived growth factor type B-B (PDGF), recombinant human interleukin-1 α (IL-1 α), and recombinant human basic fibroblast growth factor (bFGF) were obtained from R&D Systems (Oxon, UK). Recombinant human epidermal growth factor (EGF) was from Bachem (Switzerland). Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), cycloheximide (CHX), and 5,6-dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazole (DRB) were purchased from Sigma. All cytokines and growth factors were stored and used at suboptimal concentrations according to manufacturer's recommendations. The biological activities of the cytokines and growth factors were assessed by measuring the inducibility of collagenase-1 and stromelysin-1 genes expression by PMA, TNF α , bFGF, EGF, and IL-1 α , of urokinase-type plasminogen activator gene expression by PDGF, and of plasminogen activator inhibitor-type 1 gene expression by TGF β as previously described ([19] and data not shown).

cDNA probes. The 825-bp EcoRI coding fragment from the human *c-ets-1* cDNA [19], the 1.3-kbp PstI coding fragment of the rat glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), and a 500-pb coding

fragment of the rat β -actin cDNA obtained by polymerase chain reaction [31] were used as templates to synthesize probes for Northern blot experiments. These cDNA probes were labeled with [α - 32 P]dCTP (3000 Ci/mmol, ICN), with a Nick-translation kit purchased from Amersham.

RNA extraction and Northern blot analysis. Human fibroblasts were grown in DMEM containing 10% FCS until they reached subconfluence. At that time, the medium was replaced by DMEM containing 0.5% FCS, and cytokines or pharmacological reagents were added to the cells. At the end of the experiment, total RNAs were isolated from the cells using the guanidium isothiocyanate/CsCl method [32]. Cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and then lysed in 4.7 M guanidine thiocyanate, 0.02 M sodium acetate, 0.05 M Tris-HCl, pH 7.4, 0.5% sodium sarcosinate, 0.1 M 2-mercaptoethanol. Total RNAs were isolated through a CsCl ($d = 1.68$) gradient by centrifugation at 28,000 rpm for 18 h at 18°C (SW41 rotor-L8 ultracentrifuge, Beckman). The RNA pellets were resuspended in water, purified by phenol/chloroform (1:1, v/v) and chloroform extractions, and then ethanol precipitated at -20°C for at least 2 h. After centrifugation at 20,000g for 45 min at 4°C, the concentration of RNA resuspended in water was determined by absorbance at 260 nm. Fifteen to 20 μ g of RNA was heat-denatured (68°C, 5 min), ethidium bromide-stained, and separated by electrophoresis in 1.2% agarose gel containing 17% formaldehyde in 1 \times Mops buffer (19.6 mM 3-(*N*-morpholino)propanesulfonic acid (Mops, Sigma), 5 mM sodium acetate, 1 mM EDTA, pH 7.0). RNAs were then transferred onto nitrocellulose filters (Hybond C extra, Amersham). Filters were fixed by baking for 2 h at 80°C and hybridized with the [α - 32 P]cDNA probes overnight at 42°C in hybridization buffer (50% formamide, 1 M NaCl, 1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 10% dextran sulfate (w/v) 5 \times Denhardt's solution (denatured salmon sperm DNA at 100 μ g/ml)). The filters were washed progressively to high stringency (from 2 to 0.1 \times SSC, containing 0.1% SDS, at 60°C) and exposed to X-OMAT K films (Kodak) or Hyperfilm MP (Amersham) for several days.

Immunoprecipitation. Metabolic labeling of proteins was processed during the last 4 h of treatment with cytokines and growth factors. Subconfluent fibroblasts were washed and incubated for 30 min in methionine- and cysteine-free modified Eagle's medium (Gibco). Cells were then incubated for 4 h with 40 μ Ci/ml L-[35 S]-methionine and -cysteine (Tran35S-Label 1066 Ci/mmol, ICN). After labeling, cells were washed twice in ice-cold PBS and lysed on ice in RIPA buffer (RIPA:10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 0.5% aprotinin (Sigma)). The lysates were clarified by centrifugation at 100,000g for 30 min at 4°C and 0.5 to 1.10 7 cpm of the resulting supernatants were incubated for 2 h at 4°C with anti-Ets-1 rabbit polyclonal antisera used at dilutions 1/200 [33]. Immunocomplexes were isolated using protein A-Sepharose beads for 45 min at 4°C under gentle agitation. Immunocomplexes were then sequentially washed in RIPA, RIPA/0.35 M NaCl, RIPA/TNE (1:1, v/v), and TNE (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, aprotinin 0.5%). Proteins were recovered by boiling for 5 min in SDS-PAGE buffer and loaded onto 10% SDS-polyacrylamide gels [34]. Gels were fixed and treated with DMSO-PPO for autoradiographic enhancement and exposed for autoradiography using Hyperfilm MP (Amersham).

Quantification of the radioactivity. When indicated, the amount of 35 S-radiolabeled proteins and the amount of transcript hybridized with 32 P-labeled cDNA probes were determined by scanning the autoradiographs with a densitometer (Bioprofil V4.6, France) or counting the gels and blots with a PhosphorImager (Molecular Dynamics, Inc., U.S.A.).

RESULTS

Soluble Factors Produced by Tumor Cells Stimulated c-ets-1 Expression in Fibroblasts

The ability of factors produced by tumor cells to induce *c-ets-1* expression in fibroblasts was assayed by

applying on subconfluent monolayers of HFF conditioned media prepared from tumor cell lines of different origins (HeLa, Colo 320 HSR, and MCF7). The expression of *c-ets-1* transcripts was measured in untreated or treated fibroblasts, as well as in unstimulated tumor cells. Under basal conditions, fibroblasts or tumor cells expressed undetectable amounts of *c-ets-1* transcript, whereas cultured fibroblasts treated with conditioned media from tumor cells highly expressed *c-ets-1* (Fig. 1). $\text{TNF}\alpha$ was used as a positive control for comparison with the experiments described below. These results indicated that tumor cell lines produced *in vitro* soluble factors able to stimulate the expression of *c-ets-1* in fibroblasts.

Rapid and Delayed Effects of Cytokines and Growth Factors on *c-ets-1* mRNA and Protein Expression

We subsequently tested different cytokines and growth factors ($\text{TGF}\beta$, $\text{TNF}\alpha$, PDGF, bFGF, EGF, and $\text{IL-1}\alpha$), as well as the tumor promoter PMA, for their ability to induce *c-ets-1* expression in HFF. PMA known to induce *c-ets-1* in endothelial cells [14] was a good candidate for *c-ets-1* induction. The expression of *c-ets-1* was assayed after short-term (4 h, Fig. 2A) and long-term treatments (19 h, Fig. 2B). The amount of *c-ets-1* transcript in unstimulated cells was undetectable in most experiments but occasionally could be detected at a low level. $\text{TNF}\alpha$ and $\text{IL-1}\alpha$ strongly increased (four- to fivefold) the amount of the 6.8-kb *c-ets-1* transcript at both times. On the other hand, PDGF, bFGF, and EGF only induced *c-ets-1* expression at 19 h by two- to threefold. $\text{TGF}\beta$ was ineffective in inducing *c-ets-1* expression at 4 h and had a small effect on *c-ets-1* transcript at 19 h (Fig. 2B). In other experiments, $\text{TGF}\beta$ was found to be ineffective at 19 h (data not

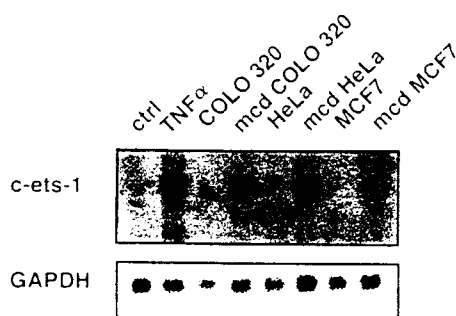


FIG. 1. Tumor cell lines produce factors that activate fibroblasts to express *c-ets-1*. Subconfluent fibroblasts were maintained for 4 h in medium alone (negative control, ctrl), in medium containing 10 ng/ml $\text{TNF}\alpha$, or in conditioned media (mcd) prepared from cultures of Colo 320 HSR, HeLa, and MCF7 tumor cell lines. Total RNAs were extracted from fibroblasts as well as from tumor cell lines and processed for Northern blot analysis. GAPDH was used as a control for the amount of loaded RNA onto the gel. The sizes of the transcripts were 6.8 kb for *c-ets-1* and 1.4 kb for GAPDH.

shown). Similar increases in the accumulation of *c-ets-1* transcript were observed in the human MRC5 fibroblastic cell line upon treatment with PMA, $\text{TGF}\beta$, $\text{TNF}\alpha$, bFGF, and PDGF (data not shown).

The ability of cytokines and growth factors to induce *c-ets-1* expression at different times was further analyzed in time-course experiments with $\text{TNF}\alpha$ and bFGF. The increase in *c-ets-1* mRNA expression was detected within 1 h of stimulation by $\text{TNF}\alpha$, peaked at 2–4 h, and remained elevated for at least 24 h (Fig. 3). A slight decrease in *c-ets-1* expression was reproducibly observed at 6 h with $\text{TNF}\alpha$, suggesting a bimodal kinetic for the accumulation of *c-ets-1* mRNAs (Fig. 3 and data not shown). Following stimulation by bFGF, *c-ets-1* mRNA expression increased weakly within 1 h, returned to basal level by 4 to 8 h, and peaked again at a higher level by 12 to 48 h (Fig. 3). These time-course experiments confirmed that $\text{TNF}\alpha$ was a potent inducer of *c-ets-1* expression for a large period of time, whereas bFGF appeared to stimulate *c-ets-1* expression mainly after 12 h of stimulation.

In human cells, the 6.8-kb *c-ets-1* mRNA species encompass four related transcripts generated by the independent alternative splicing of the two coding exons IV and VII [35]. In particular, exon VII encodes a protein sequence containing putative phosphorylation sites, which might affect the activity of the Ets-1 proteins [36]. Primer oligonucleotides A5 and E7 [37] that allowed the distinction between the four alternative transcripts of *c-ets-1* were used in reverse transcriptase-polymerase chain reaction experiments. Whether fibroblasts were stimulated with PMA, $\text{TGF}\beta$, $\text{TNF}\alpha$, PDGF, or bFGF, the full-length *c-ets-1* mRNAs were always the major species (by about 95%), whereas the mRNAs lacking exon VII were weakly expressed (by about 5%) and those lacking exon IV or exons IV and VII were rare (data not shown). Therefore, cytokines and growth factors did not appear to change the relative balance among these four related transcripts.

The amount of neosynthesized Ets-1 protein was measured by immunoprecipitation after 4 h (Fig. 4A) or 19 h (Fig. 4B) of stimulation with cytokines and growth factors. At both times, PMA, $\text{TNF}\alpha$, and $\text{IL-1}\alpha$ increased Ets-1 proteins, whereas bFGF, PDGF, and EGF induced Ets-1 proteins synthesis at delayed time (19 h). No increase in Ets-1 proteins was obtained with $\text{TGF}\beta$. Thus, the amount of Ets-1 protein correlated with that of *c-ets-1* transcript described in Fig. 2, suggesting no regulatory step between *c-ets-1* mRNA and protein production. The apparent molecular weight of Ets-1 proteins detected in HFF indicated that full-size p51 Ets-1 proteins were the main forms expressed in these cells, whereas the lower-size Ets-1 isoforms that lack the exon VII-coded domain [38, 39] were barely detectable.

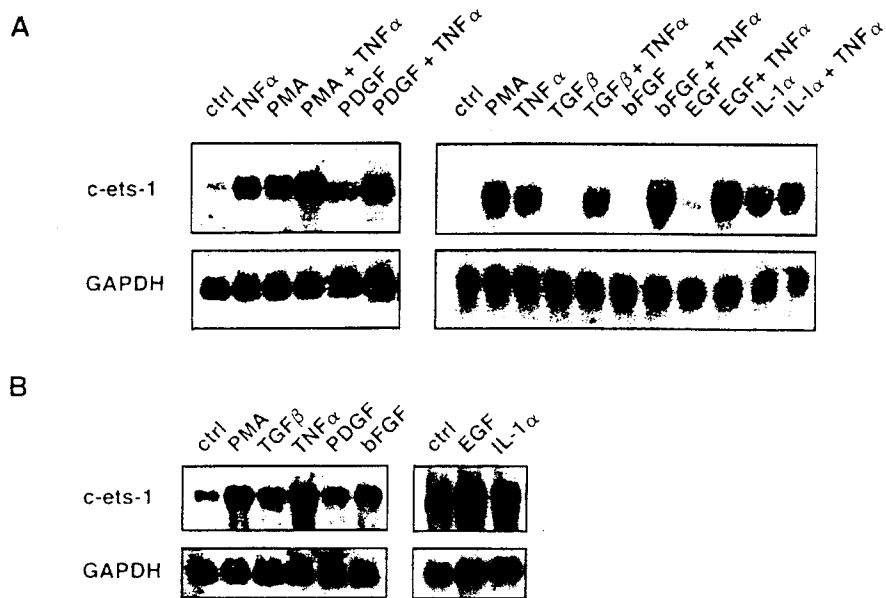


FIG. 2. Effect of cytokines and growth factors on *c-ets-1* mRNA expression in fibroblasts. Subconfluent fibroblasts were stimulated for (A) 4 h or (B) 19 h with none (ctrl), 10 ng/ml PMA, 5 ng/ml TGF β , 10 ng/ml TNF α , 10 ng/ml PDGF, 10 ng/ml bFGF, 50 ng/ml EGF, or 5 ng/ml IL-1 α . In (A), factors were applied alone or in combination with 10 ng/ml TNF α . The expression of *c-ets-1* and GAPDH genes were assessed by Northern blot analysis as described. Note that each set of autoradiograms corresponds to independent experiments.

Growth Factors Potentiated the Early Induction of *c-ets-1* by TNF α

Results presented in Figs. 2–4 indicated that several cytokines and growth factors could induce *c-ets-1* mRNA and protein expression with different potency

and different latency. All these factors act through distinct and specific cell surface receptors [40–43] and consequently are thought to initiate signal transduction by separate mechanisms. Thus, the different behavior of these factors on *c-ets-1* expression may be due to the activation of different signaling pathways, which effects on *c-ets-1* might be synergistic or additive.

In order to further compare TNF α with the other factors, we examined the effects of combining these factors on the early induction of *c-ets-1* mRNA expression. After 4 h of stimulation, bFGF, PDGF, or EGF enhanced the induction of *c-ets-1* mRNA expression by TNF α (Fig. 2A), whereas TNF α in combination with IL-1 α had the same effect as TNF α or IL-1 α alone (Fig. 2A). TGF β , which was found ineffective by itself on *c-ets-1* expression, did not affect the stimulatory effect of TNF α (Fig. 2A). We also established a dose–response of TNF α (0.01–100 ng/ml) in the presence or absence of bFGF (10 ng/ml). While a dose-dependent increase in *c-ets-1* mRNA expression was obtained with TNF α alone, a maximal stimulation of *c-ets-1* expression was obtained at all concentrations of TNF α tested in the presence of bFGF (Fig. 5). Thus, the addition of bFGF allowed TNF α to induce *c-ets-1* expression at lower concentrations. These data suggested that TNF α and IL-1 α induced *c-ets-1* mRNA expression with common steps in their signaling pathways, whereas bFGF, PDGF, or EGF used another independent pathway.

We analyzed in parallel the effect of combining growth factors and cytokines on Ets-1 protein levels.

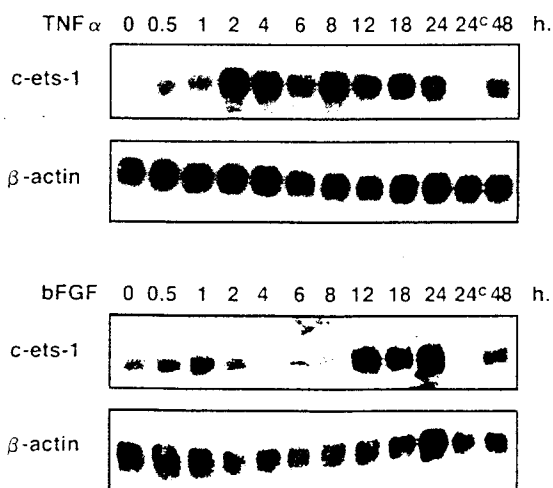


FIG. 3. Time course of *c-ets-1* mRNA induction by TNF α and bFGF. Fibroblasts were treated for times ranging from 0 to 48 h with 10 ng/ml TNF α or 10 ng/ml bFGF. 24^c indicates an incubation for 24 h without TNF α or bFGF. RNAs were then processed for Northern blot analysis and the blots were hybridized to radiolabeled *c-ets-1* or β -actin cDNA probes. β -Actin (~1.8 kb) was used as a control for the amount of RNA loaded onto the gel.

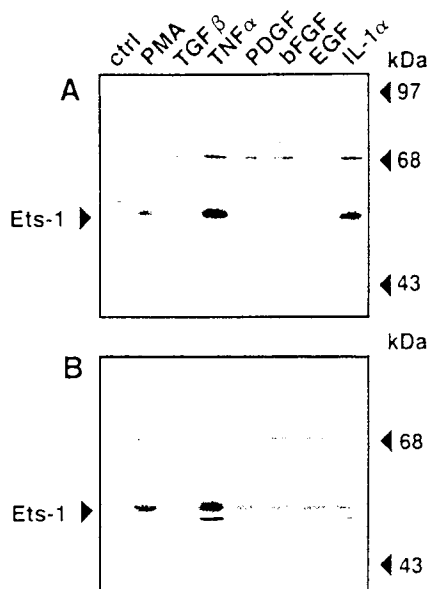


FIG. 4. Induction of Ets-1 protein expression by cytokines and growth factors. Subconfluent fibroblasts were treated with none (ctrl) or with PMA (10 ng/ml), TGF β (5 ng/ml), TNF α (10 ng/ml), PDGF (10 ng/ml), bFGF (10 ng/ml), EGF (50 ng/ml), or IL-1 α (5 ng/ml). In (A), cells were incubated for 4 h in the presence of these agents and of [³⁵S]methionine-cysteine. In (B), the cells were incubated with the same agents for 19 h, and [³⁵S]methionine-cysteine was added during the last 4 h of incubation. Radiolabeled Ets-1 proteins produced during the stimulation were immunoprecipitated with an anti-Ets-1 antiserum and analyzed by SDS-PAGE. Position of the major p51 Ets-1 protein is indicated by an arrow and the molecular weight markers are indicated on the right. The thin band obtained at ~68 kDa is a nonspecific band which allowed the monitoring of equal loading of immunoprecipitated samples. These signals were obtained after 5-day exposure with a film for autoradiography.

As shown for *c-ets-1* mRNAs, PDGF, bFGF, and EGF increased Ets-1 protein induction by TNF α , whereas TGF β combined to TNF α had no greater effect than TNF α alone (Fig. 6). In contrast, the induction of Ets-1 proteins by IL-1 α was not significantly enhanced by growth factors (Fig. 6).

c-ets-1 Behaved as an Early TNF α -Responsive Gene

In order to examine the mechanisms by which TNF α increased the amount of *c-ets-1* transcript within few hours, we used various pharmacological inhibitors which allow us to discriminate between new transcription and/or stabilization of *c-ets-1* mRNAs. Both actinomycin D (1 μ g/ml), which inhibits transcriptional initiation, or DRB (25 μ g/ml), which leads to the premature termination of the transcriptional elongation, prevented the induction of *c-ets-1* by TNF α (Fig. 7). These results suggested that the increase in the level of *c-ets-1* mRNAs after 4 h stimulation by TNF α arose mainly from an activated transcription of the *c-ets-1* gene. CHX (10 μ g/ml), which inhibited protein synthesis, could not

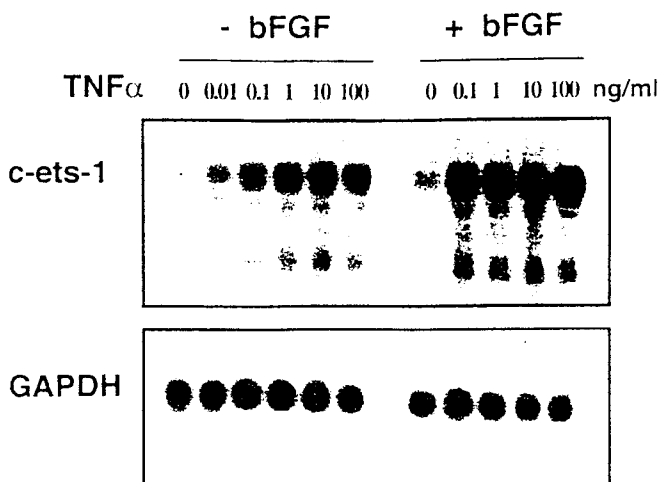


FIG. 5. Potentiation of the TNF α stimulated *c-ets-1* induction by bFGF. Fibroblasts were treated for 4 h with TNF α applied at concentrations ranging from 0 to 100 ng/ml, in the presence or absence of 10 ng/ml bFGF. Total RNAs were recovered and processed for Northern blot analysis for *c-ets-1* and GAPDH expressions. The lower *c-ets-1* mRNA species of 2.7 kb appearing here, although not shown in most of the other experiences, are always produced together with 6.8-kb *c-ets-1* mRNA species and result from an alternative polyadenylation site [37].

abrogate the induction of *c-ets-1* after 4 h incubation with TNF α . These results were in agreement with *c-ets-1* behaving as an early response gene for TNF α .

The fact that CHX by itself increased *c-ets-1* transcripts accumulation and that this induction could also be prevented by DRB indicated that CHX action might involve the removal of labile protein repressors from the *c-ets-1* promoter. This effect was distinguishable

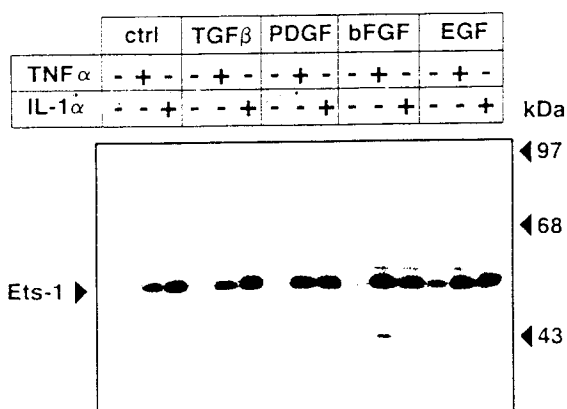


FIG. 6. Effect of combinations of growth factors with TNF α and IL-1 α on Ets-1 protein expression. Subconfluent fibroblasts were treated with none (ctrl), TNF α (10 ng/ml), or IL-1 α (5 ng/ml) alone or combined with TGF β (5 ng/ml), PDGF (10 ng/ml), bFGF (10 ng/ml), or EGF (50 ng/ml) as indicated. The cell treatment for 4 h and the immunoprecipitation procedure were as described Fig. 4.

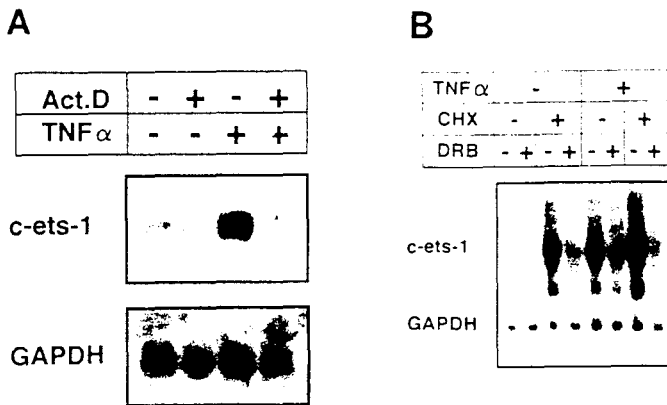


FIG. 7. Effect of transcriptional and translational inhibitions on TNF α -induced *c-ets-1* mRNA expression. In (A), subconfluent fibroblasts were pretreated (+) or not (-) for 1 h with 1 μ g/ml actinomycin D and were then stimulated (+) or not (-) for 4 h with 10 ng/ml TNF α in the presence of actinomycin D. In (B), subconfluent fibroblasts were pretreated (+) or not (-) for 1 h with 25 μ g/ml DRB and/or 10 μ g/ml CHX. Cells were then stimulated (+) or not (-) for 4 h with 10 ng/ml TNF α in the presence of DRB and/or CHX as indicated. Total RNAs were prepared and subjected to Northern blot procedure for *c-ets-1* and GAPDH expression.

from the one of TNF α since CHX and TNF α had cumulative effects on *c-ets-1* expression (Fig. 7). We also analyzed the stability of *c-ets-1* mRNAs following TNF α or CHX treatment. Cells were stimulated by TNF α or CHX for 4 h, and DRB was added for 1 to 6 h. The rate of *c-ets-1* mRNA decay was similar in unstimulated cells and in TNF α -stimulated cells (data not shown), with a half-life of 1 to 2 h. In contrast, in CHX-treated cells, the level of *c-ets-1* mRNA remained elevated 4 h after transcriptional inhibition (data not shown). Taken together, these results suggested that TNF α induced the new synthesis of *c-ets-1* transcripts, whereas CHX induced both transcription and stabilization of *c-ets-1* transcripts.

The stability of Ets-1 proteins in fibroblasts in the absence or presence of TNF α was estimated by chase experiments of ³⁵S-radiolabeled proteins. In unstimulated HFF, Ets-1 protein half-life determined with a long-term exposure of the autoradiography film was 45 to 60 min (Fig. 8). In cells treated with TNF α , the half-life of Ets-1 proteins was reproducibly increased by twofold (Fig. 8). Thus, the increase in Ets-1 proteins by TNF α described above (Fig. 4) resulted mainly from neosynthesis and also, to a lesser extent, from an increased protein half-life.

DISCUSSION

In various human invasive carcinomas, *c-ets-1* expression within stromal fibroblasts directly adjacent to invasive tumor formations suggested that, during

tumor development, diffusible factors produced by cancer cells or by other cell types could induce *c-ets-1* expression within the stromal fibroblasts. This hypothesis was supported by the ability of fetal calf serum to stimulate the activity of the human *c-ets-1* promoter [44], which indicated that factors present in serum could induce *c-ets-1* expression. In the present study, we demonstrated that tumor cells themselves could be a source of factors able to induce *c-ets-1* expression in human fibroblasts. In tumor environment, a number of physiological factors have been detected, and in some cases the producing cell types have been identified, which include cancer cells, inflammatory cells, endothelial cells, and fibroblastic cells (reviewed in [30]). We now demonstrate that several cytokines and growth factors produced at tumor sites were able to induce *c-ets-1* expression in human fibroblasts, with TNF α and IL-1 α being more potent than bFGF, PDGF, and EGF. Interestingly, in tumors, TNF α and IL-1 α are produced in high amounts by macrophages [45] and TNF α was found to be highly expressed in stromal areas adjacent to invasive foci [23, 24], a localization which is similar to the pattern of expression of *c-ets-1* that we previously reported [19]. It is likely that several factors may cooperate to increase *c-ets-1* mRNA expression *in vivo* and indeed our data show possible additive effects of cytokines on *c-ets-1* mRNA expression *in vitro*. The current knowledge of physiological factors able to induce *c-ets-1* expression in nonlymphoid cells includes these present results, our preliminary findings in human fibroblasts [19] and the effect of TNF α in endothelial cells [14]. It has also been suggested that *c-ets-1* induction in fibroblasts may occur in response to physical contact with a tumor cell associated substrate [46].

The different potency and latency of cytokines and growth factors for inducing *c-ets-1* expression allowed us to distinguish among three groups of factors: (1)

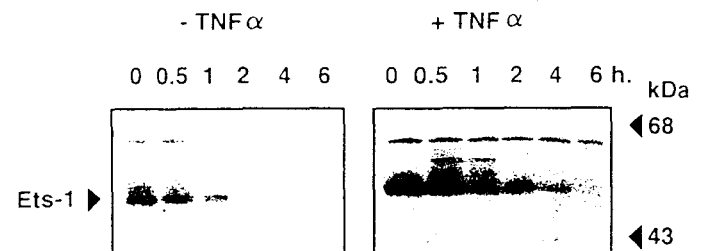


FIG. 8. Half-life of Ets-1 proteins stimulated by TNF α . Fibroblasts were incubated with [³⁵S]methionine-cysteine for 4 h with (+) or without (-) TNF α (10 ng/ml). Thereafter, the medium was replaced by fresh unlabeled medium containing 10% FCS, and proteins were then extracted after an additional period of 0 to 8 h. Radiolabeled Ets-1 proteins were immunoprecipitated using an anti-Ets-1 serum. Different exposures of autoradiography films are shown for unstimulated cells and TNF α -treated cells, 3 weeks and 5 days, respectively, to allow the comparison of Ets-1 protein decay.

TNF α and IL-1 α were rapid and long-lasting stimulators of *c-ets-1* expression and had no additive effects when added together; (2) bFGF, PDGF, and EGF were mainly delayed stimulators and potentiated *c-ets-1* induction by TNF α ; (3) TGF β was ineffective in inducing *c-ets-1* expression, even when combined with TNF α . The different abilities of cytokines and growth factors to induce *c-ets-1* expression may be related to the different structures and activities of their specific cell surface receptors. The cytosolic domains of the bFGF, PDGF, and EGF receptors have tyrosine kinase activities (for review see [40]), and the cytosolic domains of the TGF β receptors have serine/threonine kinase activities [41], which contrast with the absence of intrinsic kinase activities for the TNF α and IL-1 α receptors [42, 43]. The differences between the enzymatic activities of their receptors argue in favor of TNF α and IL-1 α being able to initiate signal transduction through distinct mechanisms from those of bFGF, PDGF, and EGF. Our kinetic and combination studies further suggested that these two groups of factors can activate different signaling pathways that most likely do not crossover but rather converge to induce *c-ets-1*. Based on these findings, it remains to unravel the mechanisms underlying the common ability of each factors to induce *c-ets-1* expression. For example, the TNF α and IL-1 α receptors, devoided of intrinsic kinase activities, are unrelated to each other. Nonetheless, the activation of *c-ets-1* by both TNF α and IL-1 α is similar to the transient stimulation of *c-fos* and *c-myc* expression by these factors in human fibroblasts [47]. This further suggests that TNF α and IL-1 α may operate through common signaling pathways. Whether the common event(s) induced by TNF α and IL-1 α includes the formation of phosphoinositides metabolites, free intracellular Ca²⁺, phosphorylation of proteins, or the recently described sphingomyelin metabolic pathway [48] remains to be determined. Altogether, our data indicate that at least two routes can converge to increase *c-ets-1* expression in fibroblasts, one mediating *c-ets-1* induction by bFGF, EGF, and PDGF and the other one mediating *c-ets-1* induction by TNF α and IL-1 α .

The induction of *c-ets-1* expression by bFGF showed two sequential activations, one occurring rapidly after cell stimulation and another more pronounced, occurring a few hours later. It is worth noting that, in time-course experiments with TNF α , we also observed a decrease in *c-ets-1* expression at times 6–8 h (Fig. 2 and data not shown), suggesting a biphasic response for TNF α . As reported for *c-jun* mRNA expression in WI-38 human fibroblasts [49], these phenomena might involve distinct mechanisms. Whereas the first peak of *c-jun* agreed with the rapid response to mitogenic signals [50], the second peak was shown to correspond to the progression of the cells through late G1 and into S phase [49]. A similar mechanism may account for the

second peak in *c-ets-1* expression after stimulation by bFGF. The involvement of Ets-1 in cell cycle progression awaits further clarification, including the determination of *c-ets-1* expression during the different phases of the cell cycle in fibroblasts. However, because the cells were subconfluent, proliferating at the time of the experiments and not supposed to be synchronized, it is possible that other mechanisms might contribute to the induction of the second peak of *c-ets-1* expression, including the transcriptional activation by newly synthesized transcription factors such as Ets-1 itself by an autoregulatory loop [44]. Whatever the mechanisms, the differential expression of *c-ets-1* mRNA that we obtained in time-course experiments allows to distinguish between the effects of TNF α and bFGF on *c-ets-1* expression, with TNF α being more potent than bFGF at early times of induction.

We identified *c-ets-1* as an early response gene for TNF α . The effects of DRB and CHX indicate that early activation of *c-ets-1* by TNF α occurs at the transcriptional level and is independent of new protein synthesis. In addition, we observed an inductive effect of cycloheximide by itself and an increased stimulatory effect in the presence of TNF α . This phenomenon termed superinduction has been previously described for TNF α stimulation of *c-fos* and *c-myc* mRNA levels [47] or for EGF stimulation of *c-fos* and *c-jun* mRNA levels in fibroblasts [51]. Although different mechanisms may explain *c-ets-1* superinduction, our data suggest that it could be due to the removal of labile repressors by cycloheximide, since the inhibition of transcription with DRB prevented this superinduction. In agreement with this hypothesis, negative regulatory elements have been recently described in the human *c-ets-1* promoter [52]. Furthermore, the stabilization of *c-ets-1* transcripts by CHX suggests that *c-ets-1* mRNA degradation is enhanced by labile and constitutively produced proteins when protein synthesis is active. We also showed that whether or not fibroblasts were stimulated with TNF α , the half-life of *c-ets-1* transcripts was of a few hours. Thus, the level of *c-ets-1* transcripts is down-regulated by a degradation process. The increase in *c-ets-1* mRNA level by TNF α should mainly be due to the activation of the *c-ets-1* promoter followed by new transcription. Moreover, in the experiments described we showed a good correlation between the levels of *c-ets-1* mRNA and proteins. Therefore, we suggest that the transcriptional activation might be the main regulatory step that controls the presence of Ets-1 transcription factors in fibroblasts. We have documented here several important features in the control of *c-ets-1* gene expression in fibroblasts, such as low latency of expression after stimulation, possible constitutive down-regulation at the promoter level, transcriptional activation independent of new protein synthesis, and short-lived transcripts. According to these criteria, the

proto-oncogene *c-ets-1* appears to behave as an early TNF α -responsive gene in human fibroblasts, extending the list of transcription factors rapidly stimulated by this cytokine in fibroblasts, which includes *c-jun* [50], *c-fos* [47, 50, 53], and *c-myc* [47].

Our data rise the question of the biological role of *c-ets-1* in human fibroblasts. All the factors assayed can induce the proliferation of fibroblasts with different potency [54–57]. Although it is unclear whether these factors can induce cell proliferation through similar mechanisms, it is possible that *c-ets-1* is not involved in mediating mitogenic effects, because the induction of *c-ets-1* was not clearly correlated with their ability to induce cell proliferation. This is particularly exemplified by the low effect of PDGF on *c-ets-1* expression, a potent mitogen for human fibroblasts [58]. Thus, the functions triggered by Ets-1 proteins might be associated with other biological activities, in particular those shared by TNF α and IL-1 α [59], the two more potent activators of *c-ets-1* expression. Accumulating evidence indicate that Ets-1 transcription factors might be involved in the transcriptional regulation of protease genes, including collagenase-1, stromelysin-1, and urokinase-type plasminogen activator genes [60–62]. These proteases belong to a complex enzymatic cascade that degrades the extracellular matrix components. Activation of this cascade is thought to be an essential step in the process leading to cell migration and invasion, a process which involves the interactions between tumor cells and their surrounding stroma [63, 64]. Control of proteases gene expression by cytokines and growth factors is becoming increasingly documented [65–68]. We have reported a correlation between the ability of TNF α and bFGF to induce collagenase-1, stromelysin-1 expression, and *c-ets-1* expression [19]. It will be of interest to explore further whether *c-ets-1* can act as a mediator of these extracellular factors on proteases gene expression.

We are very grateful to Dr. Thomas Jones for providing human foreskin fibroblasts (Lederle laboratories, Pearl River, NY) and Chantal Vercamer and Dr. Jean-Pierre Kerckaert for technical advice. We thank Drs. Ji H. Chen, Christine Dozier, and Pr. Benoni Boilly for helpful comments and critical reading of the manuscript. We thank Daniel Lazarecki for his excellent photographic assistance. This work was supported by grants from CNRS, ARC, GEFLUC, and Institut Pasteur de Lille. F.G. is a recipient of a fellowship from the Ministère de la Recherche et de la Technologie.

REFERENCES

- Leprince, D., Gegonne, A., Coll, J., De Taisne, C., Schneeberger, A., Lagrou, C., and Stehelin, D. (1983) *Nature* **306**, 395–397.
- Nunn, M. F., Seeburg, P. H., Moscovici, C., and Duesberg, P. H. (1983) *Nature* **306**, 391–395.
- Karim, F. D., Urness, L. D., Thummel, C. S., Klemsz, M. J., McKercher, S. R., Celada, A., Van, B. C., Maki, R. A., Gunther, C. V., Nye, J. A., et al. (1990) *Genes Dev.* **4**, 1451–1453.
- Woods, D. B., Ghysdael, J., and Owen, M. J. (1992) *Nucleic Acids Res.* **20**, 699–704.
- Seth, A., Ascione, R., Fisher, R. J., Mavrothalassitis, G. J., Bhat, N. K., and Papas, T. S. (1992) *Cell Growth Differ.* **3**, 327–334.
- Wasylyk, B., Hahn, S. L., and Giovane, A. (1993) *Eur. J. Biochem.* **277**, 7–18.
- Janknecht, R., and Nordheim, A. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* **1155**, 346–356.
- Crepeux, P., Coll, J., and Stehelin, D. (1994) *Crit. Rev. Oncogenesis*, **5**, 615–638.
- Chen, J. H. (1985) *Mol. Cell. Biol.* **5**, 2993–3000.
- Bhat, N. K., Fisher, R. J., Fujiwara, S., Ascione, R., and Papas, T. S. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 3161–3165.
- Bhat, N. K., Komschlies, K. L., Fujiwara, S., Fisher, R. J., Mathieson, B. J., Gregorio, T. A., Young, H. A., Kasik, J. W., Ozato, K., and Papas, T. S. (1989) *J. Immunol.* **142**, 672–678.
- Bhat, N. K., Thompson, C. B., Lindsten, T., June, C. H., Fujiwara, S., Koizumi, S., Fisher, R. J., and Papas, T. S. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 3723–3727.
- Kaufmann, Y., Silverman, T., Levi, B. Z., and Ozato, K. (1987) *J. Exp. Med.* **166**, 810–815.
- Wernert, N., Raes, M. B., Lassalle, P., Dehouck, M. P., Gosselin, B., Vandebunder, B., and Stéhelin, D. (1992) *Am. J. Pathol.* **140**, 119–127.
- Vandebunder, B., Pardanaud, L., Jaffredo, T., Mirabel, M. A., and Stehelin, D. (1989) *Development* **107**, 265–274.
- Queva, C., Leprince, D., Stéhelin, D., and Vandebunder, B. (1993) *Oncogene* **8**, 2511–2520.
- Maroulakou, I. G., Papas, T. S., and Green, J. E. (1994) *Oncogene* **9**, 1551–1565.
- Kola, I., Brookes, S., Green, A. R., Garber, R., Tymms, M., Papas, T. S., and Seth, A. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 7588–7592.
- Wernert, N., Gilles, F., Fafeur, V., Bouali, F., Raes, M. B., Pyke, C., Dupressoir, T., Seitz, G., Vandebunder, B., and Stéhelin, D. (1994) *Cancer Res.* **54**, 5683–5688.
- Beissert, S., Bergholz, M., Waase, I., Lepsien, G., Schauer, A., Pfizenmaier, K., and Krönke, M. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 5064–5068.
- Naylor, M. S., Stamp, G. W. H., and Balkwill, F. R. (1990) *Cancer Res.* **50**, 4436–4440.
- Takeyama, H., Wakamya, N., O'Hara, C., Arthur, K., Niloff, J., Kufe, D., Sakurai, K., and Spriggs, D. (1991) *Cancer Res.* **51**, 4476–4480.
- Naylor, M. S., Stamp, G. W. H., Foulkes, W. D., Eccles, D., and Balkwill, F. R. (1993) *J. Clin. Invest.* **91**, 2194–2206.
- Miles, D. W., Happerfield, L. C., Naylor, M. S., Bobrow, L. G., Rubens, R. D., and Balkwill, F. R. (1994) *Int. J. Cancer* **56**, 777–782.
- Derynck, R. D., Goeddel, D. V., Ullrich, A., Gutterman, J. U., Williams, R. D., Bringman, T. S., and Berger, W. H. (1987) *Cancer Res.* **47**, 707–712.
- Morrisson, R. S., Gross, J. L., Herblin, W. F., Reilly, T. M., Lascala, P. A., Alterman, R. L., Moskal, J. R., Kornblith, P. L., and Dexter, D. L. (1990) *Cancer Res.* **50**, 2524–2529.
- Kock, A., Schwartz, T., Urbanski, A., Peng, Z., Vetterlein, M., Micksche, M., Ansel, J. C., Kung, H. F., and Luger, T. A. (1989) *J. Natl. Cancer Inst.* **81**, 36–42.
- Bennicelli, J. L., Elias, J., Kern, J., and Guerry IV, D. (1989) *Cancer Res.* **49**, 930–935.
- Sporn, M. B., and Roberts, A. B. (1986) *J. Clin. Invest.* **78**, 329–332.

30. Balkwill, F. R. (1994) *Eur. Cytokine Netw.* **5**, 379–385.
31. Monté, D., Groux, H., Raharinivo, B., Plouvier, B., Dewulf, J., Clavel, T., Grangette, C., Torpier, G., Auriault, C., Capron, A., and Ameisen, J. C. (1992) *Blood* **79**, 2670–2679.
32. Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., Mac Donald, R. J., and Rutter, W. J. (1979) *Biochemistry* **18**, 5294–5299.
33. Ghysdael, J., Gegonne, A., Pognonec, P., Dernis, D., Leprince, D., and Stehelin, D. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 1714–1718.
34. Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680–685.
35. Reddy, E. S., and Rao, V. N. (1988) *Oncogene Res.* **3**, 239–246.
36. Fisher, R. J., Fivash, M., Casas-Finet, J., Erickson, J. W., Kondoh, A., Bladen, S. V., Fisher, C., Watson, D. K., and Papas, T. S. (1994) *Protein Sci.* **3**, 257–266.
37. Collyn-d'Hooghe, M., Galiegue, S., Szymiczek, D., Lantoine, D., Quief, S., Loucheux-Lefebvre, M.-H., and Kerkaert, J.-P. (1993) *Leukemia* **7**, 1777–1785.
38. Koizumi, S., Fisher, R. J., Fujiwara, S., Jorcyk, C., Bhat, N. K., Seth, A., and Papas, T. S. (1990) *Oncogene* **5**, 675–681.
39. Jorcyk, C. L., Watson, D. K., Mavrothalassitis, G. J., and Papas, T. S. (1991) *Oncogene* **6**, 523–532.
40. Ullrich, A., Coussens, L., Hayflick, J. S., Dull, T. J., Gray, A., Tam, A. W., Lee, J., Yarden, Y., Liberman, T. A., Schlessinger, J., Downward, J., Mayes, E. L. V., Whittle, N., Waterfield, M. D., and Seeburg, P. H. (1984) *Nature* **309**, 418–425.
41. Lin, H. Y., Wang, X. F., Ng-Eaton, E., Weinberg, R. A., and Lodish, H. F. (1992) *Cell* **68**, 775–785.
42. Smith, C. A., Davis, T., Anderson, D., Solam, L., Beckmann, M. P., Jerzy, R., Dower, S. K., Cosman, D., and Goodwin, R. G. (1990) *Science* **248**, 1019–1023.
43. Sims, J. M., March, C. J., Cosman, D., Widmer, M. B., MacDonald, H. R., MacMahan, C., Grubin, C. E., Wignall, J. M., Jackson, J. L., Call, S. M., Friend, D., Alpert, A. L., Gillis, S., Urdal, D. L., and Dower, S. K. (1988) *Science* **241**, 585–589.
44. Majerus, M. A., Bibollet-Ruche, F., Telliez, J. B., Wasylyk, B., and Bailleul, B. (1992) *Nucleic Acids Res.* **20**, 2699–2703.
45. Beutler, B., Greenwald, D., Hulmes, J. D., Chang, M., Pan, Y. C. E., Mathison, J., Ulevitch, R., and Cerami, A. (1985) *Nature* **316**, 552–554.
46. Borchers, A. H., Powell, M. B., Fusenig, N. E., and Bowden, G. T. (1994) *Exp. Cell. Res.* **213**, 143–147.
47. Lin, J. X., and Vilcek, J. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 11908–11911.
48. Kolesnick, R., and Golde, D. W. (1994) *Cell* **77**, 325–328.
49. Carter, R., Cosenza, S. C., Pena, A., Lipson, K., Soprano, D. R., and Soprano, K. J. (1991) *Oncogene* **6**, 229–235.
50. Brenner, D. A., O'Hara, M., Angel, P., Chojkier, M., and Karin, M. L. (1989) *Nature* **337**, 661–663.
51. Edwards, D. R., and Mahadevan, L. C. (1992) *EMBO J.* **11**, 2415–2424.
52. Chen, J. H., and Wright, C. (1993) *Oncogene* **8**, 3375–3383.
53. Schutze, S., Nottrott, S., Pfizenmaier, K., and Kronke, M. (1990) *J. Immunol.* **144**, 2604–2608.
54. Gospodarowicz, D., Ferrara, N., Schweigerer, L., and Neufeld, G. (1987) *Endocr. Rev.* **8**, 95–114.
55. Vilcek, J., Palombella, V. J., Henryksen-DeStephano, D., Swenson, C., Feinman, R., Hirai, M., and Tsujimoto, M. (1986) *J. Exp. Med.* **163**, 632–643.
56. Schmidt, J. A., Mizel, S. B., Cohen, D., and Green, I. (1982) *J. Immunol.* **128**, 2177–2182.
57. Massagué, J. (1990) *Annu. Rev. Cell. Biol.* **6**, 597–641.
58. Bowen-Pope, D. F., Seifert, R. A., and Ross, R. (Eds.) (1985) *The Platelet Derived Growth Factor Receptor*, Academic Press, New York.
59. Le, J., and Vilcek, J. (1987) *Lab. Invest.* **56**, 234–248.
60. Buttice, G., and Kurkinen, M. (1994) in *Contributions to Nephrology* (Berlyne, G. M., Ed.), Vol. 107, pp. 101–107, Karger, Basel.
61. Wasylyk, C., Gutman, A., Nicholson, R., and Wasylyk, B. (1991) *EMBO J.* **10**, 1127–1134.
62. Stacey, K. J., Fowles, L. F., Colman, M. S., Ostrowski, M. C., and Hume, D. A. (1995) *Mol. Cell. Biol.* **15**, 3430–3441.
63. Liotta, L. A. (1986) *Cancer Res.* **46**, 1–7.
64. Liotta, L. A., Steeg, P. S., and Stetler, S. W. G. (1991) *Cell* **64**, 327–336.
65. Circolo, A., Welgus, H. G., Pierce, G. F., Kramer, J., and Strunk, R. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 12283–12288.
66. Richards, C. D., Rafferty, J. A., Reynolds, J. J., and Saklatvala, J. (1991) *Matrix* **11**, 161–167.
67. Mackay, A. R., Ballin, M., Pelina, M. D., Farina, A. R., Nason, A. M., Hartzler, J. L., and Thorgeirsson, U. (1992) *Invasion Metastasis* **12**, 168–184.
68. Mauviel, A. (1993) *J. Cell. Biochem.* **53**, 288–295.

Received July 24, 1995

Revised version received October 27, 1995

B - RESULTATS COMPLEMENTAIRES

1 - Les transcrits alternatifs du gène *c-ets1*

La technique du Northern blot ne permet pas de distinguer quels types de transcrits *c-ets1* sont exprimés dans les fibroblastes naturellement ou sous une stimulation par les cytokines fibrogéniques. L'expression d'isoformes synthétisées à partir des transcrits alternatifs du gène *c-ets1* peut modifier l'activité du facteur de transcription Ets1 dans les fibroblastes. Pour distinguer les transcrits alternatifs de pleine longueur (T) de ceux dépourvus de l'exon IV (Δ IV), de l'exon VII (Δ VII), ou des deux exons IV et VII (Δ IV-VII), nous avons recouru à la technique de la polymérase chain reaction (PCR) appliquée aux ARNs, ou RT-PCR (voir annexe).

Des oligonucléotides situés de part et d'autre des exons IV et VII, respectivement A5 dans l'exon III et E7 dans l'exon VIII (voir Annexe), ont été utilisés pour amplifier simultanément les ARNs *c-ets1* rétrotranscrits à l'aide d'oligonucléotides de séquence aléatoire. Les conditions précises de la PCR ont été déterminées pour demeurer dans la phase exponentielle de l'amplification afin d'obtenir une estimation semi-quantitative des rapports entre les différents transcrits.

Un traitement des fibroblastes pendant 4 heures par 10 ng/ml de PMA, 5 ng/ml de TGF β , 10 ng/ml de TNF α , 10 ng/ml de bFGF ou 10 ng/ml de PDGF ne modifie pas les proportions des quatre types de transcrits alternatifs : le transcrit de pleine longueur est très largement majoritaire (plus de 90%), alors que le transcrit sans exon VII est minoritaire et que les transcrits sans exon IV ou sans exons IV et VII sont rares (Figure 8A). De la même façon, au cours d'une cinétique d'induction de *c-ets1* par le TNF α , les transcrits de pleine longueur restent prédominants (Figure 8B).

La proportion relative des transcrits alternatifs *c-ets1* est préservée quelque soit le traitement appliqué aux fibroblastes. Les variations observées dans des lignées de cellules hématopoïétiques ou dans des cellules lymphoïdes isolées de patients cancéreux doivent par conséquent dépendre du type cellulaire ou de l'individu (Collyn-d'Hooghe et al., 1993).

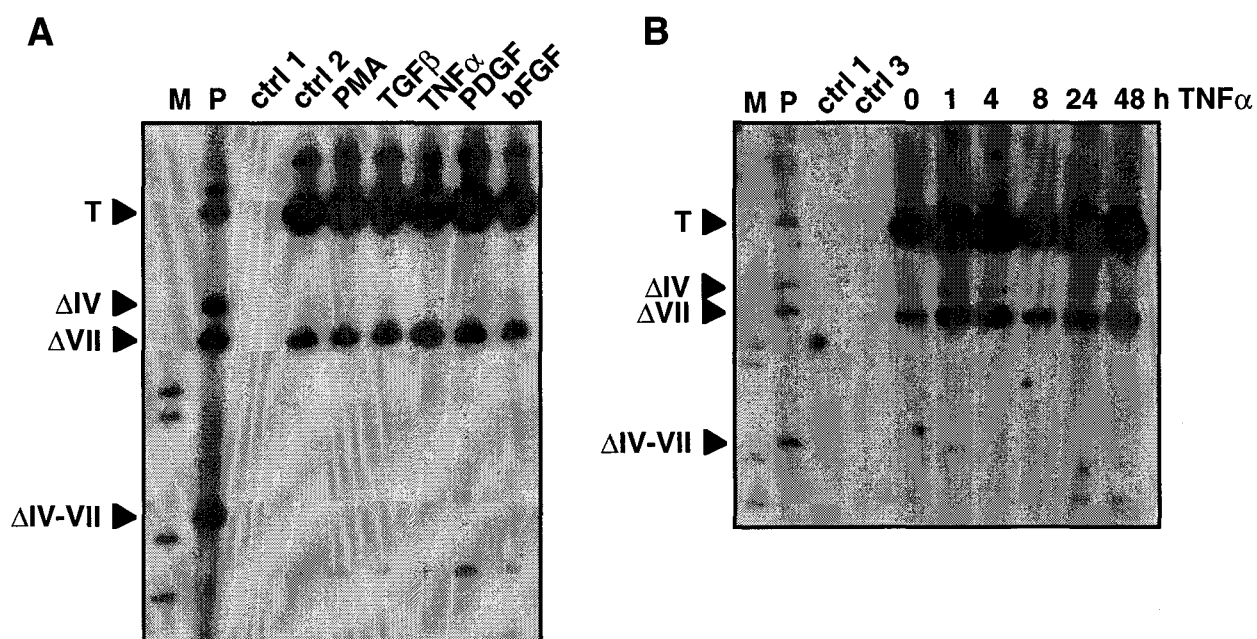


Figure 8 : Détection des transcrits alternatifs de *c-ets1* par RT-PCR. (A) Les fibroblastes sont traités pendant 19 h avec 10 ng/ml de PMA, 5 ng/ml de TGFβ, 10 ng/ml de TNFα, 10 ng/ml de PDGF ou 10 ng/ml de bFGF. (B) Les fibroblastes sont traités pendant 0 à 48 h par 10 ng/ml de TNFα. (A et B) Les ARNs totaux sont extraits et sont analysés par RT-PCR pour détecter les transcrits alternatifs du gène *c-ets1* : T, ARNs de pleine longueur ; ΔIV, ARNs sans exon IV ; ΔVII, ARNs sans exon VII ; ΔIV-VII, ARNs sans exons IV et VII. M, marqueur de poids moléculaire. Contrôles : P, ARNs de lymphocytes du patient leucémique 985 (Collin d'Hooghe, 1993) ; ctrl 1, RT-PCR sans ARN ; ctrl 2, ARNs de cellules non traitées ; ctrl 3, PCR sans transcription reverse.

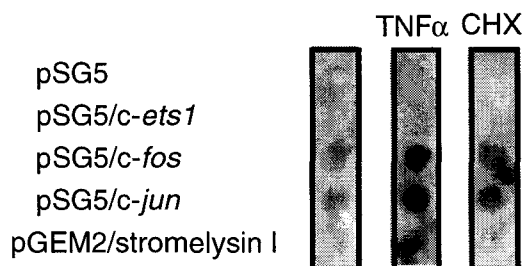
2 - Activation transcriptionnelle de *c-ets1* par le TNF α

Nous avons précédemment montré qu'un prétraitement des fibroblastes avec des inhibiteurs transcriptionnels (DRB, actinomycine D) empêche l'induction de l'expression du gène *c-ets1* par le TNF α . Ceci suggère que le TNF α induit une augmentation des transcrits *c-ets1* par une activation transcriptionnelle. L'une des façons de confirmer cette hypothèse était de mesurer l'activité du promoteur de *c-ets1* et de mutants de délétion par transfection transitoire. Différentes constructions du promoteur de *c-ets1* en amont du gène reporteur pour l'activité luciférase ont été testées pour leur réponse au TNF α dans cultures primaires de fibroblastes. Cependant, devant la résistance des cellules à différentes techniques de transfection, nous avons dû envisager d'autres méthodes plus sensibles : le Run On et la RT-PCR.

a) - *Run On*

Les fibroblastes ont été traités pendant 2 heures par le TNF α (10 ng/ml) ou la cycloheximide (10 μ M). Après isolement des noyaux et terminaison de la transcription *in vitro* avec incorporation de précurseurs ribonucléotidiques radioactifs, les ARNs néo-synthétisés marqués ont été extraits et hybridés avec les ADN dénaturés de vecteur vide (pSG5), ou de vecteurs portant des fragments d'ADN complémentaires *c-ets1*, *c-jun*, *c-fos* ou stromélysine I (voir l'annexe). L'analyse quantitative des ARNs néosynthétisés montre que l'induction de la transcription du gène *c-ets1* par le TNF α est très faible, les ARNs *c-ets1* néosynthétisés se distinguant difficilement du bruit de fond (Figure 9). Cependant, les niveaux d'induction de l'expression des gènes *c-fos*, *c-jun* et stromélysine I par le TNF α , qui atteignent un facteur 2 à 3, sont parfaitement détectables. Le niveau d'expression extrêmement bas du gène *c-ets1* et son faible niveau d'induction par le TNF α ne nous ont pas permis de montrer par la technique du *Run on* que *c-ets1* est effectivement activé par le TNF α au niveau transcriptionnel.

A



B

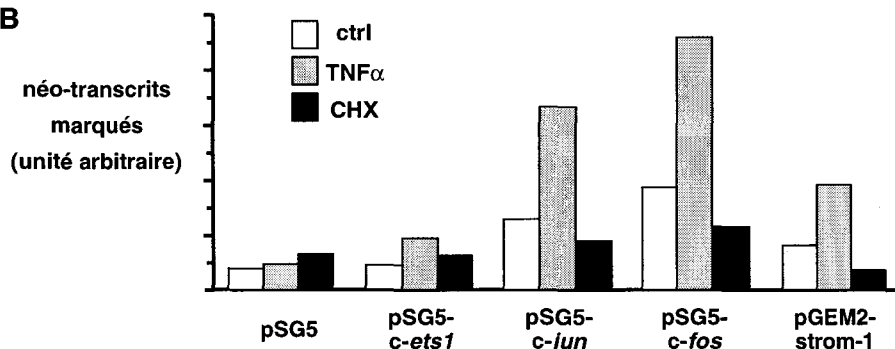


Figure 9 : Mesure de l'activité transcriptionnelle du gène *c-ets1* par la technique du Run On. Les fibroblastes sont traités pendant 2 heures par du milieu seul (ctrl), 10 ng/ml de TNF α ou 10 μ g/ml de cycloheximide (CHX). La transcription est poursuivie *in vitro* avec incorporation de précurseurs radioactifs par la technique du Run-On appliquée aux noyaux isolés. Les ARNs néo-synthétisés marqués sont extraits et hybridés avec des plasmides dénaturés fixés sur des filtres de nitrocellulose : plasmide de type sauvage (pSG5) ou plasmides contenant les ADNc *c-ets1* (pSG5-*c-ets1*), *c-jun* (pSG5-*c-jun*), *c-fos* (pSG5-*c-fos*) ou stromélysine-1 (pGEM2-strom-1). (A) Autoradiographie. (B) Quantification correspondante obtenue à l'aide d'un PhosphorImager.

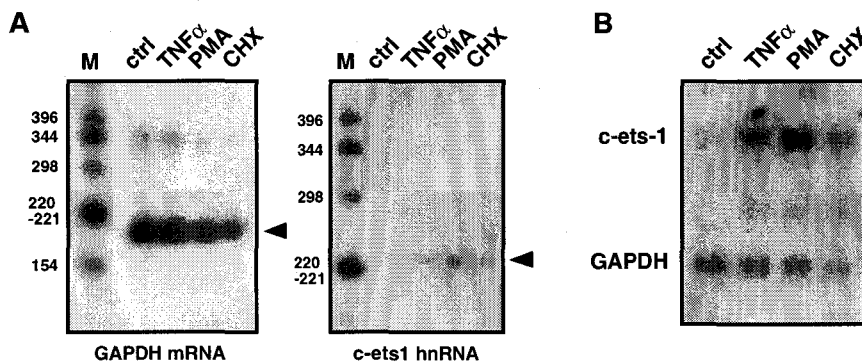


Figure 10 : Mise en évidence des néo-transcrits de *c-ets1* par RT-PCR. Les fibroblastes sont traités pendant 4 heures par du milieu seul (ctrl), 10 ng/ml de TNF α , 10 ng/ml de PMA ou 10 μ g/ml de cycloheximide (CHX). A la fin du traitement, les ARNs totaux sont extraits et sont analysés en parallèle par RT-PCR et par Northern blot. (A) Amplification des transcrits sous-génomiques de *c-ets1* (hnRNA) par RT-PCR : les ARNs totaux sont rétrotranscrits à l'aide d'oligonucléotides hexamériques de séquence aléatoire, et les ADNc pour *c-ets1* et pour la GAPDH sont amplifiés dans des tubes distincts. L'amplification spécifique des transcrits *c-ets1* néo-synthétisés (hnRNA, ARNs hétérogènes nucléaires) est réalisée avec les oligonucléotides "BR" (jonction intron VI-exon VII) et "Z" (exon VII) qui génèrent des fragments de 238 pb. Comme contrôle de la réaction, les ADNc pour la GAPDH sont amplifiés spécifiquement avec les oligonucléotides "G5" et "G3" qui génèrent des fragments de 206 pb. M : marqueur de poids moléculaire. (B) En parallèle, les mêmes échantillons d'ARNs sont analysés par Northern blot en utilisant des sondes d'ADNc spécifiques pour *c-ets1* et pour la GAPDH.

b) - RT-PCR intronique

Nous avons donc eu recours à une autre technique beaucoup plus sensible, basée sur la PCR. La transcription génère des ARNs sous-génomiques qui sont très rapidement modifiés par l'addition d'une coiffe en 5', d'une queue de poly-A en 3', et par l'épissage des introns. Le taux d'ARNs sous-génomiques reflète donc directement l'activité transcriptionnelle d'un gène. Pour détecter les ARNs sous-génomiques issus de la transcription du gène *c-ets1*, les ARNs extraits ont été rétrotranscrits *in vitro* à partir d'oligonucléotides de séquence aléatoire, et les ADNc obtenus ont été amplifiés par PCR avec des couples d'oligonucléotides spécifiques pour *c-ets1* ou pour la GAPDH (comme contrôle) (oligonucléotides BR et Z ou G5 et G3, voir Annexe). Pour n'amplifier que les ARNs sous-génomiques du gène *c-ets1*, l'un des oligonucléotides utilisés a été choisi pour recouvrir une jonction intron-exon. Les conditions de la réaction ont été mises au point afin de rester dans la phase exponentielle de l'amplification (0,1 µg d'ARN total rétrotranscrit par point et 25 cycles d'amplification) et permettre une estimation semi-quantitative. De plus, l'utilisation d'un précurseur radioactif [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP) incorporé dans les produits d'amplification a permis de descendre le seuil de sensibilité de la technique.

Un traitement par le TNF α (10 ng/ml), le PMA (10 ng/ml) ou la cycloheximide (10 µg/ml) pendant 4 h augmente faiblement mais distinctement le taux d'ARNs sous-génomiques pour *c-ets1* (hnRNA, Figure 10A). Comme contrôle, l'amplification d'ARNs messagers pour la GAPDH révèle une expression élevée et identique dans les cellules traitées et non traitées. Par ailleurs, ces mêmes ARNs totaux ont été analysés par la technique de Northern blot qui confirme que le taux d'ARNs messagers *c-ets1* est bien augmenté par le TNF α , le PMA et la cycloheximide, alors que le taux d'ARNs messagers GAPDH est constant (Figure 10B). L'augmentation des ARNs sous-génomiques *c-ets1* indique que la transcription de ce gène est augmentée par le TNF α , le PMA et la cycloheximide.

3 - La stabilité des transcrits du gène *c-ets1*

L'étude de la stabilité des ARNs messagers *c-ets1* (mentionnée dans l'article 2) a été réalisée en bloquant la transcription par le DRB (5,6-Dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazole) après une stimulation des fibroblastes pendant 4 h par le TNF α (10 ng/ml) ou la cycloheximide (10 μ g/ml) par rapport à des cellules non traitées. La décroissance du taux d'ARNs *c-ets1* observée après traitement par le TNF α est semblable à celle observée pour les ARNs de cellules non stimulées (Figure 11). Par contre, dans les cellules traitées par la cycloheximide, la quantité d'ARNs *c-ets1* reste constante pendant au moins 6 h malgré l'inhibition de la transcription par le DRB. Ceci montre que la stabilité des ARNs *c-ets1* est la même dans les fibroblastes traités ou non par le TNF α , alors qu'elle est augmentée dans les cellules traitées par la cycloheximide. Le TNF α ne stabilise donc pas les ARNs *c-ets1*, à l'inverse de la cycloheximide. La quantification du taux d'expression de *c-ets1* par le PhosphorImager permet d'estimer la stabilité des ARNs *c-ets1* à environ 1 à 2 heures dans les fibroblastes non traités ou traités par le TNF α .

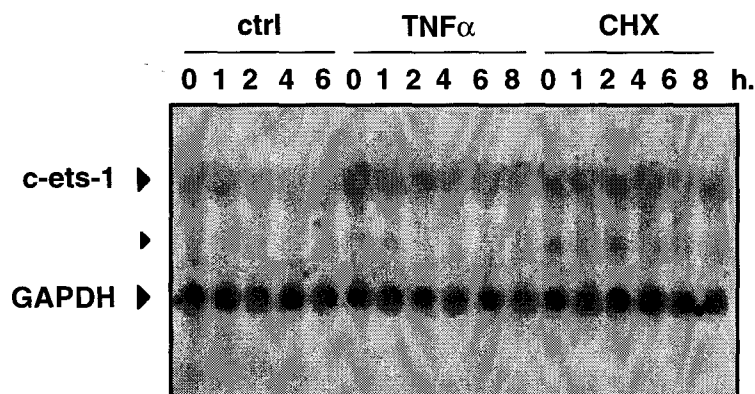


Figure 11 : La cycloheximide, mais pas le TNF α , stabilise les transcrits *c-ets1*. Les fibroblastes sont traités pendant 4 h par du milieu seul (ctrl) ou contenant 10 ng/ml de TNF α ou 10 μ g/ml de cycloheximide (CHX). La transcription est alors bloquée par l'addition de 25 μ g/ml de 5,6-dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazole (DRB) pendant 0 à 8 h. Les ARNs totaux sont ensuite extraits et l'expression des transcrits *c-ets1* et de la GAPDH est mesurée par Northern blot.

III - CONCLUSION

L'expression de *c-ets1* dans les cultures primaires de fibroblastes humains normaux peut être induite par des facteurs solubles sécrétés par des lignées de cellules tumorales. Parmi les différents facteurs susceptibles à la fois d'être produits dans des tumeurs et de réguler les activités des fibroblastes (cytokines fibrogéniques), certains se sont avérés capables d'induire l'expression du gène *c-ets1*. Les facteurs testés peuvent être regroupés en trois classes : (1) les cytokines pro-inflammatoires $\text{TNF}\alpha$ et $\text{IL-1}\alpha$ qui induisent rapidement une expression élevée de *c-ets1* ; (2) les facteurs de croissance PDGF, bFGF et EGF qui induisent tardivement l'expression de *c-ets1* mais qui potentialisent l'effet précoce du $\text{TNF}\alpha$; (3) le $\text{TGF}\beta$ qui n'induit pas d'expression de *c-ets1* et ne module pas l'effet du $\text{TNF}\alpha$ sur l'induction de *c-ets1*. La capacité de ces facteurs à induire une expression rapide et élevée de *c-ets1* ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\alpha \gg \gg$ bFGF, EGF, PDGF) est à rapprocher des types de réponses qu'ils sont susceptibles d'induire dans les fibroblastes (Tableau 4). Ainsi, l'expression de *c-ets1* est corrélée avec la capacité des fibroblastes à induire une dégradation de la matrice extracellulaire plutôt qu'à proliférer.

Nous avons également fourni quelques éléments sur la nature et la régulation des transcrits *c-ets1*. Quelles que soient les cytokines testées, l'augmentation des transcrits *c-ets1* est systématiquement assortie d'une augmentation des protéines Ets1. Dans les fibroblastes, il ne semble donc pas y avoir de contrôle post transcriptionnel de l'expression de *c-ets1*. De plus, l'analyse des mécanismes conduisant à l'accumulation des transcrits *c-ets1* en réponse au $\text{TNF}\alpha$ montre qu'il s'agit d'une activation de la transcription plutôt que d'une stabilisation des transcrits, et qui ne nécessite pas de néo-synthèse protéique. Bien que les transcrits alternatifs de *c-ets1* aient pu être détectés dans les fibroblastes, les transcrits de pleine longueur sont toujours largement majoritaires et il n'y a pas de variation du rapport entre les différents types d'ARNs quelque soient les traitements. De plus, contrairement à ce qui a été publié dans des cellules épithéliales ou des cellules T (Bhat et al., 1987; Bhat et al., 1990), dans les fibroblastes nous montrons que *c-ets1* peut être superinduit par la cycloheximide comme le sont également d'autres oncogènes (*c-ets2*, *c-fos*, *c-jun*, etc.). Dans ces cellules, la cycloheximide a au moins deux effets, une activation transcriptionnelle et une stabilisation des ARNs *c-ets1*, dont les mécanismes restent à démontrer.

TROISIEME PARTIE

**SIGNALISATION INTRACELLULAIRE DU TNF α
REGULANT L'EXPRESSION DE *c-ets1*
DANS LES FIBROBLASTES**

TROISIEME PARTIE

SIGNALISATION INTRACELLULAIRE DU TNF α REGULANT L'EXPRESSION DE *c-ets1* DANS LES FIBROBLASTES

I - INTRODUCTION

En recherchant des régulateurs extracellulaires de l'expression du proto-oncogène *c-ets1* dans les cultures primaires de fibroblastes humains, nous avons montré que le TNF α active rapidement la transcription du proto-oncogène *c-ets-1* sans qu'une néo-synthèse protéique ne soit nécessaire. Ceci suggère que l'action du TNF α est médiée par l'activation et le recrutement de facteurs de transcription préexistants sous une forme latente et inactive dans les fibroblastes. Les principaux mécanismes qui régulent au niveau post traductionnel l'activité des facteurs de transcription sont basés sur la modification de leur état de phosphorylation qui affecte leur conformation moléculaire et/ou leur localisation subcellulaire (pour revue voir Hunter and Karin, 1992; Hunter, 1995; Karin and Hunter, 1995). Les phosphorylations et déphosphorylations sont des réactions enzymatiques compatibles avec la rapidité et la spécificité des événements qui contrôlent l'activité des facteurs de transcription dans le noyau. Les phosphorylations sont assurées par des protéine kinases (PK), et les déphosphorylations par des protéine phosphatases (PP). Chacune de ces deux classes d'enzymes peut être subdivisée selon que la réaction se produit sur des résidus tyrosine (Tyr-PK, Tyr-PP), ou sur des résidus sérine ou thréonine (Ser/Thr PK, Ser/Thr PP). L'activation ou l'inhibition des protéine kinases et phosphatases sont les étapes déterminantes dans les voies de transduction intracellulaires qui relient les récepteurs de surface activés par leur ligand spécifique et les facteurs de transcription.

Les réponses intracellulaires au TNF α sont nombreuses et variées ; elles sont médiées par l'activation d'un certain nombre de voies de transduction du signal. Celles-ci ne sont pas entièrement élucidées mais leur exploration s'est développée récemment de façon spectaculaire. Dans cette troisième partie, nous avons cherché à caractériser par une approche pharmacologique,

le cheminement intracellulaire du signal d'activation du gène *c-ets1* induit par le $\text{TNF}\alpha$ dans les fibroblastes.

A - LE TUMOR NECROSIS FACTOR ET LA LYMPHOTOXINE

Le Tumor Necrosis Factor (TNF) fut initialement caractérisé biologiquement d'une part par son activité cytotoxique vis à vis de cellules tumorales, d'autre part par son rôle dans l'induction de la cachexie, une maladie de la malnutrition. Il est ensuite apparu comme médiateur majeur du choc septique induit par des endotoxines bactériennes. Le TNF correspond en fait à deux types de cytokines, le $\text{TNF}\alpha$ (ou TNF) et le $\text{TNF}\beta$ (ou lymphotoxine-alpha, $\text{LT}\alpha$) qui ont en commun une homologie de structure et la capacité de se lier aux mêmes récepteurs à la surface cellulaire (pour revue voir Aggarwal and Natarayan, 1996). Le $\text{TNF}\alpha$ et la $\text{LT}\alpha$ sont les membres représentatifs d'une famille de cytokines apparentées qui comprennent également la lymphotoxine-beta ($\text{LT}\beta$) et les ligands des antigènes de surface Fas, OX40, CD40, CD27, CD30, 4-1BB. La plupart de ces facteurs sont présents sous forme trimérique ou multimérique leur permettant d'induire l'aggrégation et l'activation de leurs récepteurs de surface cellulaire.

Bien que le $\text{TNF}\alpha$ et la $\text{LT}\alpha$ agissent *via* des récepteurs communs, ils diffèrent par leurs sources cellulaires et par les mécanismes qui régulent leur expression et leur production. Le $\text{TNF}\alpha$ peut être produit *in vitro* par une grande variété de cellules normales ou tumorales. Cependant, la principale source de $\text{TNF}\alpha$ *in vivo* sont les cellules phagocytaires mononucléaires (macrophages) activées par des stimuli variés (bactéries Gram-négatives et Gram-positives, champignons, mycoplasmes, levures, cellules tumorales, virus à ADN et à ARN, cytokines, mitogènes, etc.). A l'inverse du $\text{TNF}\alpha$, la production de $\text{LT}\alpha$ est très restreinte et se limite principalement aux lymphocytes.

B - LES RECEPTEURS POUR LE TNF

1 - TNF-R1 et TNF-R2

Le $\text{TNF}\alpha$ et la $\text{LT}\alpha$ reconnaissent spécifiquement deux types de récepteurs de surface cellulaire, TNF-R1, le récepteur au TNF de type I d'une taille apparente de 55 kDa, et TNF-R2, le récepteur au TNF de type II d'une taille apparente de 75 kDa (Loetscher et al., 1990; Schall et al., 1990).

Ces récepteurs lient le TNF α et la LT α avec une même haute affinité, et sont co-exprimés à la surface de la plupart des cellules somatiques, bien qu'en différentes proportions : TNF-R2 est préférentiellement exprimé à la surface des cellules endothéliales et des cellules du système immunitaire, alors que TNF-R1 est exprimé par presque tous les types cellulaires (pour revue voir Warzocha et al., 1994; Aggarwal et Natarajan, 1996).

TNF-R1 et TNF-R2 n'ont aucune homologie de séquence entre eux ni avec d'autres types de récepteurs. Ils sont cependant structurellement apparentés dans leur partie extracellulaire par la présence de pseudo-répétitions de domaines riches en cystéines. Ces domaines contiennent environ 6 résidus cystéine dans une portion de 40 acides aminés, et semblent jouer un rôle dans la conformation tridimensionnelle des récepteurs et dans leur oligomérisation. D'autres types de récepteurs présentent également cette particularité et sont regroupés avec TNF-R1 et TNF-R2 dans la superfamille des récepteurs au TNF. Cette famille comprend TNF-R1, TNF-R2, TNF-RP, Fas/APO-1, CD27, CD30, CD40, OX40, LT β -R, 4-1BB, les produits des poxvirus PV-T2 et PV-A53R, et les récepteurs de basse affinité au NGF (p75^{NGFR}) (Butler et al., 1994; Smith et al., 1994).

2 - Les fonctions cellulaires attribuées à TNF-R1 et à TNF-R2

Des expériences de recombinaison homologue et l'utilisation d'anticorps agonistes ou antagonistes reconnaissant spécifiquement chaque type de récepteurs suggèrent qu'aussi bien TNF-R1 que TNF-R2 transmettent des réponses similaires telles que l'activation du facteur de transcription NF-KB ; la prolifération cellulaire ; l'antiprolifération, la cytotoxicité ou l'apoptose ; l'induction de l'interleukine-6 (pour revue voir Aggarwal et Natarajan, 1996). Cependant, certaines réponses semblent spécifiques de chaque type de récepteur. TNF-R1 seul est notamment impliqué dans l'activation de sphingomyélinases et la production de céramide, la production de diacylglycérol et l'activation de protéine kinase C, l'activation de la phospholipase A₂ et la production de la prostaglandine E₂, ou l'activation du gène *c-fos*. TNF-R2 est plus spécifiquement impliqué dans le développement des cellules T et la prolifération des cellules T cytotoxiques.

Les effets antagonistes du TNF α sur la croissance cellulaire, prolifération ou antiprolifération/cytotoxicité/apoptose, pourraient être liés à la concentration extracellulaire en

TNF α (voir la revue de Rothe et al., 1995). A faible concentration, le TNF α induirait la synthèse d'ADN, la prolifération et la survie des cellules, alors qu'à forte concentration, il induirait un arrêt de la croissance, et l'apoptose.

La plupart des réponses cellulaires au TNF α ne peuvent pas être clairement attribuées à l'activation de TNF-R1 ou de TNF-R2. Les deux récepteurs semblent capables de potentialiser leurs effets réciproques, d'une part au niveau extracellulaire en retenant le TNF α afin de faciliter sa reconnaissance par ses récepteurs, d'autre part au niveau intracellulaire en activant de voies de transduction interdépendantes ou agissant en synergie. Le type de réponse cellulaire induit par le TNF α (notamment la prolifération, l'apoptose ou l'activation de NF- κ B) dépend principalement de la présence des protéines associées aux récepteurs qui sont fonction du type cellulaire ciblé par le TNF α .

3 - Les protéines associées aux récepteurs pour le TNF

Dans leur domaine cytoplasmique, TNF-R1 et TNF-R2 ne possèdent pas de séquences caractéristiques d'activités catalytiques particulières et n'ont aucune homologie de séquence ni entre eux ni avec d'autres récepteurs ou enzymes intervenant dans les signalisations intracellulaires (pour revue, voir Tartaglia and Goeddel, 1992; Smith et al., 1994). La sélection des signaux transmis par TNF-R1 et TNF-R2 se traduit au niveau de la membrane plasmique par le recrutement de différentes protéines qui connectent les récepteurs aux voies de transduction du signal (Figure 12). La plupart des facteurs associés aux récepteurs pour le TNF ont très récemment été isolés et caractérisés. Ces facteurs s'associent à TNF-R1 ou à TNF-R2 par des domaines d'interaction protéine-protéine de type "Death Domain" ou "TRAF".

Le "Death Domain" fut initialement caractérisé comme un domaine de similitude entre les parties intracytoplasmiques de TNF-R1 et de l'antigène Fas/APO-1 (Feinstein et al., 1995), requis pour la transmission de signaux apoptotiques (Tartaglia et al., 1993). Le "Death Domain" de TNF-R1 interagit avec le facteur TRADD (*TNF receptor-associated death domain*) qui s'associe avec les facteurs TRAF2 (*TNF Receptor 2-Associated Factor 2*) ou FADD (*Fas-associated death domain*) (Baker and Reddy, 1996; Hsu et al., 1996). FADD, *alias* MORT1, est une protéine adaptatrice qui recrute auprès de TNF-R1 les protéines RIP (*receptor interaction protein*) (Boldin et al., 1996) et

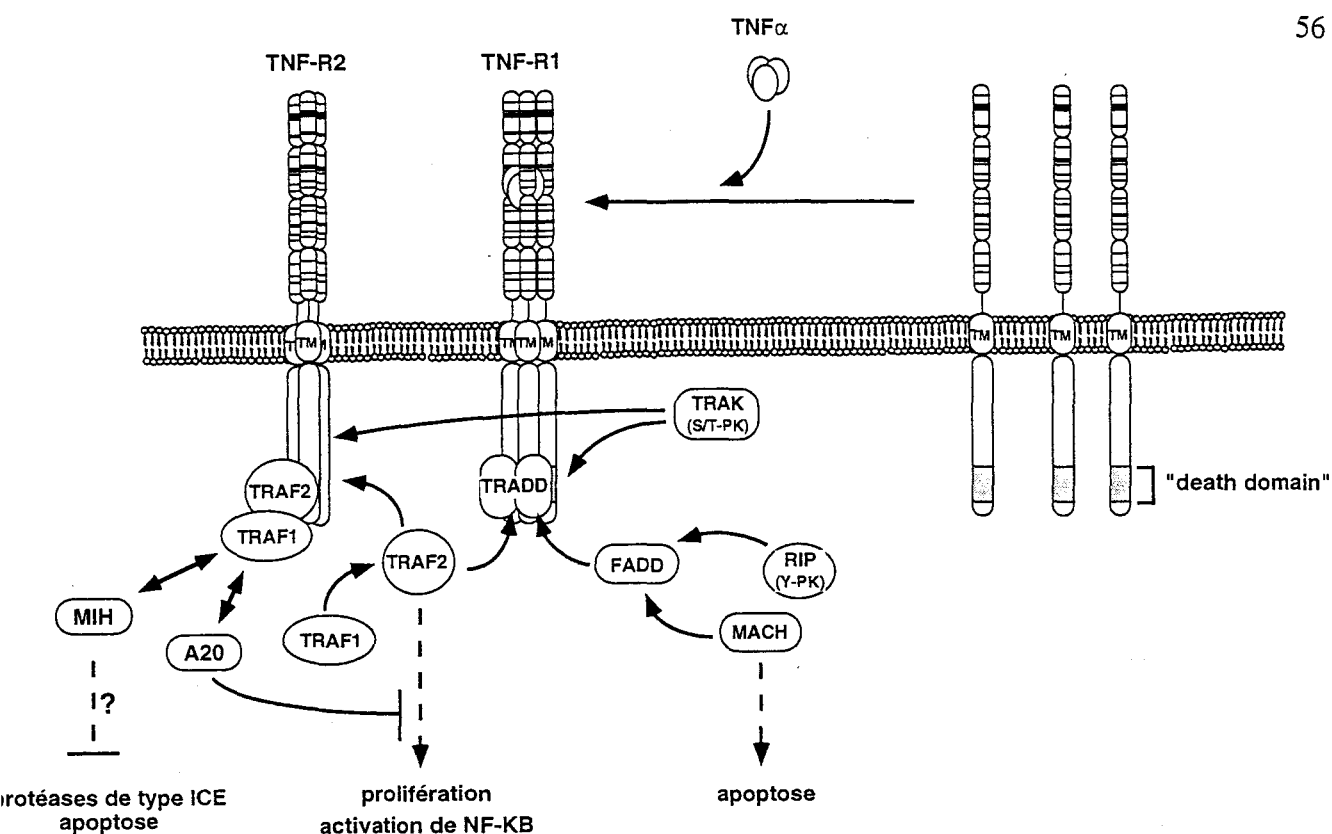


Figure 12 : Les protéines associées aux récepteurs pour le TNF. (voir le paragraphe correspondant).

MACH (*MORT1-associated CED-3 homolog*) (Boldin et al., 1996) qui sont impliquées dans la signalisation de l'apoptose. MACH est une sérine protéase appartenant à la famille ICE/CED-3 dont les membres interviennent de manière universelle dans le clivage protéolytique des protéines intracellulaires au cours de l'apoptose en réponse à des stress variés (pour revue, voir Martin and Green, 1995; Henkart, 1996; Patel et al., 1996). RIP (*receptor interacting protein*) possède un domaine de type tyrosine kinase apparenté à celui de *lck*, une kinase de la famille *src* (Stanger et al., 1995). Par ailleurs, le "death domain" de TNF-R1 peut également recruter deux types de sérine/thréonine protéine kinases, p60 TRAK (*TNF-R-associated kinase*) (Darnay et al., 1994; vanArsdale and Ware, 1994) et p80 TRAK (Darnay et al., 1994). p80 TRAK phosphoryle aussi bien TNF-R1 que TNF-R2. p60 TRAK phosphoryle TNF-R1 ainsi que des protéines de 120, 97 et 85 kDa associées à TNF-R1. L'inhibition de la p60 TRAK par la staurosporine qui sensibilise les cellules U937 à l'action cytotoxique du TNF- α suggère qu'elle pourrait être impliquée dans la résistance cellulaire à l'apoptose (Darnay et al., 1995).

Le domaine cytoplasmique de TNF-R2 ne contient pas de "death domain". Son activation par le TNF α lui permet de se lier directement au facteur TRAF2 (*TNF Receptor 2-Associated Factor 2*) sous forme d'homodimères TRAF2-TRAF2 ou d'hétérodimères TRAF2-TRAF1 (Rothe et al., 1994; Mosialos et al., 1995). TRAF2 est nécessaire à l'activation du facteur de transcription NF-KB par le TNF α . Le fait que TRAF2 intervienne à la fois dans la signalisation de TNF-R1 et dans celle de TNF-R2 explique comment chacun de ces récepteurs peut médier l'activation de NF-KB. Les hétérodimères TRAF1-TRAF2 permettent l'activation de différents facteurs telles que les protéines MIH ou la protéine A20. Les protéines MIH (MIHA, MIHB et MIHC (Uren et al., 1996) ou c-IAP1 et c-IAP2 (Rothe et al., 1995)) sont les homologues chez les mammifères des protéines IAP (*inhibitors of apoptosis proteins*) de Baculovirus qui inhibent l'apoptose médiée par les sérine protéases de la famille ICE. L'activation des protéines MIH par le complexe TRAF1-TRAF2 pourrait de la même manière bloquer la transduction de signaux cytotoxiques et favoriser celle de signaux mitogènes. En effet, TRAF1 et TRAF2 sont impliquées dans la croissance et la transformation de cellules B par le virus d'Epstein-Barr (Mosialos et al., 1995). Par ailleurs, alors que TRAF2 médie l'activation de NF-KB, la protéine A20 qui s'associe au complexe TRAF1-TRAF2 est impliquée dans l'inhibition de l'activation de NF-KB par le TNF α (Song et al., 1996).

En conclusion, des signaux antagonistes peuvent s'individualiser à partir de chaque type de récepteur pour le TNF α ; ils dépendent des protéines qui sont recrutées et activées auprès de chacun. Les protéines associées à TNF-R1 et TNF-R2 sont impliquées dans l'activation de voies de transduction différentes qui impliquent potentiellement la production de seconds messagers différents.

C - LES PHOSPHOLIPASES ET LES SECONDS MESSAGES

Les liens entre les protéines associées aux récepteurs et les voies de transduction sous-jacentes ne sont pas encore établis. Cependant, trois voies de signalisation majeures ont été identifiées en réponse au TNF α (Figure 15). Elles impliquent l'activation de différentes phospholipases : phospholipase A₂ (PLA₂) (Clarck et al., 1988; Neale et al., 1988; Burch and Tiffant, 1989; Hoeck et al., 1993; Liscovich and Cantley, 1994), phospholipase C spécifique de la phosphatidylcholine

(PC-PLC) (Schütze et al., 1991) et sphingomyélinases (SMases) (Kim et al., 1991; Dbaibo et al., 1993; Yang et al., 1993; Kolesnick and Golde, 1994).

1 - La PLA₂ et l'acide arachidonique

L'activation de la phospholipase A₂ (PLA₂) conduit à la production d'acide arachidonique (AA) à partir de la phosphatidylcholine (PC). L'AA est le précurseur commun des voies de biosynthèse des acides hydroxyeicosatétraénoïques (HETEs), des leucotriènes et des prostaglandines (Figure 13). Les leucotriènes et les prostaglandines sont des médiateurs potentiels de l'inflammation et sont certainement responsables, au moins en partie, de l'activité pro-inflammatoire du TNF α (Godfrey et al., 1987; Clark et al., 1988). L'effet vasodilatateur du TNF α sur les vaisseaux sanguins est médié par l'action des prostaglandines PGE₂ et PGI₂ sur les cellules endothéliales, et serait responsable des nécroses hémorragiques induites par le TNF α dans certaines tumeurs. D'autre part, plusieurs études suggèrent que la PLA₂ est impliquée dans les mécanismes de cytotoxicité du TNF α (pour revue voir Beyaert and Fiers, 1994). En particulier, des inhibiteurs de l'activité PLA₂ augmentent la résistance de lignées de fibroblastes murins L929 à la cytotoxicité du TNF α . Par ailleurs, les métabolites de l'AA sont capables de médier certaines réponses au TNF α : l'induction de l'expression du gène *c-fos*, mais pas celle de *c-jun*, par le TNF α dépendrait de la production de 5-HPETE (Haliday et al., 1991). Enfin, l'AA est capable de réguler directement l'activité de protéine kinases C indépendamment du calcium (Murakami and Routtenberg, 1985; Muller et al., 1995). L'AA pourrait également activer certaines phospholipases telles que la PLC γ couplée au récepteur à l'EGF (Yang et al., 1993), ou une sphingomyélinase neutre (Jayadev et al., 1994).

2 - La PC-PLC et le diacylglycérol

La deuxième voie majeure de signalisation du TNF α implique comme second messenger le diacylglycérol (DAG), qui est un activateur classique pour les protéine kinases C (voir le paragraphe correspondant). Le DAG peut potentiellement être produit par l'activation de différentes phospholipases : phospholipase C spécifique de la phosphatidylcholine (PC-PLC), phospholipase C spécifique des phosphatidylinositols (PI-PLC) ou phospholipase D (PLD). La phosphatidylcholine (PC) est constituée de multiples espèces moléculaires qui se distinguent par

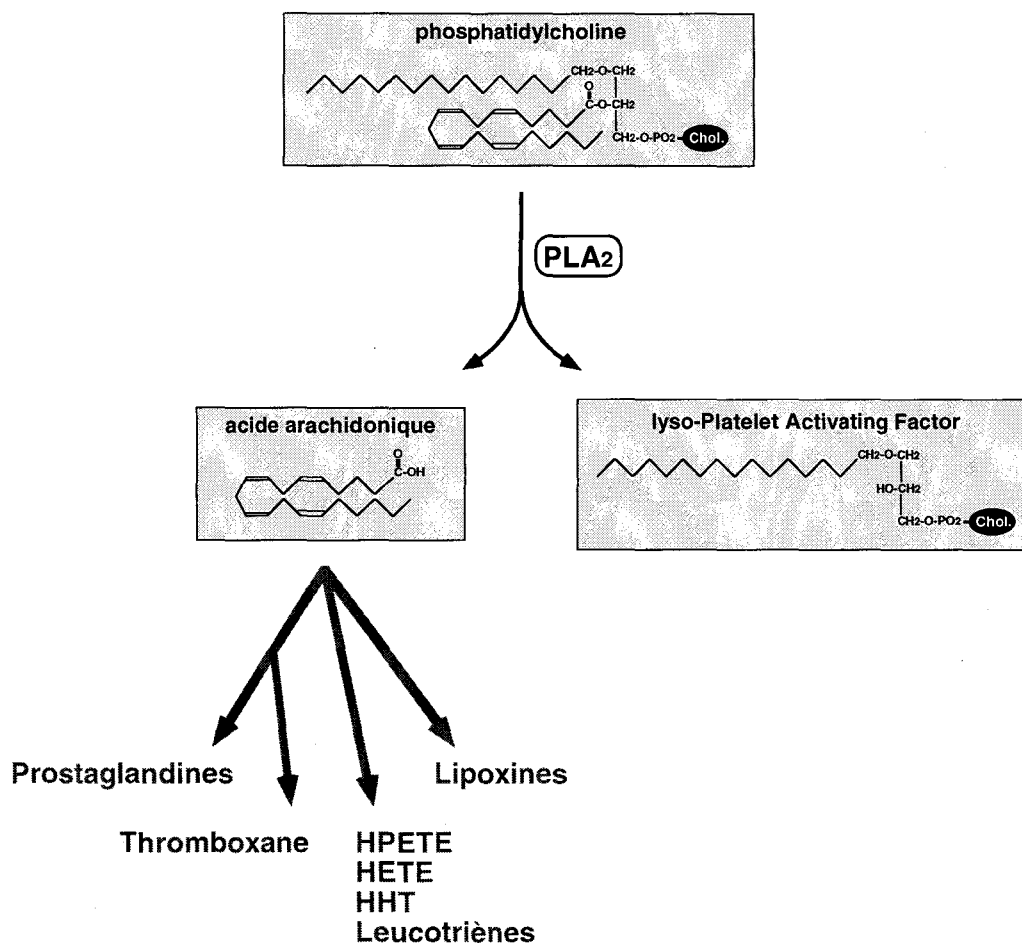


Figure 13 : La phospholipase A2 et l'acide arachidonique

les types de liaisons qui lient les acides gras au glycérol (ester, ether ou vinyl-ether). L'hydrolyse de la PC par une PC-PLC génère différents types de diradylglycérols (DRG), et en particulier le 1,2-*sn*-diacylglycérol (DAG). Le DAG est un activateur classique pour les protéine kinases C (voir le paragraphe correspondant). En réponse notamment à des facteurs de croissance, le DAG peut être également produit par l'activation de PI-PLC. Celles-ci hydrolysent le phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP₂) en DAG et inositol-1,4,5-triphosphate (IP₃). L'IP₃ se fixe sur des récepteurs spécifiques situés à la surface de réservoirs intracellulaires de calcium tel que le réticulum endoplasmique. Ceci induit l'ouverture de canaux calciques adjacents aux récepteurs pour l'IP₃, et la libération résultante de calcium dans le cytosol (Berridge and Irvine, 1984). L'augmentation transitoire de la concentration intracellulaire en calcium induite par l'IP₃ potentialise l'activation de protéine kinases C calcium dépendantes (ou conventionnelles) par le

DAG. Par ailleurs, le DAG peut également être un produit indirect de l'activation de la PLD qui hydrolyse la PC en choline et acide phosphatidique (PA). Celui-ci peut être dans un deuxième temps converti en DAG par une phosphohydrolase spécifique. L'augmentation de DAG résultant de l'hydrolyse du PIP₂ est rapide et transitoire, alors que celle provenant de l'hydrolyse de la PC est tardive et durable (pour revue, voir Zeisel, 1993).

La production de DAG en réponse au TNF α résulte principalement de l'activation d'une PC-PLC, sans activation des PLD et PI-PLC et sans augmentation d'IP₃ ou de calcium (Schütze et al., 1991). Outre son rôle dans l'activation de protéine kinases C, le DAG est impliqué dans l'activation d'une sphingomyélinase de type acide (A-SMase) (voir ci-dessous). Un inhibiteur spécifique de la PC-PLC, le D609, est donc susceptible de bloquer toutes les réponses cellulaires du TNF α qui dépendent de l'activation des PKC ou de l'A-SMase.

3 - Les SMases et le céramide

a) - La voie de la sphingomyéline

Les sphingomyélinases (SMases) sont des phospholipases C spécifiques de la sphingomyéline (SM). Elles sont impliquées dans la voie de la sphingomyéline, où elles hydrolysent la sphingomyéline (SM ou N-acylsphingosine-1-phosphocholine) en céramide (N-acetyl-érythro-sphingosine) et phosphorylcholine (Mitchell and Cheung, 1991; Hannun and Linardic, 1993; Hannun, 1994 et Figure 14). La voie de la sphingomyéline est également activée en réponse à d'autres stimuli extracellulaires que le TNF α , notamment la 1- α ,25-dihydroxyvitamine (vitamine D3) (Okazaki et al., 1989), l'IFN γ (Kim et al., 1991) ou l'IL-1 (Kolesnick et al., 1994).

En fait, dans la signalisation du TNF α , deux types de SMases ont été mises en évidence suite à l'activation du TNF-R1 (pour revue voir Heller and Kroncke, 1994). Elles sont situées et activées dans des compartiments subcellulaires différents et sont impliquées dans l'activation de réponses cellulaires distinctes. La SMase neutre (N-SMase, *neutral SMase*) est localisée dans la membrane cytoplasmique et fonctionne à un pH voisin de 7,0-7,4 en présence d'ions Mg²⁺ (ou Mn²⁺). Elle médie l'activation de sérine/thréonine protéine kinases "dirigées par la proline" (PDPKs) (Mathias et al., 1991; Schütze et al., 1994). L'A-SMase est activée dans les lysosomes et endosomes et

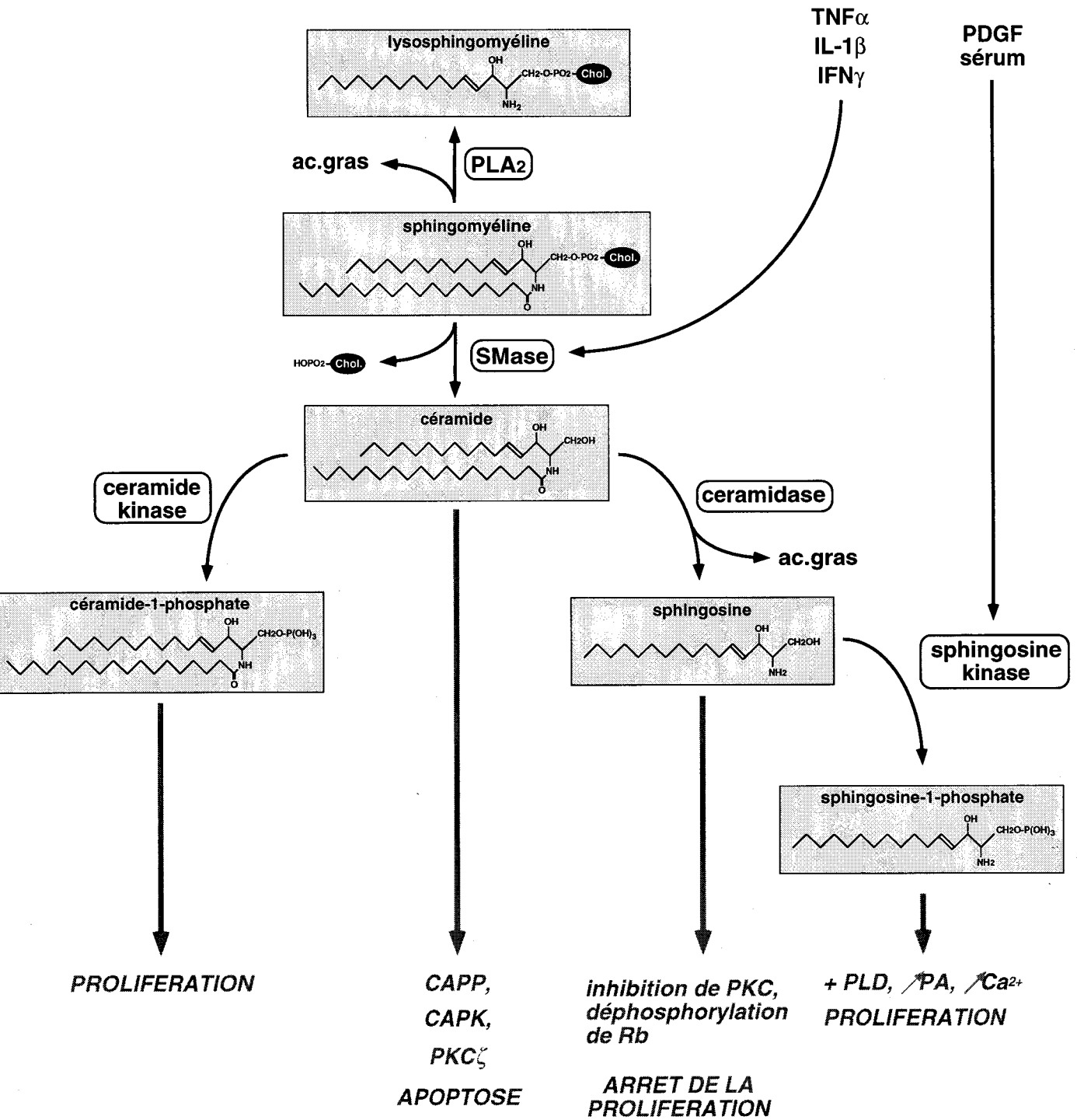


Figure 14 : Les sphingolipides

fonctionne à un pH voisin de 5,0 sans nécessiter la présence de cations. Elle médie notamment l'activation d'une protéine kinase C atypique, la PKC ζ , et celle du facteur de transcription NF- κ B (Diaz-Meco, 1993; Lozano et al., 1994).

L'activation de la N-SMase et de l'A-SMase sont médiées par des domaines différents du récepteur au TNF de type I (TNF-RI) (Schütze et al., 1994; Wiegmann et al., 1994). L'utilisation de mutants de délétion du TNF-RI a permis de mettre en évidence qu'un domaine de 11 acides aminés (309-319) situé du côté amino-terminal de la partie cytoplasmique du TNF-RI est nécessaire et suffisant pour l'activation de la N-SMase par le TNF α (Adam et al., 1996). Par contre, l'activation de l'A-SMase est médiée par un autre domaine, situé à l'extrémité carboxy-terminale de la partie cytoplasmique du TNF-RI. Cette région correspond au "death domain" du TNF-RI qui médie les signaux cytotoxiques du TNF α (Tartaglia et al., 1993).

Entre le TNF-RI et les SMases, tous les liens ne sont pas encore établis. Cependant, l'A-SMase est activée par le DAG produit par la PC-PLC, et l'activation de l'A-SMase est inhibée par le D609 (Schütze et al., 1992). Ceci montre que l'activation de la PC-PLC précède celle de l'A-SMase. Par ailleurs, certains auteurs suggèrent que l'activation de la PLA₂ pourrait précéder celle de la N-SMase (Jayadev et al., 1994). Un consensus semble à présent émerger, présentant l'activation de la PLA₂ en aval de l'activation des PDPKs par la N-SMase (Heller and Kroncke, 1994; Kolesnick and Golde, 1994) (Figure 15).

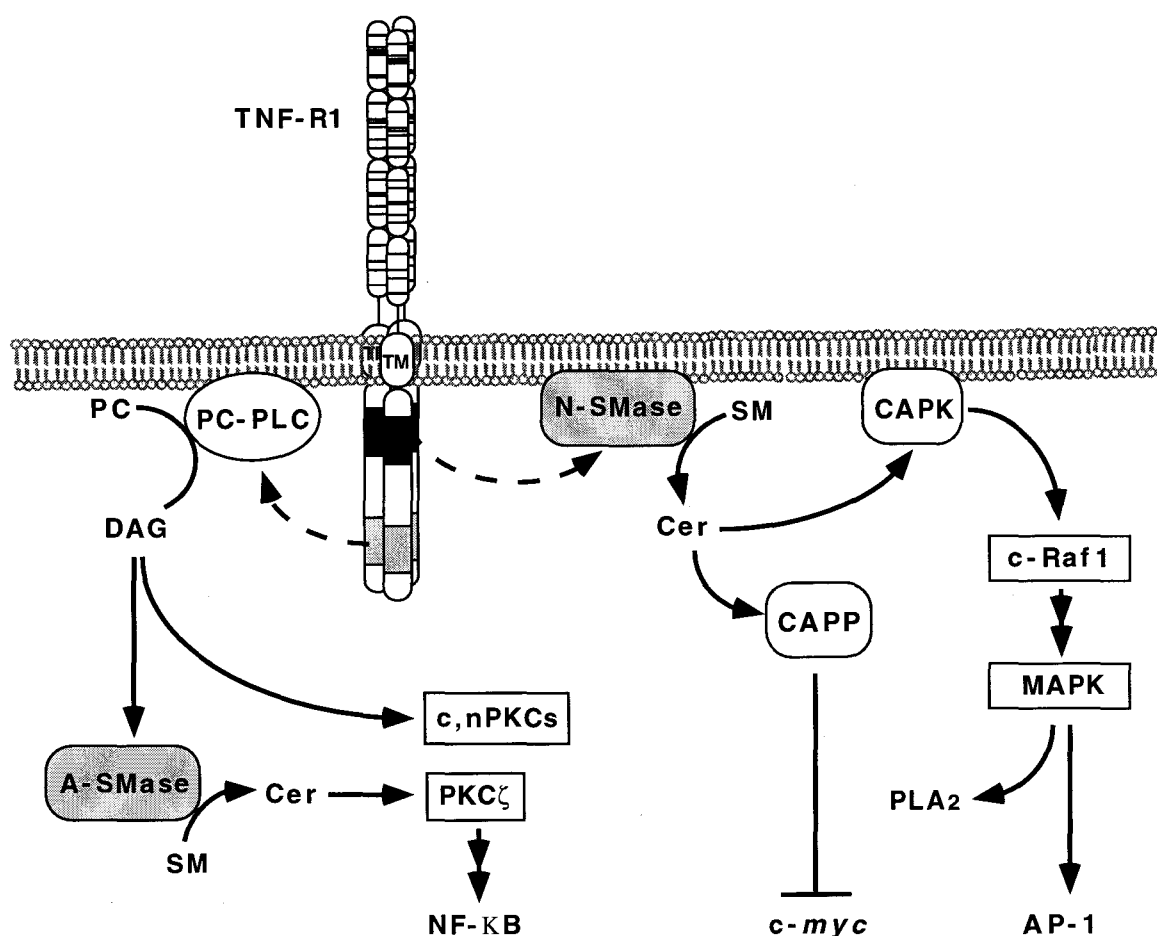


Figure 15 : Les sphingomyélinases dans la signalisation du TNF α

b) - Les cibles moléculaires du céramide

La découverte de la voie de la sphingomyéline est très récente et seules quelques cibles moléculaires directes du céramide ont été caractérisées *in vitro* (voir Figure 15) : une sérine/thréonine protéine kinase (CAPK) (Mathias et al., 1991; Dressler et al., 1992; Liu et al., 1994) et une sérine/thréonine protéine phosphatase (CAPP) (Dobrowsky et al., 1993) activées spécifiquement par le céramide, et une isoforme atypique de PKC, la PKC ζ (Muller et al., 1995). L'activation des cibles du céramide dépend du type cellulaire et de la localisation subcellulaire du céramide, et donc du type de sphingomyélinase impliqué. La fonction probable des enzymes activées par le céramide est explicitée ultérieurement.

c) - Les seconds messagers métabolites du céramide

La sphingosine (SPN) est produite par déacylation du céramide par une céramidase (figure 14). La SPN est un puissant inhibiteur naturel des protéine kinases C (PKCs) et agit par compétition avec le DAG ou les esters de phorbol pour la liaison au site d'activation. La SPN induit également la déphosphorylation de la protéine nucléaire codée par le gène Rb. Cette protéine est un suppresseur de tumeur qui, ainsi activé, inhibe la croissance cellulaire par un arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1. L'activation de Rb et/ou l'inhibition des PKCs par la SPN est en accord avec l'effet antiprolifératif de la SPN observé dans certains types cellulaires (Hannun et Linardic, 1993; Ohta et al., 1994).

Cependant, dans d'autres types cellulaires, la SPN peut exercer des activités indépendantes de l'inhibition des PKCs telles que l'activation de la phospholipase D et la production résultante d'acide phosphatidique (PA), ou la mobilisation de calcium intracellulaire (Breitmayer et al., 1994; Gomez et al., 1995), qui sont au contraire liées à la prolifération cellulaire (Iwata et al., 1995). Ces activités initialement attribuées à la SPN sont en fait dépendantes de la formation de sphingosine-1-phosphate (SPP), qui est le produit de la phosphorylation rapide de la SPN par une sphingosine kinase (pour revue voir Spiegel et al., 1993). La SPP est un puissant mitogène, et c'est l'effecteur direct de la mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire à partir du réticulum endoplasmique, par un mécanisme différent de celui de l' IP_3 (Ghosh, 1994). De plus, l'activation de la phospholipase D et l'induction de la prolifération sont plus efficaces avec la SPP qu'avec la SPN (Gomez et al., 1995). Ces données suggèrent que la SPN et la SPP ont des activités opposées, et que l'effet prolifératif ou anti-prolifératif de la SPN dépende de l'activité de la sphingosine kinase dans les cellules étudiées. Cette activité peut être partiellement inhibée par la génistéine, qui est un inhibiteur de tyrosine kinases (pour revue, voir Beaven, 1996).

Par ailleurs, outre sa conversion en sphingosine, le céramide peut être phosphorylé en céramide-1-phosphate (Cer-1-P), dont l'utilisation d'analogues de synthèse laisse supposer qu'il pourrait détourner les signaux cytotoxiques du céramide et stimuler la synthèse d'ADN et la division cellulaire (Gomez et al., 1995).

Au sein même de la famille des sphingolipides, des seconds messagers peuvent induire des réponses antagonistes. Par exemple le céramide induit un programme de mort cellulaire en réponse notamment au $\text{TNF}\alpha$ (pour revues, voir Hannun and Linardic, 1993; Jayadev et al., 1995; Obeid and Hannun, 1995). La sphingosine-1-phosphate (SPP) est au contraire un puissant mitogène produit en réponse au PDGF ou au sérum (Olivera and Spiegel, 1993). La SPP suffit pour inhiber le programme de mort cellulaire mis en route par le $\text{TNF}\alpha$ ou par des analogues de céramide, et l'activation de la PKC bloque la signalisation pour l'apoptose induite par la céramide, en activant une sphingosine kinase qui phosphoryle la sphingosine en sphingosine-1-phosphate (Cuvillier et al., 1996). Inversement, des analogues de céramide inhibent l'activation de la PLD par la SPP (Gomez et al., 1995), ainsi que l'induction de la prolifération cellulaire induite par la SPP ou par l'acide phosphatidique (Gomez et al., 1994). En conséquence, le choix d'une réponse cellulaire de type proliférative plutôt qu'apoptotique suite à la production de céramide semble dépendre de l'activité de la sphingosine kinase et de la production résultante de sphingosine-1-phosphate à partir de la sphingosine, qui est l'un des métabolites du céramide.

4 - Les activités antagonistes des glycérolipides et des sphingolipides

Le diacylglycérol et le céramide sont respectivement les seconds messagers centraux de la voie des phosphoinositides et de la voie de la sphingomyéline. Ils sont principalement impliqués dans la transduction de signaux antagonistes qui contrôlent la croissance cellulaire : le diacylglycérol est un médiateur de signaux mitogènes et anti-apoptotiques, alors que le céramide est un médiateur de signaux anti-prolifératifs et apoptotiques (pour revue voir Spiegel et al., 1996). Ces réponses cellulaires sont exclusives. Par exemple, l'activation de protéine kinases C par des esters de phorbol ou par le diacylglycérol inhibe la cytotoxicité ou l'apoptose médiées par le céramide, et favorise la prolifération cellulaire (pour revue voir Hannun et Linardic, 1993).

Les voies métaboliques qui gouvernent la production de ces seconds messagers sont mutuellement dépendantes (Figure 16). Dans certains types cellulaires, une activité sphingosine kinase élevée transforme la sphingosine (produite à partir du céramide) en sphingosine-1-phosphate (SPP). Celle-ci induit notamment l'activation de la phospholipase D et la production résultante d'acide phosphatidique qui est une source de diacylglycérol.

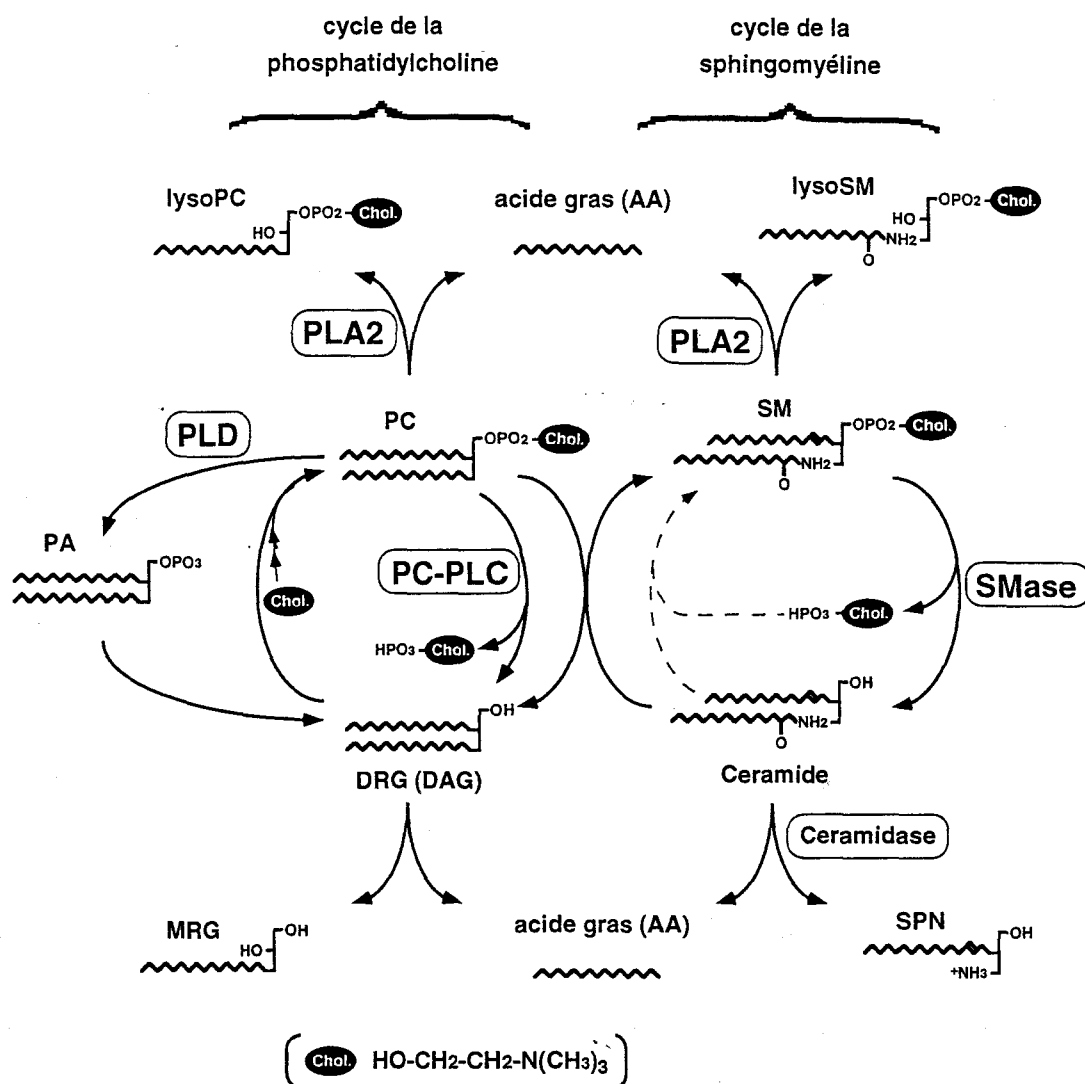


Figure 16 : Interactions entre les voies métaboliques de la phosphatidylcholine et de la sphingomyéline. La phosphatidylcholine (HPO₃-Chol.) est synthétisée à partir de la choline, et est hydrolysée par des phospholipases C (PC-PLC), D (PLD), et A₂ (PLA₂). La sphingomyéline est synthétisée à partir de la phosphatidylcholine et de la céramide, et est hydrolysée par une sphingomyélinase (SMase) ou une céramidase. Abréviations utilisées : AA, acide arachidonique ; DRG, diradylglycérol (dont le diacylglycérol DAG) ; lysoPC, lyso-phosphatidylcholine ; lysoSM, lyso-sphingomyéline ; MRG, monoradylglycérol ; PA, acide phosphatidique ; PC, phosphatidylcholine ; SM, sphingomyéline ; SPN, sphingosine ;

Inversement, le diacylglycérol peut activer l'A-SMase qui produit du céramide. Les proportions respectives du diacylglycérol et du céramide, qui dépendent de l'activité des différents types de phospholipases (PLC, PLD, Smase, etc.), conditionnent donc le type de réponse réalisé dans la cellule, prolifération ou apoptose.

D - LES PROTEINES G

Les protéines G sont des protéines régulatrices membranaires à activité GTPase : elles lient le GTP et l'hydrolysent en GDP. Les protéines G inactives liées au GDP sont activées par le remplacement du GDP en GTP catalysé soit directement par les récepteurs membranaires activés dans le cas de protéines G trimériques, soit indirectement sous l'action de facteurs d'échange nucléotidique pour des petites protéines G de type *ras*. Les protéines G actives liées au GTP activent en aval des phospholipases, des adénylate cyclases ou des kinases.

Les protéines G trimériques ont initialement été décrites dans la régulation de la voie de l'AMP cyclique (AMPC) par des hormones et des neurotransmetteurs (pour revue, voir Birnbaumer and Brown, 1990). Elles sont formées de sous-unités α , β et γ , et sont activées par leur liaison au GTP induite par des récepteurs activés. L'activation de ces protéines G conduit à la libération de la sous-unité catalytique $G\alpha$ qui régule l'activité de l'adénylate cyclase (AC) qui produit de l'AMPC à partir de l'adénosine triphosphate (ATP). Dans la voie de l'AMP cyclique deux types de protéines G trimériques ont été décrites : des protéines G inhibitrices (G_i) et des protéines G stimulatrices (G_s) dont les sous-unités $G\alpha_i$ ou $G\alpha_s$ respectivement inhibent ou activent l'AC. Certaines endotoxines bactériennes altèrent la régulation des protéines G trimériques (Neer, 1995). La toxine de *Vibrio cholerae* (CTX, *cholera toxin*) bloque les protéines $G\alpha_s$ dans leur forme active liant le GTP, ce qui provoque l'activation constitutive de l'AC. La toxine de *Bordetella pertussis* (PTX, *pertussis toxin*) induit la dissociation de la sous-unité $G\alpha_i$ des récepteurs et empêche ainsi la transmission de signaux inhibiteurs vers l'AC.

Plusieurs expériences suggèrent que les signalisations du $TNF\alpha$ impliquent l'activation de protéines G. Dans les lignées de cellules myéloïdes humaines HL-60 ou de fibrosarcome murin L929, ou dans des leucocytes polynucléaires, le $TNF\alpha$ augmente la fixation de GTP à la membrane et induit des activités GTPasiques (Imamura et al., 1988; Klein et al., 1995). Dans les

cellules L929, l'action cytotoxique du $\text{TNF}\alpha$ peut être empêchée par un prétraitement avec la PTX (Imamura et al., 1988). De même, la production d'acide arachidonique par le $\text{TNF}\alpha$ peut être inhibée par la PTX (Yanaga et al., 1992). Ceci suggère que dans certains types cellulaires, l'action cytotoxique du $\text{TNF}\alpha$ pourrait impliquer des protéines G trimériques de type Gi (Aggarwal et al., 1988; Robaye and Dumont, 1992).

E - LES PROTEINE KINASES ET PHOSPHATASES

1 - Les protéine kinases A

Les protéine kinases A (PKA) sont des serine/thréonine protéine kinases dont l'activation dépend d'une élévation de la concentration intracellulaire en adénosine monophosphate cyclique (AMPc). Celle-ci est régulée par l'activité de l'adénylate cyclase (AC) (pour revue, voir Tang and Gilman, 1992). L'activité des PKAs peut être artificiellement induite par la forskoline qui est un activateur de l'AC, par le dibutyryl AMP cyclique (db-cAMP) qui est un analogue de l'AMP cyclique, ou par des endotoxines bactériennes (voir le paragraphe sur les protéines G). Les PKA sont en particulier impliquées dans l'activation du facteur de transcription CREB/P (CRE binding protein) qui se fixe sur des séquences nucléotidiques caractéristiques appelées CRE (*cAMP-responsive element*) (pour revue voir Hunter, 1995; Karin and Hunter, 1995).

Certains auteurs suggèrent que des PKAs seraient activées en réponse au $\text{TNF}\alpha$ dans des fibroblastes (Mahé et al., 1988; Zhang et al., 1988; Schütze et al., 1989). Des inhibiteurs ciblant préférentiellement les PKAs bloquent l'induction de l'expression de l'IL-6 par le $\text{TNF}\alpha$ (Zhang et al., 1988). Cependant, l'implication des PKA ne semble pas être un élément majeur et déterminant dans les signalisations du $\text{TNF}\alpha$.

2 - Les protéine kinases C

a) - Les isoformes de PKCs

La protéine kinase C (PKC) fut initialement caractérisée comme une sérine/thréonine protéine kinase cytosolique cible des esters de phorbols tel que le phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA *alias* TPA), qui sont des cancérogènes chimiques. La PKC est physiologiquement activée par l'action coordonnée du DAG et de l'IP₃. L'IP₃ induit une augmentation de la concentration intracellulaire en Ca²⁺ qui favorise la translocation de la PKC dans la membrane cytoplasmique où elle peut être activée par du DAG. Inversement, la liaison du DAG à la PKC augmente l'affinité de celle-ci pour le Ca²⁺ ; permettant à la PKC d'être active à de plus faibles concentrations de Ca²⁺. Dans les cellules, le DAG et l'IP₃ sont rapidement dégradés, induisant une activation transitoire de la PKC. Par contre, le PMA qui est un analogue synthétique stable du DAG, induit une activation prolongée de la PKC (pour revue voir Knopf et al., 1986). Les différents types de diarylglycérols ont des capacités différentes à activer les isoformes de PKCs. Le DAG issu du PIP₂ peut activer des PKCs conventionnelles et nouvelles, alors que le DAG (ou d'autres types de diradylglycérols) issu de la PC ne peut activer que des PKCs nouvelles (voir ci-dessous) (Ha and Exton, 1993).

Depuis la découverte de la PKC, qu'on dénomme aujourd'hui PKC α , dix autres isoformes ont été isolées et caractérisées ; elles constituent la famille des PKCs. Elles se répartissent à présent en trois groupes : les PKCs conventionnelles (cPKCs : α , β I, β II et γ), les PKCs nouvelles (nPKCs : δ , ϵ , η , θ , μ), et les PKCs atypiques (aPKCs : ζ , λ) (Nishizuka, 1988 et Tableau 5). Toutes les isoformes de PKCs présentent de fortes homologues entre elles dans leur domaine catalytique, mais diffèrent par leur expression tissulaire, leur dépendance pour des cofacteurs (phosphatidylsérine, calcium), leur activation par différents seconds messagers lipidiques, leur localisation subcellulaire et des spécificités différentes pour leurs substrats (Dekker and Parker, 1994). En particulier, l'absence de domaine de liaison au calcium rend les nPKCs et aPKCs insensibles au Ca²⁺, à la différence des cPKCs. De plus, seules les cPKCs et nPKCs sont activables par le DAG ou le PMA, et un long traitement cellulaire par une forte dose de PMA conduit à une déplétion des cellules en activités PKCs sensibles au PMA. Un tel traitement est cependant sans effet sur les aPKCs qui sont insensibles au PMA. Par ailleurs, la PKC- μ possède

une longue extrémité N-terminale avec un domaine transmembranaire possible qui est absent des autres isoformes de PKCs (pour revue voir Liscovich and Cantley, 1994).

Les substrats des PKCs sont multiples et sont impliqués dans des événements aussi divers que la réplication, le remaniement du cytosquelette ou la transcription. De plus, certaines PKCs sont capables d'activer Ras et Raf-1, deux protagonistes de la cascade des MAP kinases (voir plus loin), dont l'induction conduit notamment à l'activation de facteurs de transcription tels que Elk-1 ou c-Jun (Marquardt et al., 1994).

Type de PKC	Masse calculée (kDa)	Activateurs	Dépletion par le PMA	Expression tissulaire	Effet sur la transformation (T) ou sur la prolifération (P)
cPKCs					
PKC α	76	PS, Ca ²⁺ , DAG, AA, lysoPC	+	universelle (sauf foie)	-T
PKC β I	76	PS, Ca ²⁺ , DAG	+	quelques tissus dont foie	+T
PKC β II	76	PS, Ca ²⁺ , DAG	+	plusieurs tissus dont foie	+T
PKC γ	78	PS, Ca ²⁺ , DAG, AA	+	uniquement cerveau	+/-T
nPKCs					
PKC δ	77	PS, DAG, AA, PIP3	+	universelle	-P
PKC ϵ	83	PS, DAG	+/-	cerveau [rein] (sauf foie)	+P
PKC η (L)	77	PS, DAG	-	poumon, peau, coeur [cerveau, rate]	
PKC θ	81			surtout muscle squelettique [poumon, rate, peau, cerveau]	
aPKCs					
PKC ζ	67	PS, AA, PIP3, ceramide	-	universelle	+P
PKC λ	67	PIP3		ovaire, testicule	

Tableau 5 : Les protéine kinases C. Abréviations : cPKC, protéine kinases C conventionnelles ; nPKC, protéine kinases C nouvelles ; aPKC, protéine kinases C atypiques ; AA, acide arachidonique ; DAG, diacylglycérol ; PIP3, phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate ; PS, phosphatidylsérine; (d'après Hug, 1993; Nishizuka, 1988)

b) - Les PKCs impliquées dans la signalisation du $\text{TNF}\alpha$

Différents inhibiteurs plus ou moins sélectifs pour les protéine kinases C inhibent l'expression de certains gènes induits par le $\text{TNF}\alpha$, tels que les gènes codant la collagénase, la stromélysine, l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène PAI-2, l'IL-1, le GM-CSF (pour revue, voir Aggarwal and Natarayan, 1996). Le $\text{TNF}\alpha$ induit la translocation dans la membrane et l'activation de PKCs dans de nombreux types cellulaires tels que des lymphocytes (Jurkat), des monocytes (U937), des érythroblastes (K562) et des fibroblastes (Brenner et al., 1989; Schütze et al., 1989; Schütze et al., 1990). Le $\text{TNF}\alpha$ induit par ailleurs la myristoylation des protéines MARCKS (myristoylated alanine-rich C kinase substrate) qui sont des substrats spécifiques des PKCs (Thelen et al., 1990).

Dans la signalisation du $\text{TNF}\alpha$, la seule PKC clairement identifiée est la PKC ζ . Etant une isoforme atypique de PKC, celle-ci n'est activable ni par le calcium, ni par le diacylglycérol (et donc par le PMA). *In vitro*, elle est par contre activée par d'autres types de seconds messagers tels que l'acide phosphatidique (PA), le phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP₃) (Nakanishi et al., 1993) ou le céramide (Lozano et al., 1994). Elle peut être inhibée par l'acide arachidonique (Muller et al., 1995). Dans les fibroblastes NIH 3T3, la PKC ζ activée par le céramide en réponse au $\text{TNF}\alpha$, induit indépendamment la prolifération cellulaire (Berra et al., 1993), et l'activation du facteur de transcription NF-KB (Diaz-Meco, 1993; Lozano et al., 1994).

Le rôle critique de la PKC ζ dans la transmission de signaux mitogènes est clairement établi dans la signalisation du PDGF ou de l'insuline où elle est activée en aval de la p21^{ras} et de la PC-PLC (Dominguez et al., 1992; Berra et al., 1993). Son inactivation suffit à bloquer la synthèse d'ADN, alors que sa surexpression induit la transformation des fibroblastes, leur permettant de former des foyers et de croître en agar mou (Berra et al., 1993). Par ailleurs, l'activation du facteur de transcription NF-KB par la p21^{ras} ou par des PKCs sensibles aux esters de phorbol implique également l'activation de la PKC ζ (Diaz-Meco, 1993; Berra et al., 1995; Muller et al., 1995). Dans la signalisation du $\text{TNF}\alpha$, la PKC ζ est activée par le céramide produit par une Smase. Or l'activation de NF-KB survient en aval de l'activation de l'A-SMase. Ceci suggère que c'est l'A-SMase qui est impliquée dans l'activation de la PKC ζ par le $\text{TNF}\alpha$. De plus, les actions de la

PKC ζ sur la prolifération cellulaire et sur l'activation de NF- κ B sont transmises par la cascade des MAP kinases (Berra et al., 1995). Elles pourraient également nécessiter une néosynthèse protéique puisque l'activation des MAP kinases par le TNF α via la PKC ζ est inhibée par la cycloheximide (Carnero et al., 1995).

3 - Les protéine kinases "dirigées par la proline"

Les protéine kinases "dirigées par la proline" (PDPKs, *proline-directed protein kinases*) sont des sérine/thréonine protéine kinases susceptibles de phosphoryler des substrats au niveau de séquences de type -X-Ser/Thr-Pro-X dans lesquelles le site phospho-accepteur sérine ou une thréonine (Ser/Thr) est flanqué en position COOH terminale d'un résidu proline (Pro), et où X désigne un acide aminé quelconque (Davis, 1993). Différents types de PDPKs sont impliqués dans la signalisation du TNF α : la protéine kinase membranaire activée par le céramide, CAPK, et des kinases cytosoliques activées séquentiellement en cascade, les MAP kinases.

a) - La CAPK, protéine kinase activée par le céramide

La CAPK (*ceramide-activated protein kinase*) fut initialement caractérisée comme une sérine/thréonine protéine kinase activée par le céramide en réponse au TNF α et capable de phosphoryler un peptide de synthèse dérivé du récepteur à l'EGF (Mathias et al., 1991). La caractérisation biochimique de la CAPK montre qu'il s'agit d'une protéine membranaire de 97 kDa ayant une activité sérine/thréonine kinase magnésium-dépendante optimale à pH neutre. La CAPK appartient à la famille des PDPKs, bien qu'elle se distingue des autres membres de cette famille par sa localisation membranaire plutôt que cytosolique et par une spécificité de reconnaissance différente pour des substrats *in vitro*. La CAPK a une affinité préférentielle pour des séquences de type Ser/Thr-Leu-Pro, alors que les MAP kinases reconnaissent préférentiellement des séquences de type Pro-Leu-Ser/Thr-Pro (Joseph et al., 1993). La CAPK est activée par le TNF α , l'IL-1 β , la sphingomyélinase, des analogues de céramide et la sphingosine (Mathias et al., 1991). Elle n'est cependant pas activée par d'autres types de phospholipases (PLA $_2$, PLC ou PLD) que la sphingomyélinase, ce qui suggère qu'elle est exclusivement activée par la voie de la sphingomyéline (Dressler et al., 1992).

Dans la signalisation du $\text{TNF}\alpha$, la CAPK serait activée par le céramide produit par la sphingomyélinase neutre (Belka et al., 1995). Sa capacité à se complexer à c-Raf1 et à l'activer par phosphorylation (Liu et al., 1994) suggère que la CAPK serait impliquée dans l'activation de la cascade des MAP kinases par le $\text{TNF}\alpha$ (Raines et al., 1993; Yao et al., 1995).

b) - Les MAP kinases

Les protéine kinases "activées par les mitogènes" (MAPKs, *mitogen-activated protein kinases*) sont des sérine/thréonine protéine kinases très conservées au cours de l'évolution. Elles interviennent de façon universelle dans la transduction rapide de signaux qui régulent des fonctions biologiques essentielles telles que la croissance cellulaire, la différenciation, la réponse à des stress, etc. (Blumer and Johnson, 1994; Treisman, 1996). Les substrats des MAPKs comprennent des enzymes de la membrane plasmique (récepteur à l'EGF, phospholipase A_2), des facteurs de transcription (c-Jun, c-Myc, Elk-1, c-Fos, NF-IL6, ATF-2, TAL), et d'autres kinases (p90^{rsk}, c-Raf-1, MAPKK, MAPKAP kinase II) (Dressler et al., 1992; Davis, 1993). *In vivo*, les MAPKs ont des spécificités différentes pour ces substrats potentiels et sont impliquées dans des réponses cellulaires différentes.

Dans les cellules eucaryotes, on distingue actuellement deux groupes de MAPKs (Tableau 6) :

- les **MAPKs** proprement dites, ou **ERKs** (*extracellular signal-regulated kinases*), qui sont préférentiellement activées en réponse à des facteurs de croissance (EGF, bFGF, PDGF, Insuline, SF/HGF), au sérum ou à des esters de phorbol (PMA) ;

- les **SAPKs** (*stress-activated protein kinases*), qui sont préférentiellement activées en réponse à des cytokines pro-inflammatoires ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\alpha$), à des stress cellulaires variés (irradiation UV-C ou X, hyperosmolarité, hyperthermie), ou à certains inhibiteurs de synthèse protéique (anisomycine, cycloheximide). Les SAPKs regroupent la famille des **JNKs** (*c-Jun N-terminal kinase*) et celle de la **p38/RK** (*reactivating kinase*).

Stimuli	ERKs	JNKs	p38/RK
<u>Esters de phorbol (PMA)</u>	+++	0	ND
<u>Sérum</u>	+++	0	ND
<u>Facteurs de croissance</u>			
EGF/TGF α	+++	+	ND
PDGF	+++	+	ND
FGF	+++	+	ND
Insuline	+++	+	ND
SF/HGF	+++	ND	ND
<u>Cytokines pro-inflammatoires</u>			
TNF α	+	+++	+++
IL-1	+	+++	+++
<u>Stress</u>			
Hyperosmolarité (D-Sorbitol)	+	+++	+++
Irradiation UV-C ou X	+	+++	+++
Choc thermique	+	+++	+++
<u>Inhibiteurs de synthèse protéique</u>			
Anisomycine	0	+++	ND
Cycloheximide	0	+++	ND

Tableau 6 : Les activateurs des cascades de MAP kinases. Légende : +++, activation préférentielle ; +, faible activation ; 0, absence d'activation ; ND, non déterminé.

A l'état latent, les MAPKs inactives sont cytosoliques. Une fois activées par phosphorylation, elles peuvent accéder au noyau où elles régulent l'activité des facteurs de transcription latents. Les MAPKs sont activées par des kinases à double spécificité sérine/thréonine et tyrosine, les MAP kinase kinases (MAPKKs). Celles-ci sont elle-même activées par des MAP kinase kinase kinases (MAPKKKs). En général, les cascades d'activations séquentielles de kinases fonctionnent en modules indépendants de type MAPKKK \rightarrow MAPKK \rightarrow MAPK (Figure 17). Cependant, des réactions croisées entre les différents modules peuvent potentiellement exister *in vivo* (Thomas, 1992; Cobb and Goldsmith, 1995; Waskiewicz and Cooper, 1995; Cahill et al., 1996).

1) - Les ERKs

Deux types d'activation des cascades de MAP kinases de la famille ERK ont été caractérisés (Pelech and Sanghera, 1992; Blumer and Johnson, 1994; Marquardt et al., 1994). Le premier implique l'activation de PKCs en réponse à l'activation de récepteurs couplés à des protéines G trimériques et à des phospholipases. Le second implique des protéines adaptatrices/facteurs

d'échange nucléotidique/petites protéines G ($p21^{ras}$) en réponse à l'activation de récepteurs à activité tyrosine kinase tels que les récepteurs aux facteurs de croissance PDGF et EGF (Figure 17).

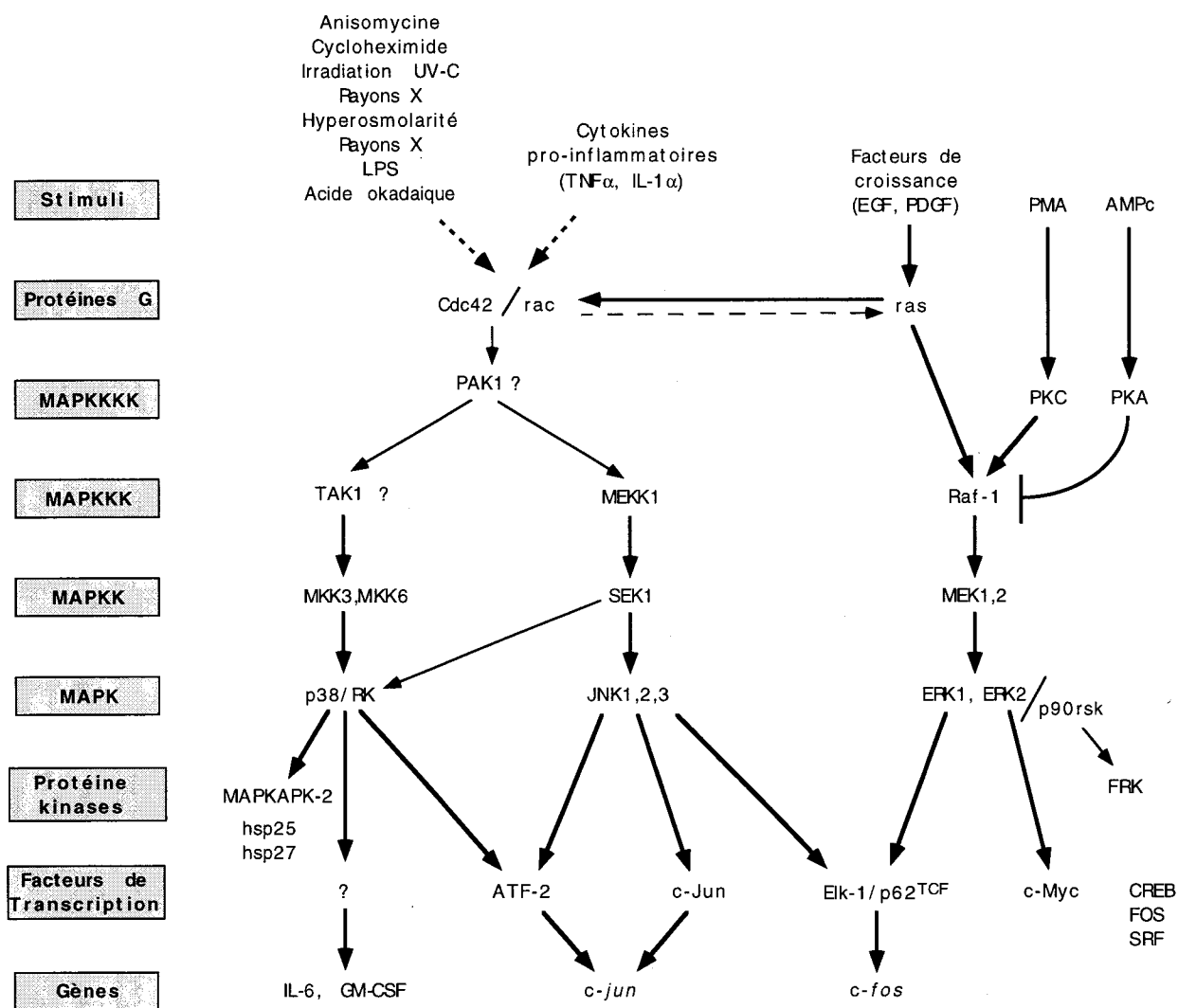


Figure 17 : Les cascades des MAP kinases

Ces deux modes d'activation au niveau de la membrane convergent vers l'activation du module Raf \rightarrow MEK \rightarrow ERK, dont chaque niveau comprend diverses espèces moléculaires (MAPKKK : c-Raf-1, B-Raf, mos ; MAPKK : MEK1, MEK2 ; MAPK : ERK1, ERK2, ERK3, ERK4, ERK5). Les MAPKs de ce module les mieux caractérisées sont la $p44^{ERK1}$ et la $p42^{ERK2}$, qui ont potentiellement des substrats distincts *in vivo* : $p62^{TCF}/Elk1$ pour ERK1 et Elk-1, Myc pour ERK2 (Chuang and Ng, 1994).

Bien que les ERKs soient principalement activées en réponse aux facteurs de croissance et aux esters de phorbol (Marshall, 1995), elles peuvent également être activées par des cytokines. Ainsi, le TNF α active les p44^{ERK1} et p42^{ERK2} dans différents types de lignées cellulaires tels que des fibroblastes, des lymphocytes ou des macrophages (Van Lint et al., 1992; Raines et al., 1993; Vietor et al., 1993), et cette activation implique la voie de la sphingomyéline (Raines et al., 1993). Le signal d'activation de la cascade des ERKs par le TNF α serait transmis par la N-SMase puis par la CAPK qui active c-Raf-1 (Belka et al., 1995; Yao et al., 1995). De plus, dans la signalisation du TNF α , la production d'acide arachidonique et de ses métabolites résulterait de l'activation de la phospholipase A₂ par les ERKs.

Par ailleurs, dans certains types cellulaires tels que dans les lignées de fibroblastes NIH 3T3, l'activation des ERKs peut être inhibée par l'activation des PKA. Celles-ci pourraient agir en inactivant c-Raf-1 par phosphorylation directe (pour revue voir Hunter, 1995).

2) - Les JNKs

Les JNKs (*c-Jun N-terminal kinase*) ont initialement été caractérisées comme étant les MAPKs qui phosphorylent les facteurs de transcription c-Jun sur des résidus sérine situés dans la partie amino-terminale de la protéine. Les JNKs sont activées en aval module MEKK1 -> SEK1 -> JNK (Figure 17) (Minden et al., 1994; Sanchez et al., 1994; Yan et al., 1994). Dix isoformes de JNKs ont doré et déjà été caractérisées ; elles sont issues de trois gènes JNK1, JNK2 et JNK3 ainsi que d'épissages alternatifs (Gupta et al., 1996). Ces différentes isoformes sont toutes capables de phosphoryler les facteurs de transcription p62^{TCF}/Elk1, c-Jun, JunD et ATF2, bien qu'avec des efficacités différentes (Cano et al., 1994; Cavigelli et al., 1994; Sluss et al., 1994; Gille et al., 1995; Gupta et al., 1996).

Le TNF α active les SAPKs préférentiellement aux ERKs (Westwick et al., 1995). L'action du TNF α est initiée par l'activation d'une SMase et la production de céramide, qui conduisent à l'activation de la JNK kinase, SEK-1 (SAPK/ERK kinase-1) (Sanchez et al., 1994). L'activation de la cascade des JNKs est requise pour l'activation des facteurs de transcription Elk-1, c-Jun, et ATF2, l'expression des gènes *c-fos* et *c-jun* en réponse au TNF α , à des céramides ou à différents stress (Cavigelli et al., 1994; Sluss et al., 1994; Westwick et al., 1995). De plus, certains types

d'apoptose (en réponse au $\text{TNF}\alpha$, à des céramides ou à des stress, mais pas à des inhibiteurs de PKCs) nécessitent l'activation des JNKs et des facteurs de transcription c-Jun (Sawai et al., 1995; Verheij et al., 1996; Zanke et al., 1996). L'activation de la cascade des JNKs par l'anisomycine et la cycloheximide est indépendante de leur capacité à inhiber la synthèse protéique et s'observe à des concentrations inférieures à celles qui bloquent la traduction. Enfin, la sphingomyélinase impliquée dans l'activation de la cascade des JNKs par le $\text{TNF}\alpha$ pourrait être l'A-SMase, puisque des cellules déficientes en cette enzyme sont résistantes à l'apoptose induite par des radiations ionisantes (Santana et al., 1996).

3) - La p38/RK

La p38, encore appelée RK (*reactivating kinase*) ou CSBP (*cytokine-suppressive anti-inflammatory drug binding protein*) est l'homologue chez les mammifères de la MAP kinase HOG1 qui est activée chez la levure en réponse à un stress osmotique. La p38 est activée en aval du module $\text{TAK1} \rightarrow \text{MKK3/MKK6} \rightarrow \text{p38}$ (Moriguchi et al., 1996), bien qu'elle puisse également être activable par SEK1, la MAPKK qui active les JNKs (pour revue voir Cano et al., 1994; Galvecha-Gargova et al., 1994; Kyriakis et al., 1994; Raingeaud et al., 1995). Les substrats de la p38 sont la MAPKAP kinase-2, qui phosphoryle les petites protéines de choc thermique Hsp27 et Hsp25, et le facteur de transcription ATF2.

En réponse à une stimulation par le $\text{TNF}\alpha$, la phosphorylation de Hsp27 par la MAPKPK-2 et de l'induction de l'expression des gènes pour l'interleukine 6 et le GM-CSF dépendent de l'activation de la p38 (Beyaert et al., 1996).

4 - La protéine phosphatase activée par le céramide

La protéine phosphatase activée par le céramide (CAPP, *ceramide-activated protein phosphatase*) est l'une des enzymes activées directement par la céramide en réponse au $\text{TNF}\alpha$. Elle correspond à des formes hétérotrimériques de la sérine/thréonine protéine phosphatase 2A (PP_2A), dont l'activité peut être préférentiellement inhibée par l'acide okadaïque. Sous l'influence du céramide mais pas de la sphingosine, la CAPP est activée et migre du cytosol vers la membrane plasmique (pour revue, voir Dobrowsky et al., 1993).

L'activation de la CAPP en réponse à l'augmentation de céramide par le TNF α semble être associée à l'effet cytotatique/cytotoxique du TNF α sur certaines lignées cellulaires. En effet, dans les cellules promyélocytiques humaines HL-60, l'activation de la CAPP par le TNF α ou par des céramides arrête la prolifération et inhibe l'expression du gène *c-myc* en bloquant l'élongation de sa transcription après le premier exon (Wolff et al., 1994). Les protéines c-Myc sont impliquées dans la progression du cycle de division cellulaire, et l'absence de synthèse des protéines c-Myc pourrait être responsable de l'arrêt de la prolifération ; ces deux effets induits par le TNF α sont empêchés par l'acide okadaïque, un inhibiteur de CAPP. De plus, l'acide okadaïque inhibe également la fragmentation de l'ADN survenant au cours du processus d'apoptose induit par le TNF α (Hannun, 1994). Les réponses cellulaires de la CAPP pourraient être liées à sa capacité à inhiber l'activité des MAP kinases et des SAPKs (Hunter, 1995), ainsi qu'à déphosphoryler des protéines de choc thermique telles que Hsp27. Inversement, l'inactivation de protéine phosphatases par l'acide okadaïque est susceptible d'induire l'activation des ERKs et des JNKs (Cano et al., 1994; Alessi et al., 1995). Et dans certains types cellulaires tels que les fibroblastes, le TNF α induit plutôt une inactivation de la PP₂A, et l'acide okadaïque mime l'activation de kinases par le TNF α (Guy et al., 1992; Guy et al., 1995).

5 - Les tyrosine protéine kinases

Des tyrosine kinases sont également impliquées dans la signalisation du TNF α et pourraient notamment intervenir dans les phénomènes de sensibilité ou de résistance des cellules face à la cytotoxicité du TNF α . La fragmentation de l'ADN induite par le TNF α ou par la céramide peuvent être empêchées par un traitement des cellules avec l'inhibiteur de tyrosine kinases herbimycin A (Ji et al., 1995). De plus, des cellules résistantes à l'effet cytotoxique du TNF α peuvent devenir sensibles par un traitement avec des inhibiteurs de tyrosine kinases génistéine ou herbimycin A (Sasaki and Patek, 1995). Par ailleurs des tyrosine kinases sensibles à la génistéine pourraient être impliquées dans l'induction de l'expression de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1) (vanHinsbergh et al., 1994) et de l'activation du facteur de transcription NF-KB (Reddy et al., 1994) par le TNF α .

IV - ORIENTATION DE LA RECHERCHE

Nous avons cherché à déterminer le cheminement intracellulaire qui relie l'activation du récepteur pour la $\text{TNF}\alpha$ et celle du proto-oncogène *c-ets1* dans les fibroblastes humains en culture. Pour cela, différents agents pharmacologiques ont été utilisés pour activer ou inhiber sélectivement les voies de transduction potentiellement activées par le $\text{TNF}\alpha$, notamment : la voie de l'AMPC et de la protéine kinase A, la voie du diacylglycérol et des protéine kinases C, la voie de la phospholipase A_2 et de l'acide arachidonique, et la voie de la sphingomyéline et du céramide.

II - RESULTATS

A - ARTICLE 3

L'expression de *c-ets1* dans les fibroblastes est induite par le TNF α par la voie de la sphingomyéline, indépendamment de la PKC, de la PKA et de la PLA $_2$, ainsi que par divers stress.

***c-ets1* Expression In Fibroblasts Is Induced by TNF α Through The Sphingomyelin Pathway Independently of PKA, PKC and PLA $_2$ Independent from PMA sensitive PKCs, and by Various Stresses.**

Frédéric Gilles, Stefan Schütze, Nathalie Dutheil, Dominique Stéhelin et Bernard Vandenbunder.

Résumé

Nous avons précédemment montré que le proto-oncogène *c-ets1* était un nouveau gène de réponse précoce au TNF α dans les fibroblastes de prépuce humain. Nous avons recherché ici les voies de transduction du signal impliquées dans cette induction.

L'expression de *c-ets-1* induite par le TNF α requiert l'activation de sérine/thréonine-protéine kinases (Ser/Thr-PKs), mais pas de tyrosine-protéine kinases (Tyr-PKs). L'acide okadaïque, qui inhibe préférentiellement la sérine/thréonine-protéine phosphatase 2A (PP $_2$ A), mime l'activation de ces Ser/Thr-PKs et induit l'expression de *c-ets1*. Les protéine kinases activées par le TNF α sont différentes de celles dépendant de l'AMP cyclique (PKA) ou sensibles aux esters de phorbol (PKC). En effet, l'activation de la PKA inhibe l'effet du TNF α sur *c-ets1*, et celle de PKCs par le PMA induit *c-ets1* de manière additive et indépendante de l'action du TNF α . Par ailleurs, l'activation de la voie de la sphingomyéline par une sphingomyélinase bactérienne, des analogues

de la céramide et surtout la sphingosine, induit l'expression de *c-ets1*. L'acide arachidonique inhibe l'expression de *c-ets1* induite par le $\text{TNF}\alpha$, la sphingomyélinase ou les analogues de la céramide ; et le $\text{TNF}\alpha$ active les deux types de sphingomyélinases, neutre et acide, dans les fibroblastes. Ceci montre que la voie de la sphingomyéline médie l'induction de *c-ets1* par le $\text{TNF}\alpha$. De plus, le gène *c-ets1* est induit en réponse à un stress osmotique ou à l'anisomycine. Ceci suggère que la cascade des protéine kinases activées par le stress, qui est également activée par la céramide, médie l'induction de l'expression de *c-ets1* par le $\text{TNF}\alpha$ dans les fibroblastes.

***c-ets-1* Expression In Fibroblasts Is Induced by TNF α Through The Sphingomyelin Pathway Independently of PKA, PKC and PLA $_2$, and by Various Stresses.**

Frédéric Gilles¹, Stefan Schütze², Nathalie Dutheil¹, Dominique Stéhelin¹ and Bernard Vandenbunder^{1,*}.

¹Unité d'Oncologie Moléculaire (CNRS URA 1160), Institut Pasteur de Lille, Lille (France)

²Institut für Immunologie, Universität Kiel, Kiel (Germany)

* corresponding author : to whom correspondence should be addressed at
Unité d'Oncologie Moléculaire (CNRS URA 1160)
Institut Pasteur de Lille, 1, rue Calmette, F-59019 Lille, (France).
Tel : (33).20.87.79.12 ; Fax : (33).20.87.79.08

Running title : TNF signaling for *c-ets-1* expression

SUMMARY

We previously demonstrated that the *c-ets-1* proto-oncogene was a new TNF α -early response gene in human foreskin fibroblasts. We have investigated here the signaling pathways involved in this induction. *c-ets-1* expression required the activation of serine/threonine-, but not tyrosine-, protein kinases (PK) by TNF α . This was mimicked by the preferential inactivation of serine/threonine protein phosphatase 2A by okadaic acid. TNF α -activated PKs were different to cAMP- and phorbol ester-sensitive protein kinases. However, PKA activation inhibited TNF α -induced *c-ets-1* expression, whereas PKC activation induced *c-ets-1* expression additively to TNF α . In contrast, activation of the sphingomyelin pathway by bacterial sphingomyelinase, ceramide analogs and preferentially by sphingosine induced *c-ets-1*. Arachidonic acid inhibited *c-ets-1* expression induced by either TNF α , sphingomyelinase or ceramide analogs, suggesting that the sphingomyelin pathway mediated *c-ets-1* induction. TNF α activated both acidic and neutral sphingomyelinases in fibroblasts. Moreover, *c-ets-1* was induced by osmotic stress or anisomycin. This suggests that the stress-activated protein kinases cascade which may be also activated by ceramide, mediates TNF α -induced *c-ets-1* expression in fibroblasts.

INTRODUCTION

The proto-oncogene *c-ets-1* belongs to the Ets gene family which members are present throughout the animal kingdom (1-3), and encode transcription factors related by a highly conserved DNA binding domain (for reviews see (4-6)). Many viral and cellular promoters, including the promoters of growth factors genes, proto-oncogenes, genes important for immune functions and genes encoding matrix-degrading proteases, have been reported to be activated by Ets proteins (for reviews see (5-8)). We previously showed that *c-ets-1* expression was differentially induced by cytokines and growth factors in normal cultured human foreskin fibroblasts (HFF) (9). TNF α and IL-1 α were the most potent inducers of *c-ets-1* expression compared to other factors tested (bFGF, PDGF and EGF). Moreover, we demonstrated that *c-ets-1* behaved as a new TNF α -early response gene since TNF α induced *c-ets-1* mRNA expression within one hour by new transcription without the need of new protein synthesis (9). Conversely, Ets-1 transcription factors are potent activators for the TNF α gene expression (10). This reciprocal activation between Ets-1 and TNF α suggests an activatory loop in which Ets-1 transcription factors mediate and enhance some cell-responses to TNF α .

In addition, independent experiments suggest that *c-ets-1* expression in human carcinomas correlates with sites of TNF α production. For example, both *c-ets-1* and TNF α expressions are mainly detected in stromal cells (fibroblasts and endothelial cells for *c-ets-1* (11, 12); macrophages for TNF α (13-16)) close to tumor foci, whereas more distant stromal cells or epithelial tumor cells show absent or low *c-ets-1* or TNF α expressions. Moreover, *c-ets-1* (11, 12) and TNF α (16, 17) transcripts are mostly detected in high grade tumors, such as in invasive carcinomas.

The intracellular signaling systems regulating the *c-ets-1* proto-oncogene expression have been poorly investigated until now. We previously showed that phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) increased *c-ets-1* transcripts in fibroblasts (11) as well as in endothelial cells (18), suggesting that the activation of protein kinase C (PKC) isoforms sensitive to PMA could be involved in the regulation of *c-ets-1* expression. In contrast, signal transduction pathways activated by TNF α are becoming well documented and were investigated here to search for the *c-ets-1* gene activatory mechanisms.

TNF α binds to two distinct specific cell surface receptors of 55 kDa (TNF-R55) and 75 kDa (TNF-R75) (13). Both receptors are expressed on the surface of most cells, although in different amounts, but most of cell responses to TNF α may occur by activation of TNF-R55 (19). Different signaling systems are potentially induced by TNF α . These include different second messengers such as cAMP (20), arachidonic acid (21, 22), phosphatidylcholine- but not phosphatidylinositol-derived 1,2-diacylglycerol (DAG) (23), or ceramide (24-27).

Although intracellular sequences of TNF α receptors show no obvious similarity to known tyrosine- or serine/threonine- kinase peptidic sequences, TNF α activates multiple protein phosphorylations both on serine and threonine residues and on tyrosine residues in human fibroblasts (28). Several kinase activities have been reported to be increased by TNF α . These include cAMP-dependent protein kinase (PKA) (20), protein kinase C (PKC) (29), proline-directed protein kinases which include mitogen-activated protein kinases (MAPKs *alias* ERKs, extracellular-regulated protein kinases) (26, 30, 31), stress-activated protein kinases (SAPKs *alias* JNKs, c-Jun N-terminal kinases) (32-34), and a ceramide-activated protein kinase (CAPK) (35). However, in human fibroblasts, phosphorylation patterns induced with TNF α are distinct from those obtained with PKC and PKA activators, bradykinin (a stimulator of phosphatidylinositol and phosphatidylcholine hydrolysis), EGF, heat shock, and mellitin (an activator of PLA₂) (36), and are similar to those obtained with okadaic acid, a serine/threonine protein phosphatase inhibitor that preferentially inhibits protein phosphatase 2A (PP_{2A}) and in a lower extent protein phosphatase 1 (PP₁) (37). Thus, TNF α -induced phosphorylations may result as well from kinases activation or PP_{2A} inactivation (38).

In many cell types, sphingomyelin breakdown is an early event after TNF α binding to its specific cell surface receptors. It generates the lipid second messenger ceramide that is believed to mediate most of cellular responses to TNF α , including NF- κ B activation (39), *c-jun* expression (32) or apoptosis (34). Ceramide arises from membrane sphingomyelin hydrolysis by sphingomyelinases (SMases) (24-27, 39, 40) and has a central role in the sphingomyelin pathway in which several molecular targets for ceramide have been described. These include CAPK, a membrane-bound 97 kDa Mg²⁺-dependent serine/threonine protein kinase (35, 40, 41), a ceramide-activated protein phosphatase (CAPP) which corresponds to heterotrimeric forms of PP_{2A} (42, 43), and PKC ζ , an atypical Ca²⁺- and DAG/phorbol ester-insensitive isotype of PKC. A general consensus for TNF α signaling is emerging in which two independent sphingomyelin pathways involve distinct SMases, neutral and acidic SMases, and transduce different signals (44). Acidic SMase present in lysosomal and endosomal membranes is activated by DAG generated by the TNF-R-mediated activation of a phosphatidylcholine-specific phospholipase C (PC-PLC) (39). DAG is a well established activator of PKC, which appears to mediate various cellular responses to TNF α , including the activation of the nuclear transcription factor AP-1. The DAG-regulated acidic SMase is involved in transducing some of the TNF α signals to the cell nucleus *via* the activation of the nuclear transcription factor NF- κ B (45). In the plasma membrane, TNF-R-mediated activation of a neutral SMase leads to the activation of CAPK, which connects the sphingomyelin pathway to the MAP kinase cascade through the CAPK-activation of c-Raf-1 (46). However, JNKs rather than ERKs are preferentially activated by TNF α (33, 47) and

would mediate TNF α -induced ATF2 and c-Jun phosphorylation and activation, *c-jun* expression, and apoptosis. In this proposed model, PLA₂ activation would be secondary to MAP kinase cascade activation (26, 31), rather than prior to neutral SMase activation (48). However, some of ceramide cellular responses may correspond to its conversion into secondary metabolites with potential second messenger functions. Ceramide may be rapidly converted into the protein kinase C inhibitor sphingosine which exerts also second messenger functions unrelated to PKC inactivation, such as Ca²⁺ mobilization, phospholipase D activation, and fibroblast proliferation (49). Sphingosine is as effective as ceramide analogs in activating CAPK (35) or PKC ζ (50).

We report here the first investigations on the TNF α signaling pathway that mediate the induction of the *c-ets-1* proto-oncogene expression in human fibroblasts. We determined which of the second messengers (cAMP, DAG, arachidonic acid or ceramide) potentially generated under TNF α stimulation, could be involved in the induction of the *c-ets-1* gene expression. We demonstrated that *c-ets-1* is induced through the TNF α -activated sphingomyelin pathway or by various stresses. We further suggest that stress-activated protein kinases that are also targets for ceramide, are involved in *c-ets-1* induction by TNF α .

MATERIALS AND METHODS

Cells, cell culture and cell treatment.

Primary cultures of human foreskin fibroblasts (HFF) were kindly provided by Dr Thomas Jones, Lederle Laboratories (Pearl River, NY). Cells from passage 11 to 25 were used. Cells were plated in 100 mm cell culture dishes and maintained in culture in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS), 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin and 2 mM L-glutamin, in humidified air with 5% CO₂ at 37°C. The experiments were initiated when cells reached subconfluence. The medium was replaced by DMEM without FCS. When indicated, cells were preincubated for 1 hour with the pharmacological inhibitors. Cytokines or pharmacological activators were then added to the cells for 4 hours. This time of stimulation was optimal for *c-ets-1* mRNA accumulation according to time course experiments previously described (9).

Cytokines and chemicals.

Recombinant human tumor necrosis factor-alpha (TNFα) and recombinant human basic fibroblast growth factor (bFGF) were obtained from R&D Systems (Oxon, U.K.). Anisomycin, arachidonic acid, bradykinin, calphostin C, cholera toxin (CTX), dibutyryl-cAMP, 1,2-dioctanoyl-*rac*-glycerol (1,2-diC8), forskolin, genistein, 1-(5-Isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine dihydrochloride (H-7), N-(2-guanidinoethyl)-5-isoquinolinesulfonamide dihydrochloride (HA1004), okadaic acid, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), phospholipase A₂ from Bee Venom, sphingomyelinase from *Staphylococcus aureus* were purchased from Sigma. Chelerythrine chloride and staurosporine were purchased from Biomol (Plymouth, PA). Myristoylated PKC peptide inhibitor was from Promega Corp. (Madison, WI). Pertussis toxin (PTX) was purchased from List Biological Laboratories, Inc. (Campbell, CA). C2-ceramide (N-acetyl-D-*erythro*-sphingosine), C8-ceramide (N-octanoyl-D-*erythro*-sphingosine), and sphingosine (D-*erythro*-sphingosine) were obtained from Calbiochem. All chemical products were diluted, stored and used at suboptimal concentrations, according to manufacturer's recommendations and references mentioned in the text.

cDNA probes.

The 825-bp Eco-R1 coding fragment from the human *c-ets-1* cDNA (51), the complete cDNA of human collagenase-1, the 1.3-kbp Pst1 coding fragment of the rat glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH) were used as templates to synthesize probes for Northern blot experiments. These cDNA probes were labeled with

[α - ^{32}P]dCTP (3000 Ci/mmol, ICN), with the Megaprime DNA labeling system purchased from Amersham.

RNA extraction and Northern blot analysis.

Total RNAs were isolated using the guanidium isothiocyanate/CsCl-derived method of Chirgwin et al. (52) as previously described (9). Twenty μg of RNA were separated by electrophoresis in denaturing agarose gels, and transferred onto nitrocellulose filters (HybondTM-C extra, Amersham). Filters were fixed by baking for 2 h at 80°C and hybridized with the [α - ^{32}P] cDNA probes overnight at 42°C in hybridization buffer (50% formamide, 1 M NaCl, 1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 10% dextran sulfate (wt:v) 5x Denhardt's solution (denatured salmon sperm DNA at 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)). The filters were washed progressively to high stringency (from 2x to 0.1x SSC, containing 0.1% SDS, at 60°C) and exposed to Hyperfilm MP (Amersham) for several days. The GAPDH being mostly considered as an housekeeping gene, its mRNA level served as a control for the amount of RNA loaded onto the nitrocellulose filters. When indicated, the amount of transcripts hybridized with [^{32}P]-labeled cDNA probes were quantified on counting the Northern blots with a PhosphorImager (Molecular Dynamics Inc., USA).

Assays for neutral and acidic SMases.

Miscellar SMase assays, using exogenous radiolabeled SM as substrate was performed according to the method described (44). HFF cells ($3 \times 10^6/\text{ml}$) were incubated in triplicates with 100 ng/ml recombinant human TNF. At indicated times, TNF treatment was stopped by immersion of samples in methanol/dry ice for 10 sec. followed by a centrifugation at 4°C in a microcentrifuge. To measure neutral SMase, cells pellets were resolved in a buffer containing 20 mM HEPES (pH 7.4), 10 mM MgCl_2 , 2 mM EDTA, 5 mM DTT, 0.1 mM Na_3VO_4 , 0.1 mM NaMoO_4 , 30 mM p-nitro-phenylphosphate, 10 mM β -glycerophosphate, 750 μM ATP, 1 mM PMSF, 10 mM leupeptin, 10 mM pepstatin, 0.2% Triton X-100. Cells were homogenized by repeated squeezing of cells through an 18-gauge needle. Nuclei and debris were removed by low speed centrifugation (800xg) and 50 μg protein from the supernatants, containing cytosolic and membrane proteins incubated for 2 h at 37°C in a reaction buffer (50 μl final volume) containing 20 mM HEPES, pH 7.4, 1 mM MgCl_2 and 2.25 μl of [N-methyl- ^{14}C] sphingomyelin (0.2 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$, specific activity 56.6 mCi/mMol, Amersham). The reactions were stopped by addition of 800 μl chloroform:methanol (2:1, v/v) and 250 μl of H_2O . [^{14}C] phosphorylcholine, produced from [^{14}C]-SM was extracted from the aqueous phase, identified by TLC and routinely determined by liquid scintillation counting.

To measure acidic SMase, HFF cells were treated as described above and cell pellets were resuspended in 200 μl of 0.2% Triton X-100. Cells were homogenized,

nuclei and debris removed by centrifugation at 14,000 rpm for 5 min. and 50 μ g protein from the supernatants, incubated for 2 h at 37°C in a reaction buffer (50 μ l final volume) containing 250 mM sodium acetate, pH 5.0 and 2.25 μ l of [N-methyl-¹⁴C] sphingomyelin. The amount of radiolabeled phosphorylcholine was determined as described for the neutral SMase assay.

Estimation of ceramide production by the two SMase isoenzymes was performed based on the 1:1 stoichiometry of phosphorylcholine and ceramide production after SM hydrolysis (phosphorylcholine in the aqueous phases from the enzyme assays was detected by TLC in addition to the determinations of radioactivity by scintillation counting).

RESULTS

Activation of the cyclic AMP-dependent signaling pathway down regulates the induction of *c-ets-1* by TNF α .

Receptors for TNF α share no homologies with other receptors known to be coupled with GTP binding proteins (G proteins), and no G proteins have been shown to be associated with TNF receptors. Nonetheless, G proteins seemed to be involved in some of the cellular responses induced by TNF α , such as cytotoxicity against some tumor cell lines (53), or increase in endothelial cell permeability (54). To evaluate the involvement of G proteins in the TNF α signal transduction pathway(s) that leads to the induction of the *c-ets-1* gene in human foreskin fibroblasts, we used cholera toxin (CTX) and pertussis toxin (PTX). Both toxins target G proteins, such as the Gs and Gi proteins, the GTP binding proteins that respectively stimulate and inhibit the adenylyl cyclase (AC) complex (for review see (55)). CTX blocks Gs proteins in their active GTP-bound form, leading to the constitutive activation of AC and to the subsequent increase in the intracellular levels of cyclic AMP (cAMP) that results in the activation of protein kinase A (PKA). PTX uncouples Gi protein from membrane receptors, and thus prevents the receptors-directed inhibition of AC. In human fibroblasts, basal expression of *c-ets-1* mRNA was low, and appeared even undetectable in some experiments. PTX and CTX were applied individually (15 ng/ml each) or in combination with TNF α (10 ng/ml). PTX alone had no effect on basal or TNF α -induced *c-ets-1* expression (Fig. 1A), although the same preparation of PTX was active on PC12 cells (56). In contrast CTX, which was ineffective alone, reduced *c-ets-1* expression induced by TNF α (Fig. 1A). These data suggested that the activation of Gs proteins or related activities, but not Gi or Gi-like proteins, negatively interact with the TNF α signaling pathway that leads to *c-ets-1* expression.

The effects of the activation of the cAMP-dependent signaling pathway were further assessed by stimulating cells with either a cell permeable cAMP analog, dibutyryl cAMP (1 mM), or forskolin (1 μ g/ml). Forskolin activates endogenous AC that leads to the production of cAMP and the resulting activation of PKA. Neither dbcAMP nor forskolin alone increased *c-ets-1* transcripts. In contrast, they partially antagonized TNF α -induced *c-ets-1* expression (Fig. 1B). This is in agreement with the inhibitory effect of CTX on TNF α -mediated *c-ets-1* expression showed above (Fig. 1A). Altogether, these experiments demonstrated that the activation of the PKA signaling pathway inhibited *c-ets-1* expression induced by TNF α .

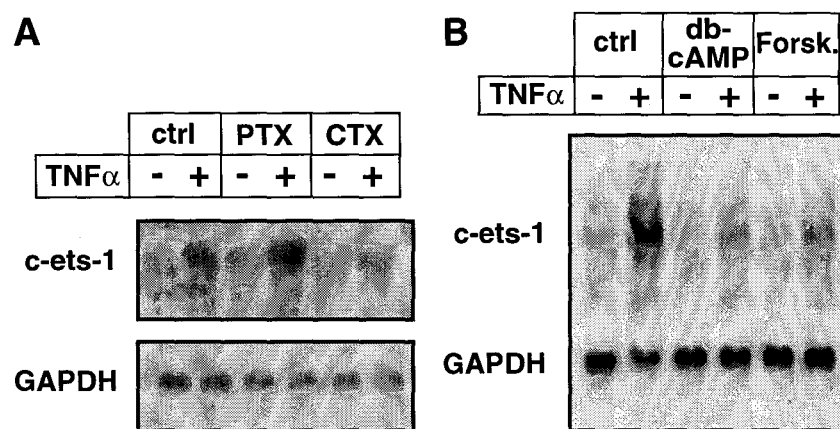


Fig. 1. Activation of the cAMP-dependent signaling pathway reduces *c-ets-1* induction by TNF α . (A) HFF were left untreated (ctrl) or were preincubated for 1 hr with 15 ng/ml pertussis toxin (PTX) or 15 ng/ml cholera toxin (CTX). Cells were then stimulated (+) or not (-) for 4 hr with 10 ng/ml TNF α . (B) HFF were left untreated (ctrl) or were stimulated for 4 hr with none (ctrl), 1 mM dibutyl cAMP (db-cAMP) or 1 μ g/ml forskolin (Forsk.) alone (-) or combined (+) with 10 ng/ml TNF α . In (A) and (B), total RNAs were extracted and *c-ets-1* and GAPDH expressions were measured by the Northern blot procedure. The sizes of *c-ets-1* transcripts were of 6.8 kb and 2.7 kb for the major and minor forms, respectively (80). The size of GAPDH transcripts was ~1.4 kb.

Serine/threonine protein kinases, but not tyrosine protein kinases, mediate TNF α -induced *c-ets-1* expression.

TNF α has been shown to increase the phosphorylation on tyrosine residues of several proteins in human fibroblasts (30, 36). Genistein, a widely used inhibitor of tyrosine kinases, was previously shown to reduce TNF α -induced plasminogen activator inhibitor-1 transcription in endothelial cells (57). Therefore genistein was assayed on fibroblasts to determine the role of tyrosine phosphorylations in *c-ets-1* induction by TNF α . The efficiency of genistein was prior tested by its ability to block various events mediated by the tyrosine kinase activity of the fibroblast growth factor (FGF) receptors in HFF. We have previously shown that FGF was able to induce collagenase-1 expression and to potentiate the induction of *c-ets-1* expression by TNF α after 19 h of stimulation (9). Fibroblasts were stimulated by 10 ng/ml bFGF or 10 ng/ml TNF α for 19 h in the presence or absence of 100 μ g/ml genistein. At this concentration, genistein prevented the stimulatory effects of bFGF on both *c-ets-1* and collagenase-1 expressions (Fig. 2A). Then, the ability of genistein to prevent or not *c-ets-1* induction by TNF α was assayed at earlier time. Fibroblasts were preincubated for 1 h in the presence or absence of 100 μ g/ml genistein, and TNF α (10 ng/ml) was then added for a 4 h-treatment. Whether genistein was present or absent, TNF α could induce *c-ets-1* expression (Fig. 2B), demonstrating that tyrosine kinases might not be involved in *c-ets-1* induction.

Since TNF α has been shown to activate multiple phosphorylations on serine and threonine residues in human fibroblasts (28), we determined here the involvement of serine/threonine protein kinases in *c-ets-1* induction by TNF α . Fibroblasts were treated with two pharmacological inhibitors that have different specificities against various serine/threonine proteine kinases: at a concentration of 100 μ M, H-7 preferentially inhibits protein kinases C (PKCs) and related activities; whereas at the same concentration, HA-1004 selectively inhibits cyclic nucleotide-dependent protein kinases such as cAMP- and cGMP-dependent protein kinases (PKA and PKG respectively) (58, 59). In the following experiments, PMA was used to test the efficiency of PKC inhibition. In fibroblasts, at the concentration of 100 μ M, H-7 completely inhibited the inductions of *c-ets-1* by either TNF α and PMA. In contrast, HA1004 did not inhibit TNF α - and PMA-mediated *c-ets-1* induction but even enhanced slightly but reproducibly the effect of TNF α (Fig. 2C). This slight enhancing effect of HA1004 was consistent with the inhibitory effects previously obtained with PKA activators (Fig. 1). These experiments demonstrated that the TNF α -mediated signaling pathway that leads to *c-ets-1* expression involved the activation of serine/threonine protein kinases different to cyclic nucleotide-dependent protein kinases (PKA and PKG). Since PMA- and TNF α -activated kinases were both inhibited by H-7, we suggested further that TNF α -activated serine/threonine protein kinases could be related to PKCs.

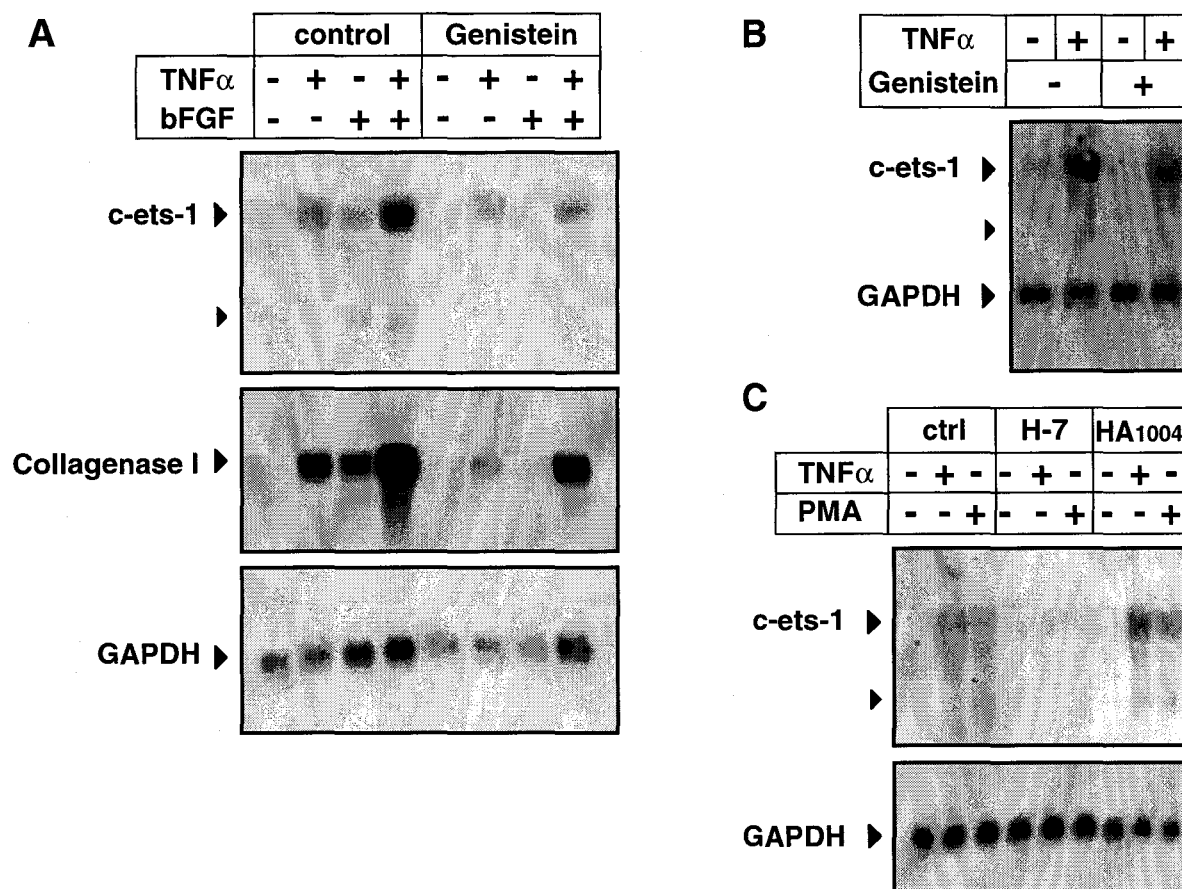


Fig. 2. Serine/threonine protein kinases, but not tyrosine protein kinases, are required for the induction of *c-ets-1* expression by TNF α . (A) Genistein inhibits bFGF receptor tyrosine kinase activity. The inhibitory effect of genistein on tyrosine protein kinases was tested by measuring its ability to prevent bFGF-induced *c-ets-1* and collagenase-1 (MMP-1) expressions occurring at delayed time. HFF were left untreated (ctrl) or were preincubated for 1 hr with 100 μ g/ml genistein. Cells were then stimulated (+) or not (-) for 19 hr with 10 ng/ml TNF α or 10 ng/ml bFGF. (B) Genistein had no effect on early *c-ets-1* induction by TNF α . HFF were left untreated (-) or were preincubated (+) for 1 hr with 100 μ g/ml genistein. Cells were then stimulated (+) or not (-) for 4 hr with 10 ng/ml TNF α . (C) H-7 but not HA1004 serine/threonine protein kinase inhibitors prevent early *c-ets-1* induction by TNF α . H-7 preferentially inhibits PKC- or related activities, whereas HA1004 preferentially inhibits PKA and PKG activities. HFF were left untreated (ctrl) or were preincubated (+) or not (-) for 1 hr with 100 μ M H-7 or 100 μ M HA1004. Cells were then stimulated (+) or not (-) for 4 hr with 10 ng/ml TNF α or 10 ng/ml PMA. In (A,B,C) total RNAs were extracted and subjected to Northern blot analysis with *c-ets-1*, collagenase-1, and/or GAPDH cDNA probes.

Diacylglycerol-dependent signaling pathways induce *c-ets-1* expression.

The different ability of PKA and PKC-dependent signaling pathways to modulate *c-ets-1* expression was further assessed by stimulating these pathways separately with second messenger agonists or activators. As shown above, the two activators for the PKA pathway, dibutyryl-cAMP (1 mM) and forskolin (1 μ g/ml), were unable to activate *c-ets-1* expression, confirming that PKA activation did not induce *c-ets-1* expression (Fig. 3). Activation of the PKC signaling pathway was carried out with PMA, bradykinin or a cell permeable DAG analog, 1,2-dioctanoyl-*rac*-glycerol (1,2-diC8) (39). Both PMA and 1,2-diC8 activate directly PKC. Bradykinin action on PKC is however indirect. It induces DAG production from both phosphatidylcholine hydrolysis (through phospholipase D/phosphatidic acid hydrolase, or through PC-PLC activities (60)) and phosphatidylinositol hydrolysis (through a phosphatidylinositol-specific phospholipase C, PI-PLC (36)). In fibroblasts, PKC activation by either PMA (10 ng/ml), bradykinin (1 μ M) or 1,2-diC8 (10 μ M or 100 μ M) led to the induction of *c-ets-1* expression (Fig. 3). Bradykinin-activated PI-PLC produces two potential second messengers, diacylglycerol (DAG) and inositol-1,4,5-trisphosphate (IP₃) from membrane phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) hydrolysis (36). Both IP₃ (through the mobilization of Ca²⁺ from internal stores) and DAG contribute to PKC activation. The contribution of IP₃ in *c-ets-1* expression by bradykinin was assayed in parallel, by incubating fibroblasts with lithium chloride as described (61). Lithium chloride (10 mM), that inhibits inositol phosphate turn over, had no effect alone and did not affect *c-ets-1* expression induced by either TNF α , bradykinin or 1,2-diC8 (data not shown). Thus DAG, but not IP₃, may be involved in the induction of *c-ets-1* expression by bradykinin. Here we showed that direct (PMA and 1,2-diC8) or indirect (bradykinin) PKC activators were able to induce *c-ets-1* expression in fibroblasts. Thus, *c-ets-1* expression in fibroblasts can be induced through a signaling pathway that involves DAG/phorbol ester-sensitive PKCs.

PKC isoforms sensitive to PMA are not involved in *c-ets-1* induction by TNF α .

Next we investigated whether the inductions by TNF α and PMA implicated the same protein kinases by using inhibitors presenting different specificities and selectivities for PKCs. Chelerythrine chloride (200 nM) (62), calphostin C (100 nM) (59), staurosporine (150 nM) (63-65) and a PKC substrate-derived synthetic peptide named myristoylated PKC peptide inhibitor (PKCpi, 10 μ M) (66) were applied onto cells prior to (for 1 h) and during the stimulation with PMA (10 ng/ml) or TNF α (10 ng/ml) (Fig. 4A). PMA action was reduced by chelerythrine chloride and myristoylated PKC peptide inhibitor, and was completely inhibited by calphostin C and staurosporine, confirming their inhibitory effect on PKCs. TNF α -mediated induction of *c-ets-1* was prevented by

Fig. 3. PKC-activation induces *c-ets-1* expression. HFF were stimulated for 4 hr with 10 ng/ml TNF α , 1 mM dibutyl cAMP (db cAMP), 1 μ g/ml forskoline (Forsk.), 10 ng/ml PMA, 1 μ M bradykinin (Brad.), 10 μ M (x1) or 100 μ M (x10) 1,2-dioctanoyl-rac-glycerol (1,2-diC8). Total RNAs were extracted and *c-ets-1* and GAPDH expressions were measured by the Northern blot procedure.

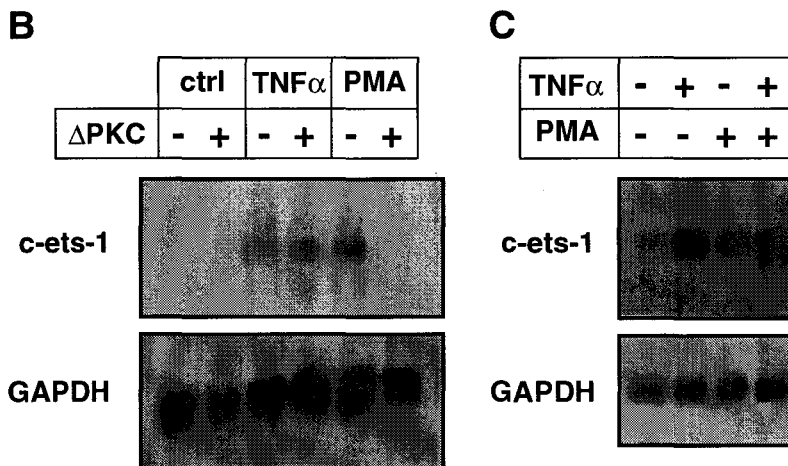
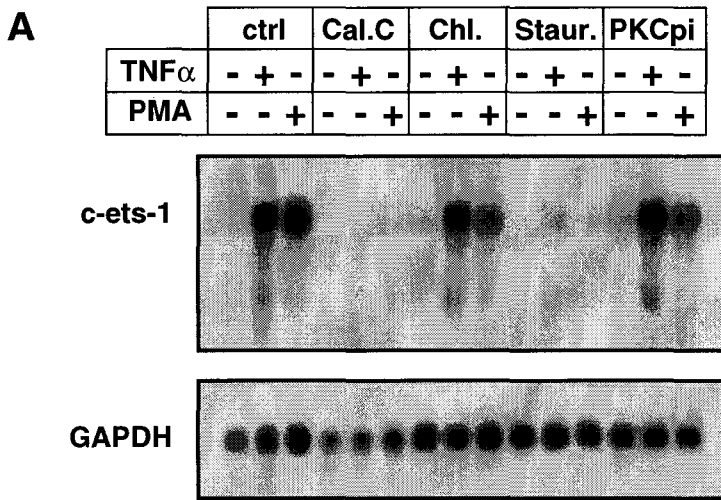
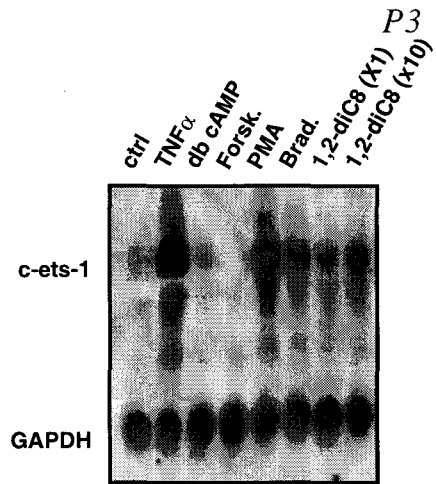


Fig. 4. PKC isoforms sensitive to PMA are not involved in *c-ets-1* induction by TNF α . (A) HFF were left untreated (-) or were preincubated for 1 hr with various PKC inhibitors: 200 nM chelerythrine chloride (Chl), 100 nM calphostin C (Cal.C), 150 nM staurosporine (Staur.) or 150 nM myristoylated PKC peptide inhibitor (PKCpi). Cells were then stimulated (+) or not (-) for 4 hr with 10 ng/ml TNF α or 10 ng/ml PMA. (B) HFF were depleted (Δ PKC +) or not (Δ PKC -) from PKC activity by a 24 hr-exposure with 150 ng/ml PMA. Cells were washed twice and fresh medium was then replaced for a 4 hr-stimulation with 10 ng/ml TNF α or 10 ng/ml PMA. (C) HFF were stimulated for 4 hr with 10 ng/ml TNF α and/or 10 ng/ml PMA. In (A,B,C), total RNAs were extracted and *c-ets-1* and GAPDH expressions were measured by the Northern blot procedure.

calphostin C, strongly reduced by staurosporine, but unaffected by chelerythrine chloride or myristoylated PKC peptide inhibitor. With the concentrations used in this experiment for chelerythrine chloride and myristoylated PKC peptide inhibitor, PMA action was not completely inhibited; however these inhibitors kept some selectivity for PKCs and allowed the distinction between TNF α - and PMA-activated protein kinases, which appeared to be differently inhibited. Thus, the serine/threonine protein kinases activated by TNF α that mediate *c-ets-1* expression may be different from PMA-activated PKC isoforms.

To provide further evidence that TNF α can induce *c-ets-1* expression by a mechanism independent of PKC isoforms sensitive to PMA, we used a procedure of PKC down-regulation by exposing cells to a high concentration of phorbol ester (63). When fibroblasts were incubated with 150 ng/ml PMA for 24 h, a further stimulation with 10 ng/ml PMA for 4 h could not induce *c-ets-1* expression (Fig. 4B). By contrast, a similar cell depletion from PKC activity could not prevent nor reduce *c-ets-1* induction by 10 ng/ml TNF α (Fig. 4B). Cell integrity seemed maintained after such a treatment since TNF α receptors remained able to mediate *c-ets-1* induction. Thus, TNF α induced *c-ets-1* expression independently of PKC isoforms sensitive to PMA. Moreover, both TNF α and PMA induced *c-ets-1* expression and their actions were additive (Fig. 4C). Therefore *c-ets-1* inductions by either TNF α or PMA appeared independent and acting through different signal transduction pathways converging on the *c-ets-1* gene.

Activation of the sphingomyelin pathway induces *c-ets-1* expression.

Increasing number of reports demonstrate the involvement of the sphingomyelin pathway in many of TNF α cell responses such as NF- κ B activation (67), *c-jun* expression (32) or apoptosis (34). This pathway was activated by incubating HFF with bacterial sphingomyelinase (SMase), ceramide analogs, or sphingosine. SMase generates ceramide from sphingomyelin hydrolysis (27), whereas C2- and C8-ceramide, two cell-permeable short strained ceramide analogs, are supposed to mimic the effects of natural endogenous ceramide. The effect of sphingosine was investigated since it may be rapidly produced from ceramide deacetylation in fibroblasts and could mediate some of ceramide effects (for review see (68)). In human fibroblasts, either bacterial sphingomyelinase, C2- and C8-ceramides, or sphingosine induced *c-ets-1* mRNA expression (Fig. 5). SMase slightly increased *c-ets-1* expression in a dose-dependent manner, with a maximal 2 fold induction obtained with 0.5 U/ml (Fig. 5 and data not shown). C2-ceramide was more efficient than C8-ceramide, with a maximal *c-ets-1* induction of 3 and 1.5 fold obtained with 50 μ M C2- or 10 μ M C8-ceramides, respectively (Fig. 5 and data not shown). Induction of *c-ets-1* expression was lower with higher concentrations of C2- and C8-ceramides. Sphingosine was more efficient than C2- or C8-ceramide for *c-ets-1* induction, with a 3 to 5-fold induction obtained from 1 to 50 μ M (Fig. 5 and data not shown). At 100 μ M, sphingosine

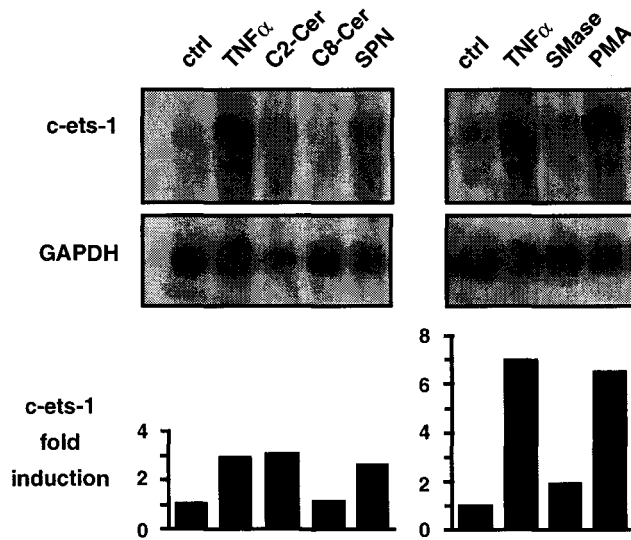


Fig. 5. Activation of the sphingomyelin pathway induces *c-ets-1* expression. HFF were left untreated (ctrl) or were stimulated for 4 hr with with 10 ng/ml TNF α , 50 μ M C2-ceramide (C2-Cer), 50 μ M C8-ceramide (C8-Cer), 50 μ M sphingosine (SPN), or 0.5 U/ml sphingomyelinase (SMase). Total RNAs were extracted and *c-ets-1* and GAPDH expressions were measured by the Northern blot procedure. The corresponding quantification with the PhosphorImager is presented below.

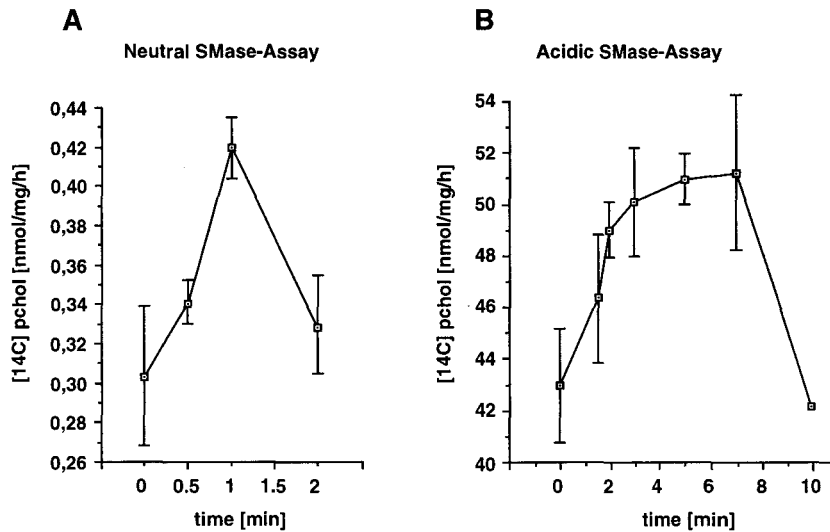


Fig. 6. TNF α induces activation of neutral and acidic SMases in HFF cells. HFF were stimulated with TNF α (100 ng/ml) for the indicated periods of time. Nuclei-free lysates were prepared and assayed for SMase activity at pH 5.0 (A) or at pH 7.4 (B), using two different buffer systems as described (51), with [14C]SM as a substrate. Basal neutral SMase activity corresponded to production of 0.3 pmol of phosphorylcholine per mg of protein per hr (A); basal acidic SMase activity corresponded to production of 43 pmol of radioactive phosphorylcholine per mg of protein per hr (B). These results are representative for 4 independent experiments; the bars indicate the respective standard deviations.

was cytotoxic on fibroblasts. Thus, activation of the sphingomyelin pathway induced the *c-ets-1* proto-oncogene expression, and maximal effects were obtained with sphingosine rather than ceramides themselves.

TNF α activates neutral and acidic SMases in HFF.

The binding of TNF α to TNF-R55 may activate independently two distinct sphingomyelin pathways which involve distinct SMases (44), a neutral SMase in the plasma membrane and an acidic SMase present in endo/lysosomes. In HFF, both neutral and acidic SMases activities were transiently increased upon TNF α stimulation (Fig. 6A and 6B, respectively). However, the basal activity of acidic SMase (43 nmol/mg protein/h) was 140-fold higher than that of neutral SMase (0.3 nmol/mg protein/h), and the effect of TNF α -stimulation on acidic SMase (8.47 nmol calculated ceramide produced/mg protein/h after 5 min. of stimulation) was 70-fold higher than that on neutral SMase (0.12 nmol calculated ceramide produced/mg protein/h after 1 min. of stimulation). The activation of SMases in HFF cells was paralleled by a transient increase in ceramide, peaking at 3-7 min with 120% of control, as estimated by charring densitometry of TLC (data not shown). We thus may conclude, that TNF α activates the sphingomyelin pathway in HFF cells. In concert with the ability of synthetic ceramides and exogenous SMases to mimic TNF α -induced *c-ets-1* expression, our findings suggest that activation of the sphingomyelin pathway is an early event in TNF α signaling for *c-ets-1* expression.

Arachidonic acid inhibits TNF α -induced *c-ets-1* expression.

Another signaling pathway could mediate some of the cellular responses to TNF α , including its proinflammatory effects. This pathway involves the activation a cytosolic phospholipase A₂ (PLA₂) which generates arachidonic acid (AA) from phosphatidylcholine hydrolysis. This pathway was also shown to mediate the expression of the *c-fos* gene induced by TNF α (69). In HFF, the arachidonic acid-dependent pathway was activated by incubating cells with exogenous AA or PLA₂. No effect on basal *c-ets-1* expression was detectable with either AA (50 μ M) or PLA₂ (0.5 U/ml) (Fig. 7). However, quantification with a PhosphorImager shows that both AA and PLA₂ reduced TNF α -induced *c-ets-1* expression by approximately 50% (Fig.7). Thus, arachidonic acid or some of its metabolites negatively interfered with TNF α signaling pathway involved in *c-ets-1* transcriptional activation. This suggested further that the two TNF α -early-response genes, *c-ets-1* and *c-fos*, were activated through different signaling pathways. Moreover, AA and PLA₂ also reduced *c-ets-1* expression induced by C8-ceramide or SMase (Fig. 7). Since AA and PLA₂ reduce *c-ets-1* induction by either TNF α or ceramide, this suggested that the sphingomyelin pathway mediates TNF α induction of *c-ets-1* expression.

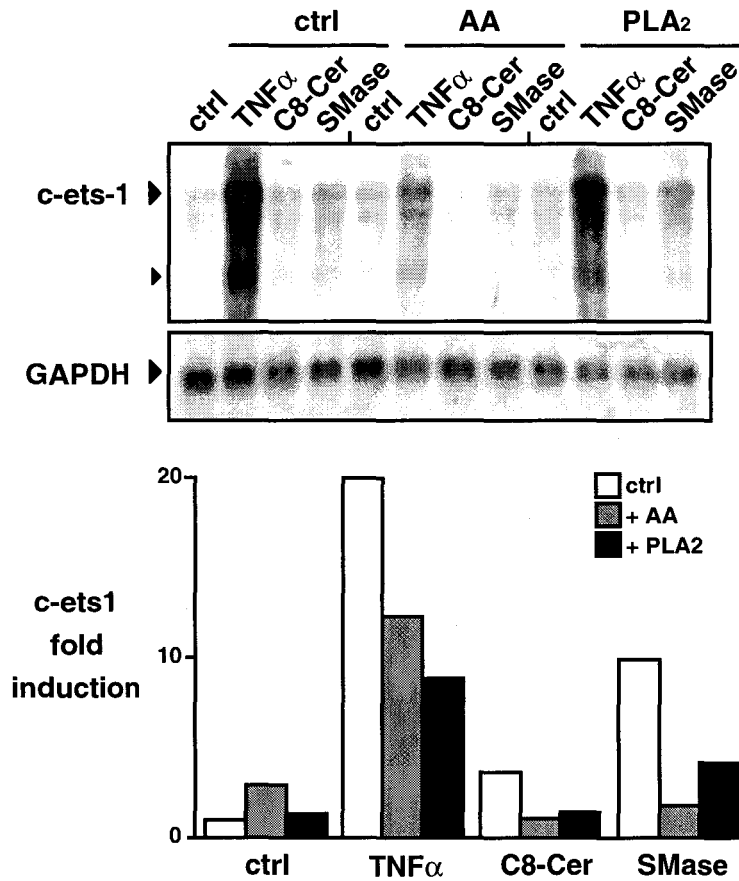


Fig. 7. Arachidonic acid inhibits the induction of *c-ets-1* expression by TNF α , C8-ceramide and SMase. HFF were left untreated (-) or were preincubated (+) for 1 hr with 50 μ M arachidonic acid (AA) or 0,5 U/ml phospholipase A2 (PLA2). Cells were then stimulated or not for 4 hr with 10 ng/ml TNF α , 1 μ M C8-ceramide or 0.1 U/ml SMase. Total RNAs were extracted and *c-ets-1* and GAPDH expressions were measured by the Northern blot procedure. The corresponding quantification with the PhosphorImager is presented below.

Okadaic acid mimics TNF α in inducing *c-ets-1* expression.

Another important player in TNF α signaling is the ceramide-activated protein phosphatase (CAPP), which are heterotrimeric isoforms of PP_{2A}, and low concentrations of okadaic acid are known to inhibit specifically its activity (38, 42, 43). Hannun *et al.* report that PP_{2A} is activated by TNF α and ceramide (42), and mediates TNF α -induced *c-myc* down regulation, inhibition of cellular proliferation, and apoptosis in HL-60 promyelocytic leukemia cells (43). In contrast, Guy *et al.* suggest that in fibroblasts, protein phosphorylations induced by TNF α result from either protein kinases activation and PP_{2A} inactivation (38). In HFF, okadaic acid treatment increased *c-ets-1* expression (Fig.9), and this effect was additive with that of TNF α . Since okadaic acid had no inhibitory effect on *c-ets-1* expression induced by TNF α , CAPP activation was not required for TNF α action. On the other hand, CAPP inactivation increased *c-ets-1* expression, and okadaic acid and TNF α effects were additive. This suggested that their actions occurred through distinct and independent signaling pathways.

Osmotic stress and anisomycin induce *c-ets-1* expression.

Recently, ceramide has been shown to mediate the activation of the stress-activated protein kinases (or JNKs) by TNF α (32) in HL-60 cell lines (33). JNKs are common targets for proinflammatory cytokines like TNF α and for various stresses (protein synthesis inhibitors, osmotic stress, heat shock or UV radiation) (for review see (70)). In particular, the protein synthesis inhibitor anisomycin selectively activates JNKs compared to ERKs, independently of its inhibitory effect on protein synthesis (71). In human fibroblasts, either osmotic stress with D-sorbitol, and anisomycin induced *c-ets-1* expression (Fig. 10). Under osmotic stress, a maximal 2-fold induction was obtained with 300 mM D-sorbitol, higher concentrations being cytotoxic. Anisomycin was more efficient with a 7-fold *c-ets-1* induction at 10 μ M. However, lower concentrations were also effective (2,5 or 5 fold induction at 0.1 or 1, μ M, respectively). Altogether, these data show that *c-ets-1* is a new stress-responsive gene, and suggest that the stress-activated protein kinases cascade mediates both ceramide- and stress-induced *c-ets-1* expression in fibroblasts.

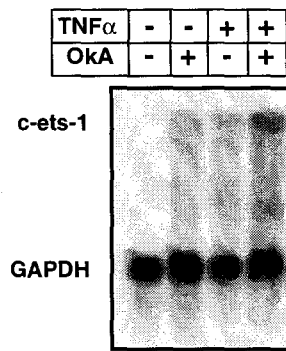


Fig. 8. Inactivation of serine/threonine protein phosphatases by okadaic acid induces *c-ets-1* expression. HFF were left untreated (-) or were preincubated (+) for 1 hr with 200 nM okadaic acid (OkA). Cells were then stimulated for 4 hr with 10 ng/ml TNF α . Total RNAs were extracted and *c-ets-1* and GAPDH expressions were measured by the Northern blot procedure.

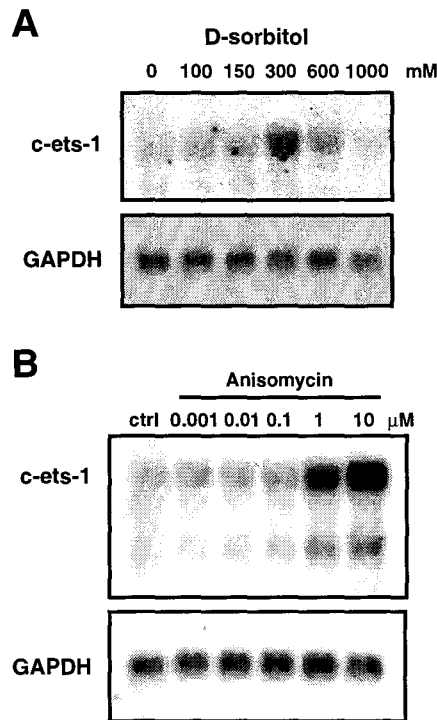


Fig. 9. Various stresses induce *c-ets-1* expression. (A) Osmotic stress induces *c-ets-1* expression. HFF were treated for 4 hr with 100 to 1000 mM D-sorbitol, or were left untreated (0). (B) HFF were left untreated (ctrl), were treated with 0.001 to 10 μ g/ml anisomycin for 4hr. In (A) and (B), total RNAs were extracted and *c-ets-1* and GAPDH expressions were measured by the Northern blot procedure.

DISCUSSION

We have investigated in this paper which of the signaling pathways activated by TNF α could mediate *c-ets-1* induction in human foreskin fibroblasts. The involvement of G proteins in TNF α signaling pathway is controversial. It has been reported that TNF α increases GTP binding and GTPase activity (53), and that TNF α cytotoxicity against some transformed cells involves PTX-sensitive G proteins (53, 72, 73). In our experiments, PTX had no effect on TNF α -mediated *c-ets-1* expression. These data may be related to the fact that TNF α appeared neither cytostatic nor cytotoxic on normal primary fibroblasts used in these experiments. Thus, the above mentioned PTX-sensitive G proteins are not involved in *c-ets-1* induction in HFF, and may account for other intracellular TNF α -responses or may not be active in HFF. By contrast with PTX, CTX decreased TNF α action, suggesting that activation of CTX-sensitive Gs or Gs-like proteins and the subsequent PKA activation would reduce TNF α induction of *c-ets-1* expression.

Several arguments suggest that PKA is not involved in *c-ets-1* induction by TNF α , because (i) two PKA activators, dibutyryl cyclic AMP and forskolin, were ineffective in inducing *c-ets-1* expression, and (ii) the PKA inhibitor HA1004 did not block *c-ets-1* activation by TNF α . In contrast, PKA activation reduced TNF α -induced *c-ets-1* expression, and HA1004 even slightly enhanced TNF α stimulatory effect. These results are in agreement with the partial inhibitory effect of CTX on TNF α -induced *c-ets-1* expression. However, the slight effect of HA1004 on TNF α action suggests that Gs or Gs-like proteins or PKA activities are low in HFF stimulated with TNF α . These data demonstrate further that G proteins and PKA are not involved in TNF α signaling mediating *c-ets-1* expression, and that cAMP-dependent signaling pathway down regulates the *c-ets-1* gene expression.

PKCs were prime candidates for the mediation of *c-ets-1* activation by TNF α since PMA, a PKC activator, induced *c-ets-1* (11, 18), and since TNF α may activate PKCs (29, 74). Consistent with this hypothesis, other PKC activators (bradykinin or the DAG analog 1,2-diC8) induced *c-ets-1* expression in HFF. However, we report now that neither inactivation of PKCs by various PKC-specific inhibitors (chelerythrin chloride and myristoylated PKC peptide inhibitor) nor down-regulation of PKC activity by long-term exposure to high-doses of PMA interferes with TNF α induction of *c-ets-1* expression. Moreover, TNF α and PMA used at supra-optimal concentrations have additive effects on *c-ets-1* expression, which suggests that they activate distinct and unrelated signaling pathways. Although PKCs have long been considered as targets for phorbol esters, the discovery of atypical PKCs requires the distinction between PKCs isoforms sensitive or not to PMA. Indeed, based on their structure and properties, PKC family members are classified into three groups (75): conventional PKCs (cPKCs: α , β I, β II and γ isotypes),

novel PKCs (nPKCs: δ , ϵ , ζ , η (L), θ and μ), and atypical PKCs (aPKCs: ζ and λ isoforms). Only conventional and novel PKCs are sensitive to DAG or phorbol esters, and may be down regulated by a long term exposure with high doses of PMA. Moreover, only PKC ζ has been clearly identified in TNF α signaling. Therefore, we demonstrate here that PKC isoforms sensitive to PMA are not required for TNF α -mediated *c-ets-1* induction, and that a distinct signaling pathway involving PMA-sensitive PKCs exists in HFF which may be activated by other stimuli than TNF α .

Altogether these data show that TNF α induction of *c-ets-1* expression requires the activation of serine/threonine protein kinases distinct to PKA and to PMA-sensitive PKC isoforms, and which can be inhibited by H-7, calphostin C or staurosporine. Most of the other TNF α -responsive serine/threonine protein kinases (including CAPK, ERKs, JNKs, PKC ζ) are activated subsequently to the TNF α -induced sphingomyelin breakdown and the resulting generation of the second messenger ceramide. We show now that activation of the sphingomyelin pathway by exogenous SMase or ceramide analogs induces *c-ets-1* expression. However, two independent TNF α -activated sphingomyelin pathways may exist and involve different SMases, and indeed we show that TNF α in HFF induced both acidic and neutral SMase activities. Although we could not yet discriminate between the involvement of neutral or acidic SMase, the existence of a very active acidic SMase in HFF cells, and the induction of *c-ets-1* by diacylglycerol argue for the involvement of acidic rather than neutral SMase in *c-ets-1* induction. The ceramide-levels in HFF cells were rather low as compared to lymphocytes (own observation), suggesting a rapid turn-over of ceramide in this cell-type. Indeed, a more potent induction was obtained with sphingosine rather than with ceramide analogs, which suggests that TNF α induction of *c-ets-1* expression may require the conversion of ceramide into sphingosine in HFF. This is in agreement with the fact that sphingosine is at least as efficient as ceramide in activating either CAPK (35) or PKC ζ (50), two kinases which may be activated downstream neutral or acidic SMases, respectively. It has been shown that sphingosine which activates *c-ets-1* expression, also behaves as a PKC inhibitor. This result, which contrasts with the activation of *c-ets-1* expression by PKC activators (PMA, DAG), can be explained by the ability of sphingosine to activate transduction signals independently of PKC inhibition (68), or by different PKC isoforms targeted by PMA/DAG and sphingosine. Further research requiring the preparation of isotype-specific PKC inhibitors will investigate the role of the different PKC isoforms and especially, that of PKC ζ , one mediator of TNF α cellular responses.

Furthermore, exogenous PLA₂ or AA reduced *c-ets-1* induction by either TNF α , SMase or C8-ceramide in HFF. Thus, PLA₂ and AA appear common inhibitors for *c-ets-1* induction by both TNF α and activators for the sphingomyelin pathway. This supports the hypothesis that the sphingomyelin pathway mediates TNF α induction of *c-ets-1*

expression. Our data suggest further that in HFF, PLA₂ activation would be downstream the MAP kinase cascade (26, 44) rather than upstream nSMase activation (48).

We showed also that okadaic acid did not inhibit TNF α action, demonstrating that ceramide-activated protein phosphatase (or PP_{2A}) which is sensitive to okadaic acid, was not required for *c-ets-1* induction by TNF α in HFF cells. Moreover, PP_{2A} protein phosphatases are known for their inhibitory action on ERKs and MEKs (ERK kinases) (76) which are involved in the MAP kinase cascade (76). Conversely, PP_{2A} inactivation with okadaic acid may mimic MAP kinases activation. We showed that okadaic acid alone induced *c-ets-1* expression and this effect was additive with that of TNF α . This suggests that induction of *c-ets-1* expression by okadaic acid and by TNF α may be independent and through distinct pathways. It is likely that growth factors (bFGF, EGF and PDGF) (9), DAG/PMA-sensitive PKCs, or okadaic acid all induce *c-ets-1* expression through the MAP kinase pathway. TNF α may also activate the MAP kinase cascade through the activation of neutral SMase and CAPK (46). However, the related SAPK cascade is a more efficient target for TNF α , since JNKs rather than ERKs are preferentially activated by TNF α (71). JNKs are common intracellular targets for TNF α and various stresses (heat-shock, UV, osmotic stress, or some protein synthesis inhibitors). Indeed, our data showed that either osmotic stress or anisomycin were able to induce *c-ets-1* expression in HFF. Both anisomycin and cycloheximide activate JNKs independently of their inhibitory effect on protein synthesis, and both induce *c-ets-1* expression (these data and (9)). Altogether, these findings suggest that JNKs are the downstream mediators in the TNF α signaling that leads to the induction of *c-ets-1* expression. Either ERKs and JNKs activate the same transcription factors, Elk-1, ATF2 and c-Jun, which may be responsible for *c-ets-1* promoter activation. Indeed, functional studies on the *c-ets-1* promoter have revealed an important positive regulatory region that encompasses Ets/PEA3 and AP-1 consensus sequences (77, 78). Moreover, Elk-1 (a member of the Ets family), and c-Jun (a major component of the AP-1 complex) have been shown to be activated by TNF α through both ERK- or JNK-dependent kinase cascades (32, 79, 80). Thus, we suggest that such transcription factors may regulate *c-ets-1* expression induced by TNF α . Remains to be determined which members of the Ets and Jun/Fos families are involved in TNF α -induced *c-ets-1* expression. Altogether these data suggest that *c-ets-1* is a common responsive gene for both stress- and mitogen-activated signaling pathways, and this may explain the different abilities for cytokines (TNF α and IL-1 α) and growth factors (bFGF, EGF and PDGF) to induce *c-ets-1* expression in human fibroblasts (9). In conclusion, we dissociated the first steps in TNF α signaling pathway that induces the *c-ets-1* proto-oncogene expression in cultured normal human foreskin fibroblasts. We have previously demonstrated that *c-ets-1* was a new TNF α -responsive gene, and we suggest now that *c-ets-1* transcriptional activation is mediated by the sphingomyelin pathway and the resulting

recruitment of JNKs. However, the cAMP- and the arachidonic acid-dependent signaling pathways down regulate the *c-ets-1* gene expression, whereas the PMA-sensitive PKC-dependent signaling pathway suggests another route for the activation of *c-ets-1* expression. Together, our results pave the way for understanding Ets-1 biological functions related to TNF α biological activities, such as a possible Ets-1 mediation in the role of TNF α in tumor growth and metastasis (81).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr Thomas Jones (Lederle laboratories, Pearl River, NY) for generously providing us human foreskin fibroblasts. We are very grateful to Drs. Corine Glineur and Rudi Beyaert for helpful discussions, and Drs. Hubert Hondermark and Simon Saule for critical reading of the manuscript. We thank Daniel Lazarecki for his excellent photographic assistance.

FOOTNOTES :

1. This work was supported by grants from Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC), GEFLUC, and Institut Pasteur de Lille. F.G. is a recipient of a fellowship from ARC.

2. Abbreviations used in this paper: AA, arachidonic acid; AC, adenylyl cyclase; bFGF, basic Fibroblast Growth Factor; C2-cer, N-acetyl-D-*erythro*-sphingosine; C8-cer, N-octanoyl-sphingosine; dbcAMP, dibutyryl cyclic adenosine monophosphate; Forsk., forskolin; PKA, cAMP-dependent protein kinase; H-7, 1-(5-isoquinolinylsulfonyl)-2-methylpiperazine dihydrochloride; HA1004, N-(2-guanidinoethyl)-5-isoquinolinesulfonamide dihydrochloride; PC-PLC, phosphatidylcholine-specific phospholipase C; PI-PLC, phosphatidylinositol-specific phospholipase C; PKC, protein kinase C; PLA2, phospholipase A2; PMA, phorbol 12-myristate, 13-acetate; SM, sphingomyelin; SMase, sphingomyelinase; SPN, sphingosine; TNF α , Tumor Necrosis Factor-alpha; TNF-R, tumor necrosis factor receptor.

REFERENCES

1. Degnan, B. M., Degnan, S. M., Naganuma, T., and Morse, D. E., (1993) *Nucleic Acids Res.* **21**, 3479-3484
2. Laudet, V., Niel, C., Duterquecoquillaud, M., Leprince, D., and Stehelin, D., (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **190**, 8-14
3. Lautenberger, J. A., Burdett, L. A., Gunnell, M. A., Qi, S., Watson, D. K., O'Brien, S. J., and Papas, T. S., (1992) *Oncogene* **7**, 1713-1719
4. MacLeod, K., Leprince, D., and Stehelin, D., (1992) *TIBS* **17**, 251-256
5. Seth, A., Ascione, R., Fisher, R. J., Mavrothalassitis, G. J., Bhat, N. K., and Papas, T. S., (1992) *Cell Growth & Differ.* **3**, 327-334
6. Wasylyk, B., Hahn, S. L., and Giovane, A., (1993) *Eur. J. Biochem.* **277**, 7-18
7. Janknecht, R., and Nordheim, A., (1993) *Biochim. Biophys. Acta* **1155**, 346-356
8. Crepieux, P., Coll, J., and Stehelin, D., (1994) *submitted*,
9. Gilles, F., Raes, M.-B., Stehelin, D., Vandenbunder, B., and Fafeur, V., (1996) *Exp. Cell Res.* **222**, 370-378
10. Kramer, B., Wiegmann, K., and Krönke, M., (1995) *J Biol Chem* **270**, 6577-6583
11. Wernert, N., Gilles, F., Fafeur, V., Bouali, F., Raes, M. B., Pyke, C., Dupressoir, T., Seitz, G., Vandenbunder, B., and Stéhelin, D., (1994) *Cancer Res.* **54**, 5683-5688
12. Bolon, I., Gouyer, V., Devouassoux, M., Vandenbunder, B., Wernert, N., Moro, D., Brambilla, C., and Brambilla, E., (1995) *AM J Pathol* **147**, 1298-1310
13. Takeyama, H., Wakamya, N., O'Hara, C., Arthur, K., Niloff, J., Kufe, D., Sakarai, K., and Spriggs, D., (1991) *Cancer Res.* **51**, 4476-4480
14. Beissert, S., Bergholz, M., Waase, I., Lepsien, G., Schauer, A., Pfizenmaier, K., and Krönke, M., (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 5064-5068.
15. Naylor, M. S., Stamp, G. W. H., and Balkwill, F. R., (1990) *Cancer Res.* **50**, 4436-4440
16. Miles, D. W., Happerfield, L. C., Naylor, M. S., Bobrow, L. G., Rubens, R. D., and Balkwill, F. R., (1994) *Int. J. Cancer* **56**, 777-782
17. Naylor, M. S., Stamp, G. W. H., Foulkes, W. D., Eccles, D., and Balkwill, F. R., (1993) *J. Clin. Invest.* **91**, 2194-2206
18. Wernert, N., Raes, M. B., Lassalle, P., Dehouck, M. P., Gosselin, B., Vandenbunder, B., and Stéhelin, D., (1992) *Am. J. Pathol.* **140**, 119-127
19. Wiegmann, K., Schütze, S., Kampen, E., Himmler, A., Machleidt, T., and Krönke, M., (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 17997-18001
20. Zhang, Y., Lin, J. X., Yip, Y. K., and Vilcek, J., (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 6802-6805
21. Godfrey, R. W., Johnson, W. J., and Hoffstein, S. T., (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **142**, 235-241
22. Clarck, M. A., Chen, M. J., Crooke, S. T., and Bomalaski, J. S., (1988) *Biochem. J.* **250**, 125-132
23. Schütze, S., Berkovic, D., Tomsing, O., Unger, C., and Krönke, M., (1991) *J. Exp. Med.* **174**, 975-988
24. Kim, M.-Y., Linardic, C., Obeid, L., and Hannun, Y. A., (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 484-489
25. Dbaibo, G. S., Obeid, L. M., and Hannun, Y. A., (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 17762-17766
26. Kolesnick, R., and Golde, D. W., (1994) *Cell* **77**, 325-328
27. Yang, Z., Costanzo, M., Golde, D. W., and Kolesnick, R. N., (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 20520-20523
28. Kaur, P., and Saklatvala, J., (1988) *FEBS Lett.* **241**, 6-10
29. Brenner, D. A., O'Hara, M., Angel, P., Chojkier, M., and Karin, M. L., (1989) *Nature* **337**, 661-663
30. Vietor, I., Schwenger, P., Li, W., Schlessinger, J., and Vilcek, J., (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 18994-18999
31. Heller, R. A., and Krönke, M., (1994) *J. Cell. Biol.* **126**, 5-9
32. Sluss, H. K., Barrett, T., Derijard, B., and Davis, R. J., (1994) *Mol. Cell. Biol.* **14**, 8376-8384
33. Westwick, J. K., Bielawska, A. E., Dbaibo, G., Hannun, Y. A., and Brenner, D. A., (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 22689-22692
34. Verheij, M., Bose, R., Lin, X. H., Yao, B., Jarvis, W. D., Grant, S., Birrer, M. J., Szabo, E., Zon, L. I., Kyriakis, J. M., Haimovitzfriedman, A., Fuks, Z., and Kolesnick, R. N., (1996) *Nature* **380**, 75-79
35. Mathias, S., Dressler, K. A., and Kolesnick, R. N., (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 10009-10013

36. Guy, G. R., Chua, S. P., Wong, N. S., Ng, S. B., and Tan, Y. H., (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 14343-14352
37. Guy, G. R., Cao, X., Chua, S. P., and Tan, Y. H., (1992) *J Biol Chem* **267**, 1846-1852
38. Guy, G. R., Philip, R., and Tan, Y. H., (1995) *Eur. J. Biochem.* **229**, 503-511
39. Schütze, S., Potthoff, K., Machleidt, T., Berkovic, D., Wiegmann, K., and Krönke, M., (1992) *Cell* **71**, 765-776
40. Dressler, K. A., Mathias, S., and Kolesnick, R. N., (1992) *Science* **255**, 1715-1718
41. Liu, J., Mathias, S., Yang, Z., and Kolesnick, R., (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 3047-3052
42. Dobrowsky, R. T., Kamibayashi, C., Mumby, M. C., and Hannun, Y. A., (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 15523-15530
43. Wolff, R. A., Dobrowsky, R. T., Bielawska, A., Obeid, L. M., and Hannun, Y. A., (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 19605-19609
44. Wiegmann, K., Schütze, S., Machleidt, T., Witte, D., and Krönke, M., (1994) *Cell* **78**, 1005-1015
45. Schütze, S., Machleidt, T., and Krönke, M., (1994) *J. Leukocyte Biol.* **56**, 533-541
46. Yao, B., Zhang, Y., Delikat, S., Mathias, S., Basu, S., and Kolesnick, R., (1995) *Nature* **378**, 307-310
47. Westwick, J. K., Weitzel, C., Minden, A., Karin, M., and Brenner, D. A., (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 26396-26401
48. Jayadev, S., Linardic, C. M., and Hannun, Y. A., (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 5757-5763
49. Gomez-Munoz, A., Wagonner, D. W., O'Brien, L., and Brindley, D. N., (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 26318-26325
50. Muller, G., Ayoub, M., Storz, P., Rennecke, J., Fabbro, D., and Pfizenmaier, K., (1995) *EMBO J.* **14**, 1961-1969
51. Vandenbunder, B., Pardanaud, L., Jaffredo, T., Mirabel, M. A., and Stehelin, D., (1989) *Development* **107**, 265-274
52. Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., Mac Donald, R. J., and Rutter, W. J., (1979) *Biochemistry* **18**, 5294-5299
53. Imamura, K., Sherman, M. L., Spriggs, D., and Kufe, D., (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 10247-10253
54. Brett, J., Gerlach, H., Nawroth, P., Steinberg, S., Godman, G., and Stern, D., (1989) *J. Exp. Med.* **169**, 1977-1991
55. Birnbaumer, L., and Brown, A. M., (1990) *Am. Rev. Respir. Dis.* **141**, S106-S114
56. Glineur, C., and Locht, C., (1994) *Infection and Immunity* **62**, 4176-4185
57. Vanhinsbergh, V. W. M., Vermeer, M., Koolwijk, P., Grimbergen, J., and Kooistra, T., (1994) *Blood* **84**, 2984-2991
58. Woods, K. M., and Chapes, S. K., (1994) *Exp. Cell. Res.* **211**, 171-174
59. Norris, J. G., Tang, L. P., Sparacio, S. M., and Benveniste, E. N., (1994) *J. Immunol.* **152**, 841-850
60. Van Blitterswijk, W. J., Hilkmann, H., De Widt, J., and Van der Bend, R. L., (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 10344-10350
61. Beyaert, R., Heynincx, K., Boeykens, F., Van Roy, F., and Fiers, W., (1993) *J Immunol* **151**, 291-300
62. Prabhakar, U., Lipshutz, D., Pullen, M., Turchin, H., Kassis, S., and Nambi, P., (1993) *Eur. Cytokine Netw.* **4**, 31-37
63. Meichle, A., Schütze, S., Hensel, G., Brunsing, D., and Krönke, M., (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 8339-8343
64. Hohmann, H.-P., Remy, R., Scheidereit, C., and Vanloon, A. P., (1991) *Mol. Cell. Biol.* **11**, 259-266
65. Hohmann, H. P., Remy, R., Aigner, L., Brockhaus, M., and Vanloon, A. P. G. M., (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 2065-2072
66. Eichholtz, T., deBont, D. B. A., deVid, J., Liskamp, R. M. J., and Ploegh, H. L., (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 1982-1986
67. Lozano, J., Berra, E., Municio, M. M., Diaz-Meco, M. T., Dominguez, I., Sanz, L., and Moscat, J., (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 19200-19202
68. Hannun, Y. A., and Linardic, C. M., (1993) *Biochim. Biophys. Acta* **1154**, 223-236
69. Haliday, E. M., Ramesha, C. S., and Ringold, G., (1991) *EMBO J.* **10**, 109-115
70. Waskiewicz, A. J., and Cooper, J. A., (1995) *Curr. Biol.* **7**, 798-805
71. Cano, E., Hazzalin, C. A., and Mahadevan, L. C., (1994) *14* ,
72. Hepburn, A., Boeynaems, J. M., Fiers, W., and Dumont, J. E., (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **149**, 815-822

73. Suffys, P., Beyaert, R., Van Roy, F., and Fiers, W., (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **149**, 735-743
74. Schütze, S., Nottrott, S., Pfizenmaier, K., and Krönke, M., (1990) *J. Immunol.* **144**, 2604-2608
75. Buchner, K., (1995) *Eur. J. Biochem.* **228**, 211-221
76. Hunter, T., (1995) *Cell* **80**, 225-236
77. Majerus, M. A., Bibollettruche, F., Telliez, J. B., Wasyluk, B., and Bailleul, B., (1992) *Nucleic Acids Res.* **20**, 2699-2703
78. Chen, J. H., and Wright, C., (1993) *Oncogene* **8**, 3375-3383
79. Davis, R. J., (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 14553-14556
80. Hendrick, G., Strahl, T., and Shaw, P. E., (1995) *Curr. Biol.* **5**, 1191-1200
81. Mannel, D. N., Ruschoff, J., and Orosz, P., (1993) *Res. Immunol.* **144**, 364-369
82. Collyn-d'Hooghe, M., Galiegue, S., Szymiczek, D., Lantoin, D., Quief, S., Loucheux-Lefebvre, M.-H., and Kerkaert, J.-P., (1993) *Leukemia* **7**, 1777-1785

B - RESULTATS COMPLEMENTAIRES

Nous avons mis en évidence que l'activation de la voie de la sphingomyéline intervient dans la signalisation précoce du $\text{TNF}\alpha$ conduisant à l'activation du gène *c-ets1*. Les expériences décrites ci-dessous tentent de déterminer d'une part quel type de sphingomyélinase, A-SMase ou N-SMase, est impliqué, et d'autre part, quelles sont les cibles moléculaires du céramide qui interviennent pour l'expression de *c-ets1*. Enfin, nous avons cherché à évaluer les relations entre l'expression de *c-ets1* et l'induction de l'apoptose dans les fibroblastes.

1 - Quel type de sphingomyélinase est impliqué dans l'activation de *c-ets1* par le $\text{TNF}\alpha$?

Pour déterminer le type de sphingomyélinase impliqué dans l'activation de *c-ets1* par le $\text{TNF}\alpha$, nous avons utilisé différents effecteurs qui inhibent spécifiquement l'activité de l'A-SMase, et nous avons étudié l'activation de *c-ets1* dans les fibroblastes de patients qui souffrent d'un déficit en A-SMase. Certaines expériences présentées dans ce chapitre sont préliminaires et doivent être confirmées. Cependant, prises dans leur ensemble, elles suggèrent toutes que la N-SMase est impliquée dans l'induction de *c-ets1* par le $\text{TNF}\alpha$.

a) - Le D609

La sphingomyélinase de type acide (A-SMase) est activée en aval de la PC-PLC (cf p64 et Figure 15). L'inhibition spécifique de la PC-PLC par le D609 est donc susceptible de bloquer toutes les réponses qui dépendent de la production de diacylglycérol (DAG) par la PC-PLC, et en particulier celles qui dépendent de l'A-SMase. Dans les fibroblastes de prépuce humain, HFF, le D609 neutralise bien l'activation de l'A-SMase induite par le $\text{TNF}\alpha$ (Figure 18C). Cependant, le D609 n'inhibe pas l'induction de l'expression de *c-ets1* par le $\text{TNF}\alpha$. Il induit par contre une expression de *c-ets1* qui dépend de la dose appliquée aux fibroblastes (Figure 18A). Cet effet pourrait résulter de l'inhibition de l'A-SMase ou de l'inhibition de signalisations activées en parallèle qui dépendent également de la production de DAG. L'utilisation du D609 ne permet donc pas de déterminer si l'A-SMase pourrait être impliquée ou non dans l'induction de *c-ets1* par le $\text{TNF}\alpha$.

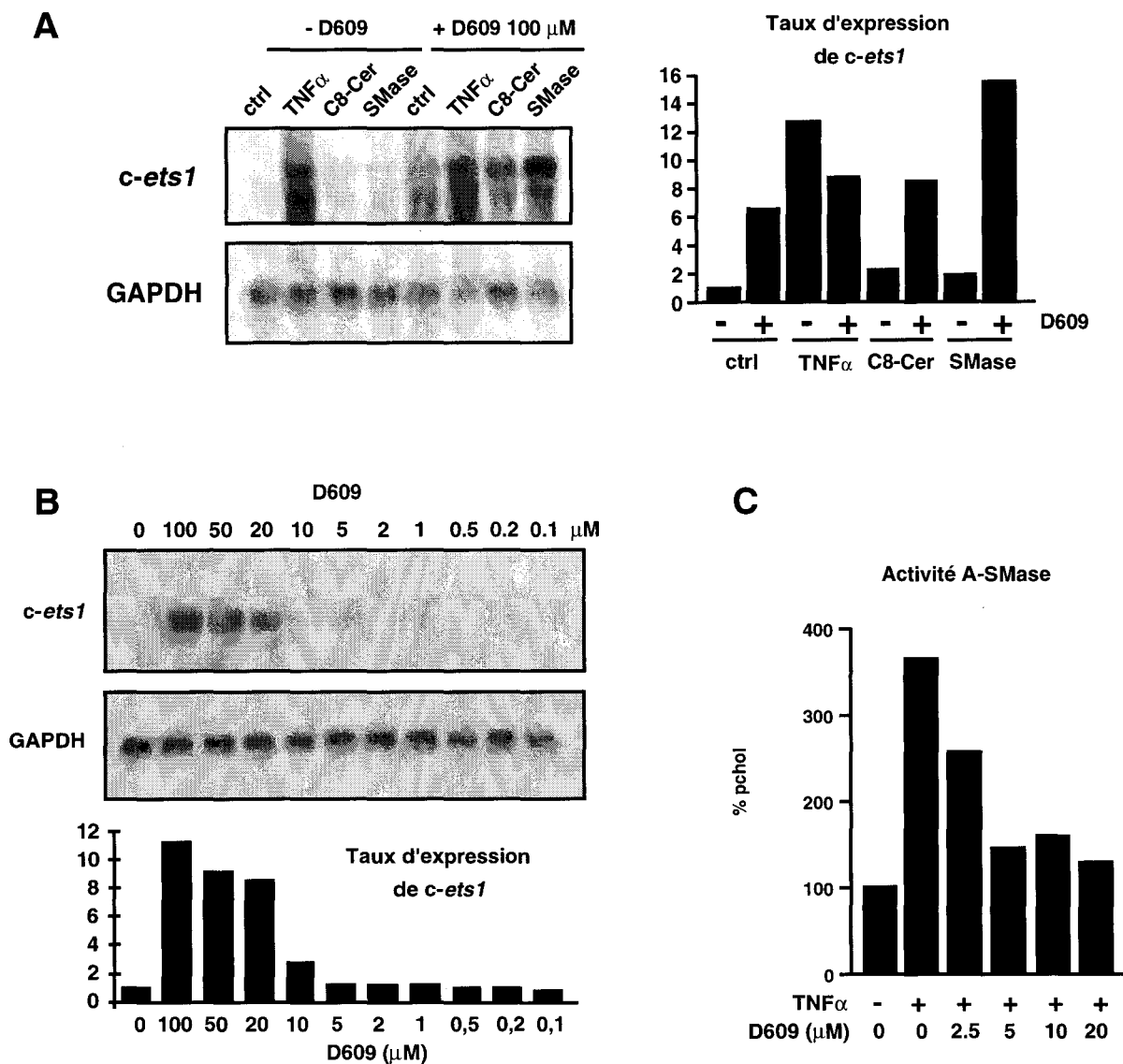


Figure 18 : L'inhibiteur de PC-PLC, D609, induit l'expression de *c-ets1* bien qu'il inhibe l'activité de la sphingomyélinase acide.

(A) L'effet inducteur du D609 sur l'expression de *c-ets1* est additif avec celui du TNF α . Les fibroblastes HFF sont prétraités (+) ou non (-) pendant 1 h par 100 μ M de D609 et sont ensuite stimulés par 10 ng/ml de TNF α , 1 μ M de C8-ceramide (C8-Cer) ou 0,1 U/ml de sphingomyélinase (SMase)

pendant 4 h en présence (+) ou en absence (-) de D609. L'expression de *c-ets1* et de GAPDH est déterminée par Northern blot, quantifiée à l'aide d'un PhosphorImager, et comparée à celle des cellules non stimulées (ctrl).

(B) Le D609 induit *c-ets1* de manière dose dépendante. Les fibroblastes sont traités pendant 4 h avec des concentrations de D609 de 0,1 à 100 μ M. L'expression de *c-ets1* et GAPDH est déterminée par Northern blot, quantifiée à l'aide d'un phosphorimager, et comparée à celle des cellules non stimulées (0 μ M).

(C) Le D609 inhibe l'activation de l'A-SMase par le TNF α . Les fibroblastes sont prétraités pendant 4 h avec différentes concentrations de D609 (0-20 μ M), puis sont stimulés (+) ou non (-) avec 100 ng/ml de TNF α pendant 5 min. A la fin de l'expérience, l'activité de la sphingomyélinase acide (A-SMase) est déterminée et comparée à celle des cellules non stimulées, 100% correspondant à l'activité basale de l'A-SMase.

b) - Les poisons des lysosomes

L'A-SMase est activée dans les compartiments subcellulaires tels que les lysosomes et les endosomes, dans lesquels l'A-SMase trouve le pH acide nécessaire à son activité. La monensine et le chlorure d'ammonium augmentent le pH du compartiment endo-lysosomal. Ils bloquent ainsi l'activation séquentielle de l'A-SMase et du facteur de transcription NF- κ B, alors qu'ils n'affectent pas l'activité de la N-SMase et des réponses cellulaires qui en dépendent (activation des protéines "dirigées par la proline" et de la phospholipase A₂) (Wiegmann et al., 1994). La vinblastine est un poison des microtubules qui inhibe la fusion des lysosomes et des endosomes. La vinblastine n'inhibe ni l'activation de l'A-SMase ni l'induction du facteur de transcription NF- κ B, ce qui suggère que l'activation de l'A-SMase se produit dans les endosomes plutôt que dans les lysosomes (Wiegmann et al., 1994).

Ces différents agents, monensine, chlorure d'ammonium et vinblastine, ont été appliqués sur les fibroblastes avant leur stimulation par le TNF α (Figure 19). Alors que la vinblastine n'a pas d'effet sur l'expression basale de *c-ets1*, la monensine et le chlorure d'ammonium l'augmentent faiblement ; cet effet étant cumulatif avec celui du TNF α . Cependant, aucun de ces différents agents n'inhibe significativement l'induction de l'expression de *c-ets1* par le TNF α . L'augmentation du pH des endo-lysosomes avec la monensine et le chlorure d'ammonium, qui est susceptible d'inhiber l'activation de l'A-SMase, accroît l'expression de *c-ets1*. Ceci suggère d'une part que l'A-SMase n'est pas impliquée dans la signalisation du TNF α qui active le gène *c-ets1*, et d'autre part que la voie qui implique l'A-SMase pourrait au contraire avoir un effet répresseur sur l'expression du gène *c-ets1*.

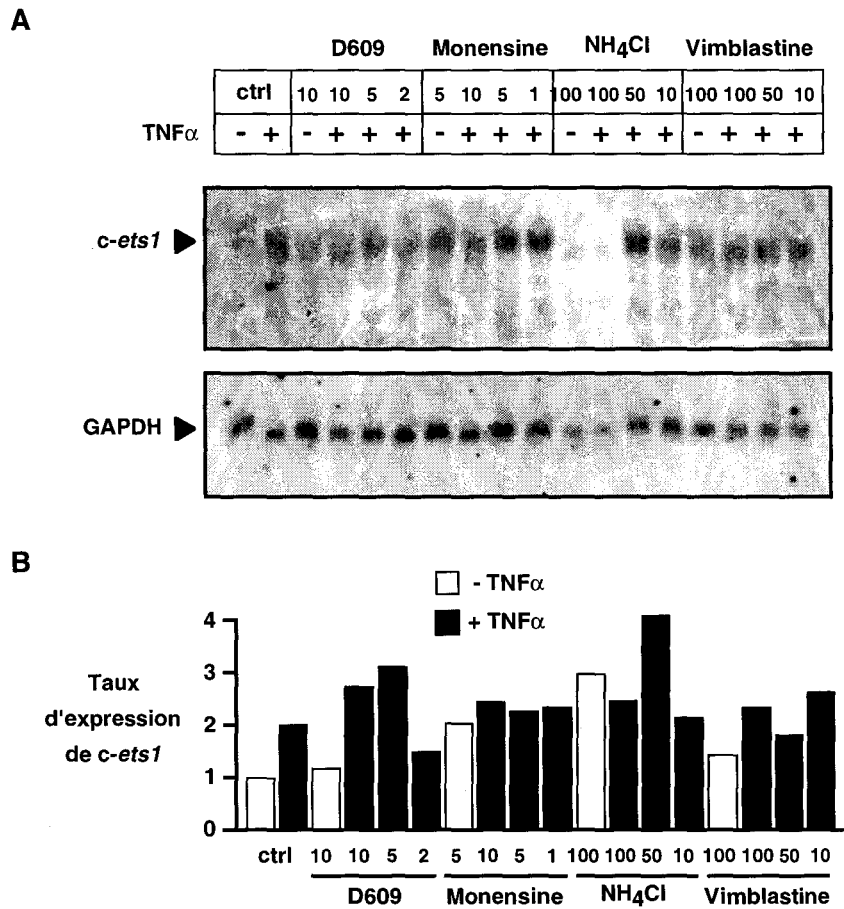


Figure 19 : Evidences de l'augmentation de l'expression de *c-ets1* lors de l'inhibition de l'activation ou de l'activité de l'A-SMase. Les fibroblastes HFF sont prétraités pendant 1 h avec le D609 (10 à 2 μ M) qui inhibe la PC-PLC, la monensin (10 à 1 μ g/ml) ou le chlorure d'ammonium (NH₄Cl, 100 à 10 mM) qui augmentent le pH des lysosomes, ou la vimblastine (100 à 1 μ M) qui empêche la fusion des lysosomes et endosomes. Les cellules sont ensuite stimulées (+) ou non (-) par le TNF α (10 ng/ml) pendant 4 h en présence des différents agents. A la fin du traitement, l'expression de *c-ets1* et GAPDH sont analysées par Northern blot (A), sont quantifiées à l'aide d'un PhosphorImager (B), et sont comparées à celles des cellules non traitées (ctrl).

c) - L'action du diacylglycérol

Un analogue soluble du diacylglycérol (DAG), le 1,2-dioctanonylglycérol (1,2-diC8), est capable d'induire l'expression de *c-ets1* dans les fibroblastes. Le DAG endogène, produit par la PC-PLC en réponse au $\text{TNF}\alpha$ (cf Figure 15), est capable d'activer aussi bien l'A-SMase que des PKCs. Cependant, un traitement prolongé des fibroblastes avec une forte dose de PMA afin de dépléter les cellules en activité PKCs sensibles au PMA, réduit l'effet du 1,2-diC8 sur l'expression de *c-ets1* (Figure 20). L'effet du DAG semble donc dépendre de l'activation de PKCs sensibles aux esters de phorbol telles que des PKCs conventionnelles ou nouvelles, et non de l'activation de l'A-SMase.

d) - Les fibroblastes NPD-A

La maladie neuropathologique de Niemann-Pick de type A (NPD-A) est une forme de sphingolipidose qui conduit à une hépatosplénomégalie et à un dysfonctionnement du cerveau. Ces troubles résultent d'un désordre dans le catabolisme des sphingolipides provoqué par une déficience héréditaire de l'A-SMase. L'absence de celle-ci empêche la dégradation de la sphingomyéline et conduit à l'accumulation de la sphingosylphosphocholine (SPC), le dérivé N-déacétylé de la sphingomyéline (Figure 14). La SPC s'accumule notamment dans la rate, le cerveau et le foie (pour revue voir Berger et al., 1995).

Dans des cultures primaires de fibroblastes isolés à partir de patients atteints de la NPD-A, une stimulation par le $\text{TNF}\alpha$ ou par le PMA est toujours capable d'induire l'expression du gène *c-ets1* (Figure 21). Dans ces cellules l'activité de l'A-SMase est inférieure à 1% de celle dans les cellules normales du même type. Par conséquent, l'activité A-SMase n'est pas indispensable dans la signalisation du $\text{TNF}\alpha$ qui conduit à l'activation du gène *c-ets1*. Cependant, étant donné les résultats évoqués dans le paragraphe précédent, l'absence d'effet de l'analogue du DAG dans cette expérience est surprenante. Les contraintes liées à la culture délicate de ces fibroblastes n'ont pas encore permis de confirmer ce résultat.

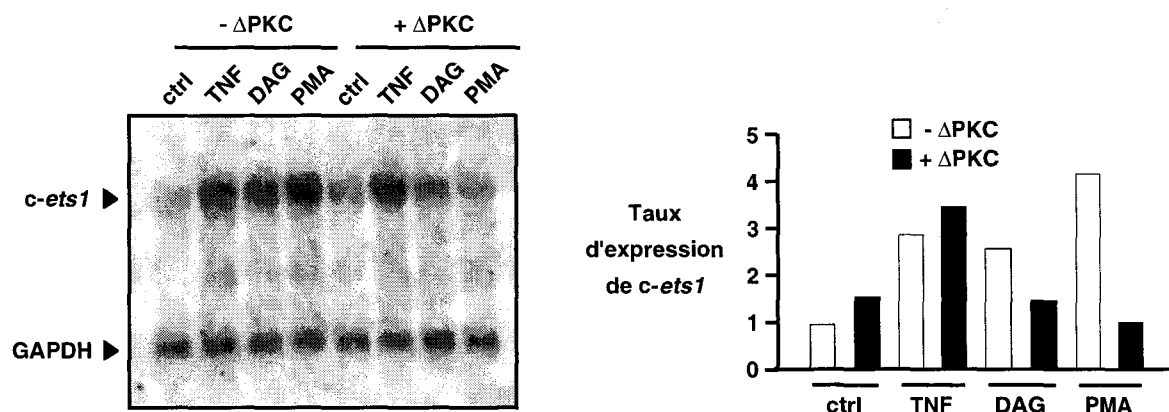


Figure 20 : L'induction de *c-ets1* par le DAG dépend de PKCs sensibles au PMA. Les PKCs sensibles au PMA sont inactivées ($+\Delta PKC$) ou non ($-\Delta PKC$) dans les fibroblastes par une exposition prolongée à une forte dose de PMA (100 ng/ml pendant 48 h). Les cellules sont ensuite stimulées par 10 ng/ml de $TNF\alpha$ (TNF), 100 μM de 1,2-diC8 qui est un analogue du diacylglycérol (DAG), ou 10 ng/ml de PMA. L'expression de *c-ets1* et de GAPDH sont analysées par Northern blot, quantifiées à l'aide d'un PhosphorImager, et comparées à celles des cellules non stimulées (ctrl).

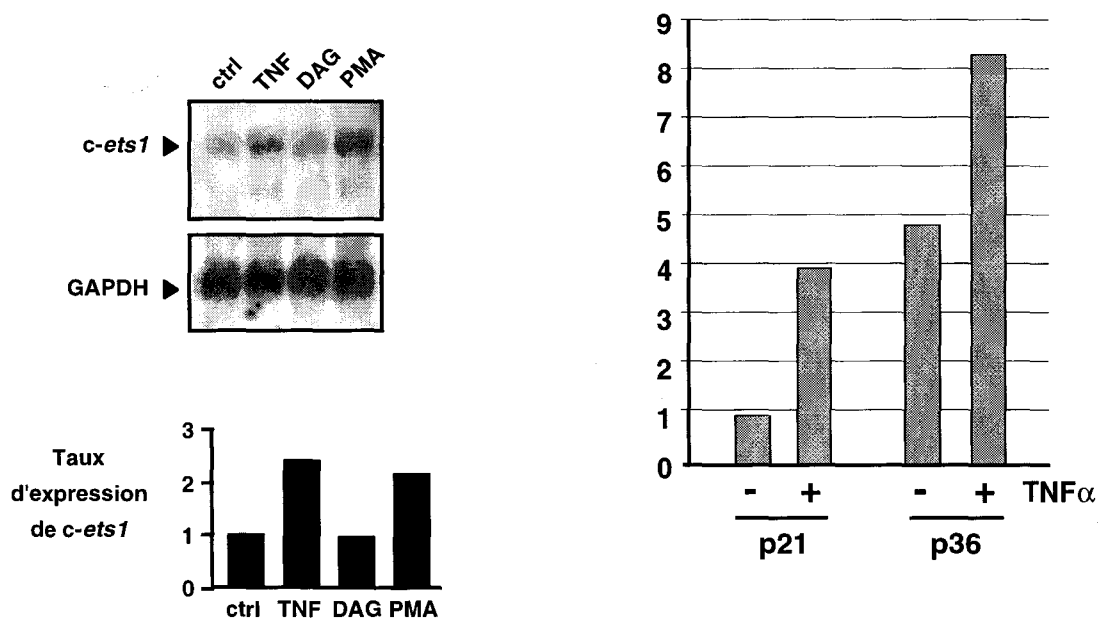


Figure 21 : L'A-SMase n'est pas indispensable pour l'induction de *c-ets1* par le $TNF\alpha$. Des fibroblastes isolés à partir de patients atteints de la maladie de Niemann-Pick de type A sont stimulés pendant 4 h avec 10 ng/ml de $TNF\alpha$, (TNF), 100 μM de 1,2-diC8 qui est un analogue de diacylglycérol (DAG), ou 10 ng/ml de PMA. L'expression de *c-ets1* et GAPDH est mesurée par Northern blot, quantifiée à l'aide d'un PhosphorImager, et comparée à celle des cellules non stimulées (ctrl).

Figure 22 : L'expression de *c-ets1* augmente avec la sénescence des fibroblastes. Les fibroblastes utilisés aux passages 21 (p21) ou 36 (p36) sont stimulés (+) ou non (-) par 10 ng/ml de $TNF\alpha$ pendant 4 h. L'expression de *c-ets1* est analysée par Northern blot, quantifiée à l'aide d'un PhosphorImager et comparée à l'expression basale dans les cellules les plus jeunes (p21 - TNF).

e) - *c-ets1* et la sénescence

Nous avons remarqué que l'expression basale du gène *c-ets1* varie selon les expériences : dans certains cas elle est faible voire indétectable, alors que dans d'autres cas elle est assez élevée. En fait, l'expression de *c-ets1* est corrélée avec le nombre de passages qu'ont les cellules au moment de l'expérience (Figure 22). Une cellule normale a un nombre de cycles de division cellulaire limité. A partir d'un certain nombre de divisions, qui est proportionnel au nombre de passages, le taux de croissance diminue et les cellules deviennent sénescents puis meurent. L'une des caractéristiques de la sénescence cellulaire est l'augmentation de l'activité basale de la sphingomyélinase neutre (N-SMase) qui induit une augmentation du taux de céramide dans les cellules (Venable et al., 1995). L'expression accrue de *c-ets1* corrélée avec la sénescence des fibroblastes suggère que la N-SMase est impliquée dans la signalisation du TNF α conduisant à l'activation du gène *c-ets1*.

2 - Quelles sont les cibles moléculaires du céramide qui médient l'activation de *c-ets1* par le TNF α ?

a) - La CAPP

La CAPP, protéine phosphatase activée par le céramide, correspond à certaines isoformes de la protéine phosphatase 2A (PP_{2A}). Elle peut être inhibée comme elle par l'acide okadaïque (Dobrowsky et al., 1993). Son rôle dans la signalisation du TNF α semble dépendre du type cellulaire investigué. Dans les cellules promyélocytopiques humaines HL-60, la CAPP est activée en réponse au TNF α et elle est impliquée dans la répression de l'expression du gène *c-myc*, l'arrêt de la prolifération et l'apoptose induits par le TNF α (Wolff et al., 1994). Au contraire, dans des fibroblastes, le TNF α réprime la CAPP, et l'acide okadaïque mime l'activation de kinases par le TNF α (Guy et al., 1992; Guy et al., 1995). Dans les fibroblastes de prépuce humain, l'acide okadaïque ne réprime pas l'induction de *c-ets1* par le TNF α (Figure 8 de l'article 3). Inversement, l'acide okadaïque seul induit l'expression de *c-ets1* et son effet est synergique avec celui du TNF α . L'activation de la CAPP (PP_{2A}) n'est donc pas indispensable pour la transmission du signal d'activation pour le gène *c-ets1*.

b) - La CAPK

Dans la signalisation du TNF α , la CAPK ("protéine kinase activée par le céramide") est activée en aval de la N-SMase, et elle est susceptible d'activer c-Raf-1 qui initie la cascade des MAP kinases (Liu et al., 1994). La CAPK est une protéine kinase "dirigée par la proline" mais elle reconnaît potentiellement des substrats différents de ceux des MAP kinases. Elle phosphoryle préférentiellement des séquences de type Pro-Leu-Ser/Thr-Leu-Pro (Joseph et al., 1993). Cette particularité nous a permis d'envisager l'utilisation d'un peptide reconnaissable spécifiquement par la CAPK pouvant entrer en compétition dans la cellule avec les substrats de la CAPK et bloquer ainsi la signalisation en aval de celle-ci.

Joseph et al. ont déterminé un peptide optimal présentant une affinité élevée pour la CAPK, reconnu avec une haute spécificité (Joseph et al., 1993). Ce peptide (noté CAPKps (CAPK pseudosubstrate) et de séquence KRELVEPLTLPSGEA, a été synthétisé *in vitro* et modifié à son extrémité amino-terminale par l'addition d'un groupe myristique (myr-CAPKps) afin de faciliter sa pénétration cellulaire et son recrutement au niveau de la membrane où se trouve la CAPK. Le lipopeptide CAPKps a été appliqué aux fibroblastes avant leur stimulation par le TNF α ou par d'autres activateurs de la voie de la sphingomyéline. Malgré les différents temps de prétraitement et les différentes concentrations du peptide testés, il n'est apparu qu'une légère inhibition, bien que reproductible, de l'expression de *c-ets1* induite par le TNF α (Figure 23A). De plus, le peptide n'affecte pas de la même façon l'action des agonistes de la voie de la sphingomyéline (sensés activer la CAPK) et celle du PMA.

Il est à noter que ce peptide présente un site phosphoaccepteur fonctionnel qui le rend susceptible d'être phosphorylé par la CAPK. En conséquence, le faible effet du lipopeptide utilisé est probablement dû au fait qu'il réagit comme un substrat compétiteur plutôt que comme un réel inhibiteur *in vivo*. Nous n'avons pas prouvé que la CAPK est vraiment inhibée par ce pseudosubstrat et donc qu'elle est impliquée dans la signalisation du TNF α conduisant à l'expression de *c-ets1*.

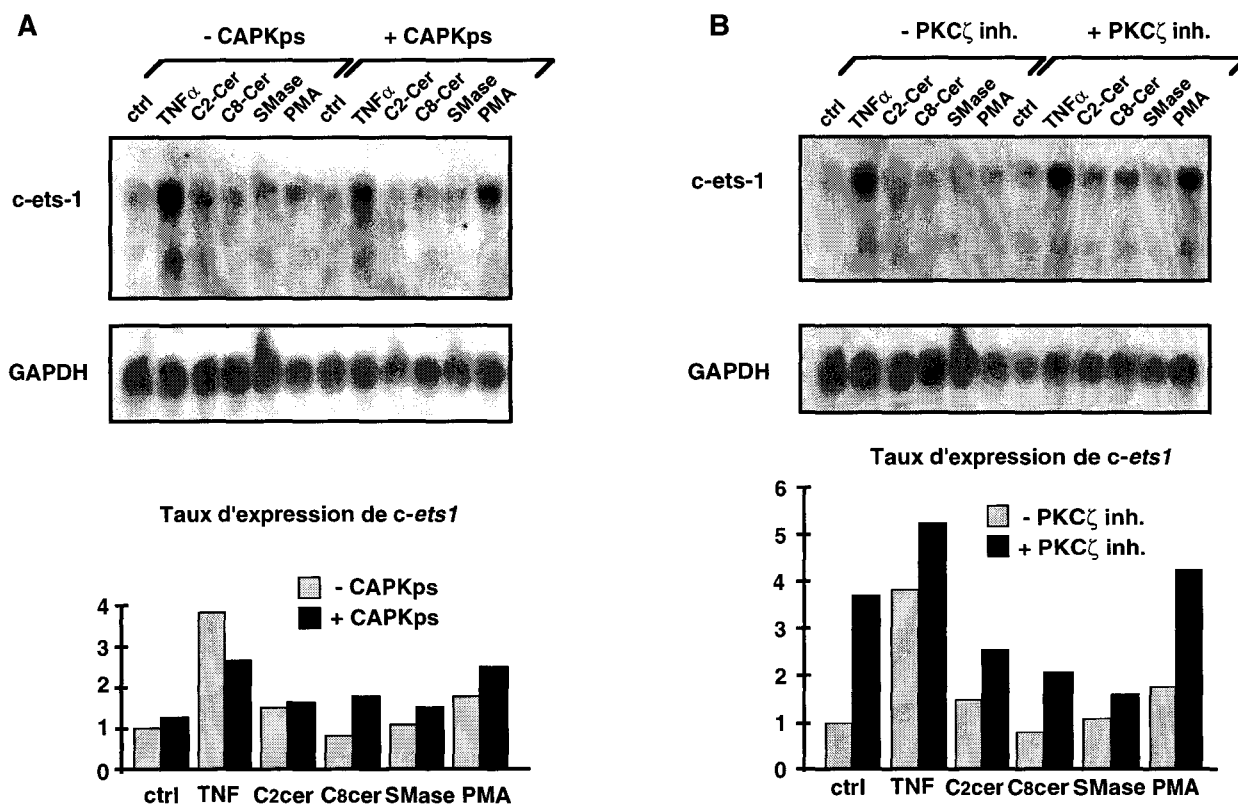


Figure 23 : Utilisation de lipopeptides pour inhiber la CAPK ou la PKC ζ . Les fibroblastes sont prétraités ou non pendant 30 min avec (A) 50 μ M du pseudosubstrat myristoylé pour la protéine kinase activée par le céramide (+/- CAPKps, ou avec (B) 25 μ M du pseudosubstrat myristoylé pour la protéine kinase C-zeta (+/- PKC ζ inh.). Les cellules sont ensuite stimulées pendant 4 h avec 10 ng/ml de TNF α , 10 μ M de C2-céramide (C2-Cer), 10 μ M de C8-céramide (C8-Cer), 0,1 U/ml de sphingomyelinase (SMase) ou 10 ng/ml de PMA. L'expression de *c-ets1* et GAPDH sont analysées par Northern blot, quantifiées à l'aide d'un PhosphorImager, et comparée à l'expression basale dans les cellules non traitées (ctrl).

c) - La PKC ζ

En l'absence de stimulation, les PKCs sont naturellement autoinhibées grâce à leur domaine amino-terminal qui possède une séquence similaire à celle des substrats et qui bloque en cis leur site catalytique. La séquence peptidique de ce domaine répresseur, ou pseudosubstrat, diffère de celle du site de phosphorylation des substrats des PKCs par le remplacement du site phosphoaccepteur, sérine ou thréonine, par une alanine (A). Des activateurs allostériques des PKCs, DAG ou esters de phorbol, pourraient affranchir ce contrôle intramoléculaire, et induire un changement de conformation moléculaire nécessaire pour la libération du site de liaison aux substrats et pour l'activation des PKCs. Les séquences peptidiques des pseudosubstrats diffèrent d'une isoforme de PKC à une autre. Des oligopeptides de synthèse basés sur les séquences des pseudosubstrats sont des candidats potentiels pour inhiber spécifiquement et sélectivement les isoformes de PKCs *in vitro* et *in vivo* (Eichholtz et al., 1993).

Pour inhiber spécifiquement la PKC ζ , un oligopeptide a été synthétisé sur la base de la séquence de son pseudosubstrat (myr-SIYRRGARRWRKL). Ce peptide, noté mSAL, a été modifié par l'addition d'un groupement myristique (chaîne de 14 carbones) à son extrémité aminoterminal afin de faciliter l'internalisation du peptide dans la cellule et ainsi son action inhibitrice sur la PKC ζ endogène. En contrôle, des peptides similaires ont été synthétisés pour inhiber spécifiquement la PKC α et la PKA. Le peptide pseudosubstrat inhibiteur de la PKC α (myr-DVANRFARKGALRQ), noté mDAQ, inhibe la phosphorylation de la protéine MARCKS (*myristoylated alanine-rich C kinase substrate*) ainsi que l'activation de la PLD par bradykinine, qui est strictement dépendante de la PKC (Eichholtz et al., 1993). La PKA ne possède pas de domaine pseudosubstrat inhibiteur. La séquence du peptide utilisé (mGAI ou myr-GAI, myr-GRRNAIHDI) est basée sur celle de PKI, un inhibiteur naturel des PKAs (Scott, 1985). D'autres peptides utilisés comme contrôle sont soit non myristoylé (DAQ), soit porteur d'une séquence peptidique modifiée dans le site de reconnaissance pour la PKC α (mRAQ, myr-RVANRFADDGALDQ).

Le lipopeptide pseudosubstrat inhibiteur de PKC ζ (mSAL ou PKC ζ inh.) n'inhibe pas l'induction de l'expression de *c-ets1* par le TNF α , mais augmente par contre l'expression basale

du gène *c-ets1* (Figure 23 B). Bien que des doses plus élevées aient été testées, l'effet maximal de cet inhibiteur est observé avec des concentrations faibles (25 μM) car des concentrations plus élevées (50 à 100 μM) sont rapidement cytotoxiques sur les fibroblastes pendant le temps du traitement (4 h). L'effet du pseudosubstrat inhibiteur de PKC ζ sur l'expression de *c-ets1* s'ajoute à celui du TNF α (Figure 23 B).

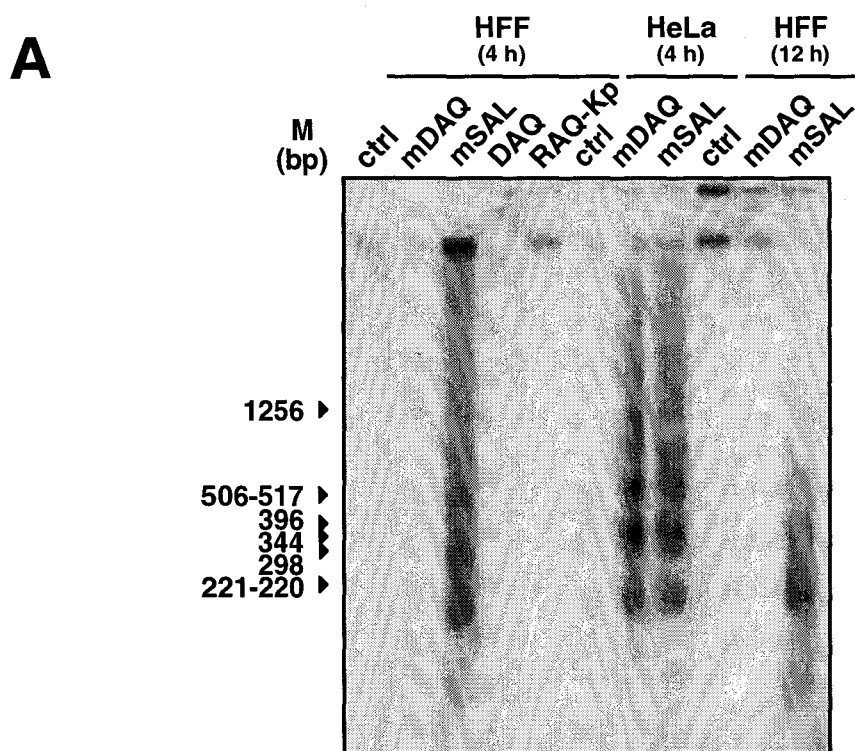
De la même façon, le lipopeptide pseudosubstrat inhibiteur de PKC α (mDAQ ou PKC α inh.) n'inhibe pas l'induction de l'expression de *c-ets1* par le TNF α , mais peut induire une augmentation de l'expression basale de *c-ets1* à une concentration supérieure (100 μM) à la concentration optimale déterminée pour le pseudosubstrat inhibiteur de PKC ζ (25 μM) (données non montrées). Les contrôles négatifs, le lipopeptide de séquence modifiée mRAQ, le peptide DAQ non myristoylé (incapable de traverser la membrane plasmique) ou l'inhibiteur de protéine kinase A (mGAI), n'induisent ni une augmentation de l'expression basale de *c-ets1*, ni une inhibition de cette expression induite par le TNF α (données non montrées).

L'utilisation du lipopeptide pseudosubstrat inhibiteur spécifique de la PKC ζ suggère que celle-ci n'est pas la cible moléculaire du céramide en réponse au TNF α , mais qu'au contraire, elle pourrait être impliquée dans une signalisation réprimant l'expression de *c-ets1*.

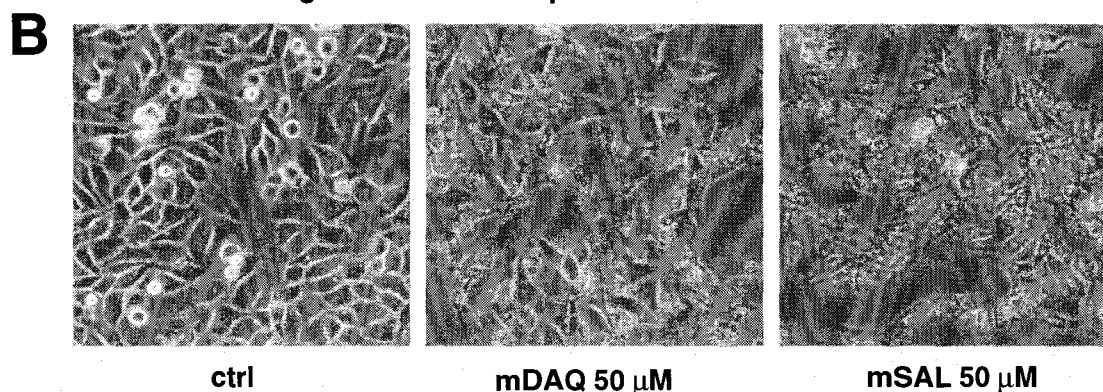
d) - Effet différentiel des pseudosubstrats inhibiteurs de PKCs selon le type cellulaire

Les lipopeptides pseudosubstrats inhibiteurs des PKC α et PKC ζ ont été appliqués en parallèle sur les cultures primaires de fibroblastes normaux et sur des lignées de cellules épithéliales tumorales, les cellules HeLa issues d'un cancer du col de l'utérus.

L'inhibiteur pour la PKC ζ (mSAL) induit la mort cellulaire par apoptose en 4 h des deux types cellulaires qui est illustrée par une fragmentation nucléosomale de l'ADN (Figure 24). L'inhibiteur pour la PKC α (mDAQ) n'a pas d'effet cytotoxique apparent sur les fibroblastes (après 4 h comme après 12 h de traitement) mais induit une fragmentation de l'ADN dans les cellules HeLa. Par une autre méthode, la technique de détection de l'ADN fragmenté par immunocytochimie ou TUNEL,



Lignée de cellules épithéliales tumorales HeLa



Culture primaire de fibroblastes humains normaux HFF

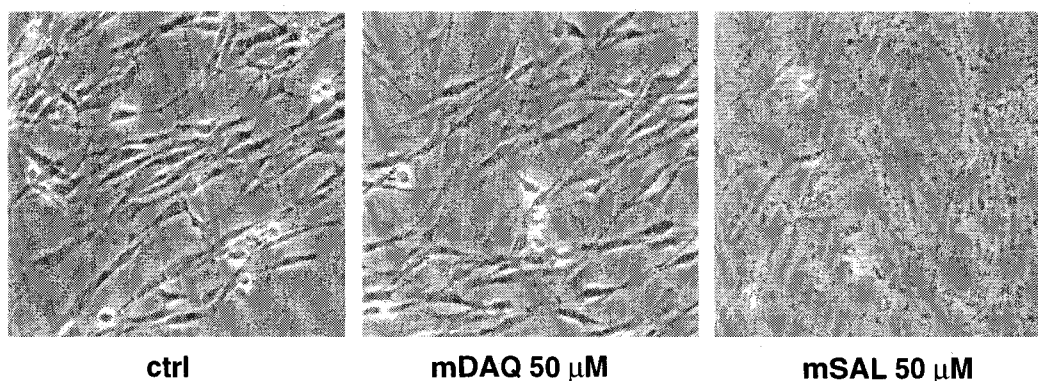


Figure 24 : Induction différentielle de l'apoptose par les inhibiteurs de PKC α et PKC ζ . Les cultures primaires de fibroblastes humains normaux (HFF, human foreskin fibroblasts) et les lignées de cellules épithéliales tumorales HeLa issues d'un carcinome humain du col de l'utérus, sont traitées pendant 4 h par 50 μ M de mDAQ, le peptide pseudosubstrat myristoylé inhibiteur de PKC α , ou par 50 μ M de mSAL, le peptide pseudosubstrat myristoylé inhibiteur de PKC ζ . Contrôles : (1) les cellules ne sont pas traitées (ctrl) ; (2) les cellules sont traitées par 50 μ M de peptide DAQ qui n'est pas myristoylé et ne pénètre pas dans la cellule ; (3) les cellules sont traitées par 50 μ M de lipopeptide RAQ-kp dont la séquence modifiée n'est pas reconnue par les PKCs. Une induction de la mort cellulaire programmée, apoptose, est mise en évidence par la fragmentation nucléosomale de l'ADN (A) associée avec des modifications morphologiques des cellules (B) observées au microscope.

il est cependant possible de mettre en évidence la fragmentation de l'ADN dans les fibroblastes traités par l'inhibiteur pour la PKC α (données non montrées). La concentration efficace est par contre très supérieure à celle de l'inhibiteur pour la PKC ζ : environ 30% et 80% de cellules positives avec respectivement 50 μ M et 100 μ M de mDAQ ; environ 80% de cellules positives avec 25 μ M de mSAL. De plus, le traitement avec mDAQ n'altère pas la morphologie des fibroblastes, alors que les contours membranaires apparaissent irréguliers et que des corps apoptotiques sont observés suite au traitement par le mSAL (Figure 24 B). En parallèle, le peptide DAQ (incapable de pénétrer les cellules puisque dépourvu de groupe lipidique) n'a aucun effet cytotoxique sur les fibroblastes : aucune cellule apoptotique n'est détectée par TUNEL, et aucune fragmentation nucléosomale n'est observée dans les fibroblastes traités par le DAQ.

Nos résultats suggèrent que les cellules épithéliales tumorales HeLa sont plus sensibles que les fibroblastes normaux à un effet pro-apoptotique induit par l'inhibiteur spécifique pour la PKC α (mDAQ). Les deux types cellulaires testés sont par contre sensibles de la même façon à la cytotoxicité de l'inhibiteur spécifique pour la PKC ζ .

3 - Y a-t-il une corrélation entre l'expression de *c-ets1* et l'apoptose ?

Dans le système lymphoïde, l'inactivation du gène *c-ets1* entraîne une diminution de la prolifération cellulaire et une augmentation de la mort cellulaire spontanée par apoptose des cellules T et B (Bories et al., 1995; Muthusamy et al., 1995). Dans les fibroblastes, nous avons montré que les cytokines pro-inflammatoires TNF α et IL-1 α sont plus efficaces que les facteurs de croissance bFGF, PDGF, EGF pour induire une augmentation rapide de l'expression de *c-ets1*. De plus certains stress cellulaires sont également capables d'induire l'expression de *c-ets1* : un choc osmotique par le D-sorbitol, un choc thermique (43°C), les inhibiteurs de synthèse protéique anisomycine et cycloheximide. Or ces stress cellulaires et les cytokines pro-inflammatoires ont en commun l'aptitude à activer les cascades des protéine kinases "activées par le stress" (SAPKs) qui conduisent à l'activation des protéine kinases p38/RK et JNK. De plus en plus d'évidences montrent que la cascade des JNKs est recrutée en aval de voie de la sphingomyéline et est impliquée dans la transduction de signaux apoptotiques.

Différents agents potentiellement pro-apoptotiques induisent l'expression de *c-ets1* dans les fibroblastes. Nous avons alors regardé si ces agents sont effectivement capables d'induire l'apoptose dans les fibroblastes et si cet effet est corrélé avec l'expression du gène *c-ets1*.

Dans les fibroblastes de prépuce humain (HFF), les stress cellulaires et les cytokines $\text{TNF}\alpha$ et $\text{IL-1}\alpha$, peuvent induire une fragmentation nucléosomale de l'ADN génomique, qui est caractéristique d'une mort cellulaire par apoptose (Figure 25). D'autres stimuli sont également capables d'induire à la fois l'apoptose des fibroblastes et l'expression de *c-ets1*. Des analogues de céramide et de sphingosine induisent une apoptose très rapide des fibroblastes (en moins de 4 h) (Figure 25). L'inhibiteur de PC-PLC, D609, ainsi que le lipopeptide pseudosubstrat inhibiteur pour la $\text{PKC}\zeta$ (mSAL) induisent une mort cellulaire des cellules qui est fonction de la dose employée (Figure 24 et Figure 25). L'effet apoptotique du D609, des différents stress et des cytokines pro-inflammatoires s'observe après plus de 16 h, alors que l'effet des céramides, sphingosine et inhibiteur de $\text{PKC}\zeta$ est très rapide (moins de 4 h).

Cependant, les concentrations de $\text{TNF}\alpha$ et d' $\text{IL-1}\alpha$ requises pour l'induction de l'apoptose sont dix fois supérieures à celles suffisantes pour induire *c-ets1*. De plus, l'irradiation par des UV-C induit l'apoptose des fibroblastes ; mais aucune augmentation de l'expression de *c-ets1* n'a pu être observée quelle que soit la dose d'UV-C appliquée aux cellules.

Par ailleurs, le sérum (SVF), le PMA et le diacylglycérol qui induisent une augmentation de l'expression de *c-ets1*, sont de puissants mitogènes et par conséquent n'induisent pas de fragmentation nucléosomale de l'ADN dans les fibroblastes (Figure 25). Par contre, d'autres mitogènes pour les fibroblastes, le bFGF et le PDGF, n'induisent pas d'augmentation rapide (4 h) de l'expression de *c-ets1*.

Bien que certains stimuli mitogènes et certains stimuli pro-apoptotiques soient capables d'induire *c-ets1* dans les fibroblastes, il n'y a pas de corrélation directe entre l'expression du gène *c-ets1* et la prolifération ou l'apoptose des fibroblastes.

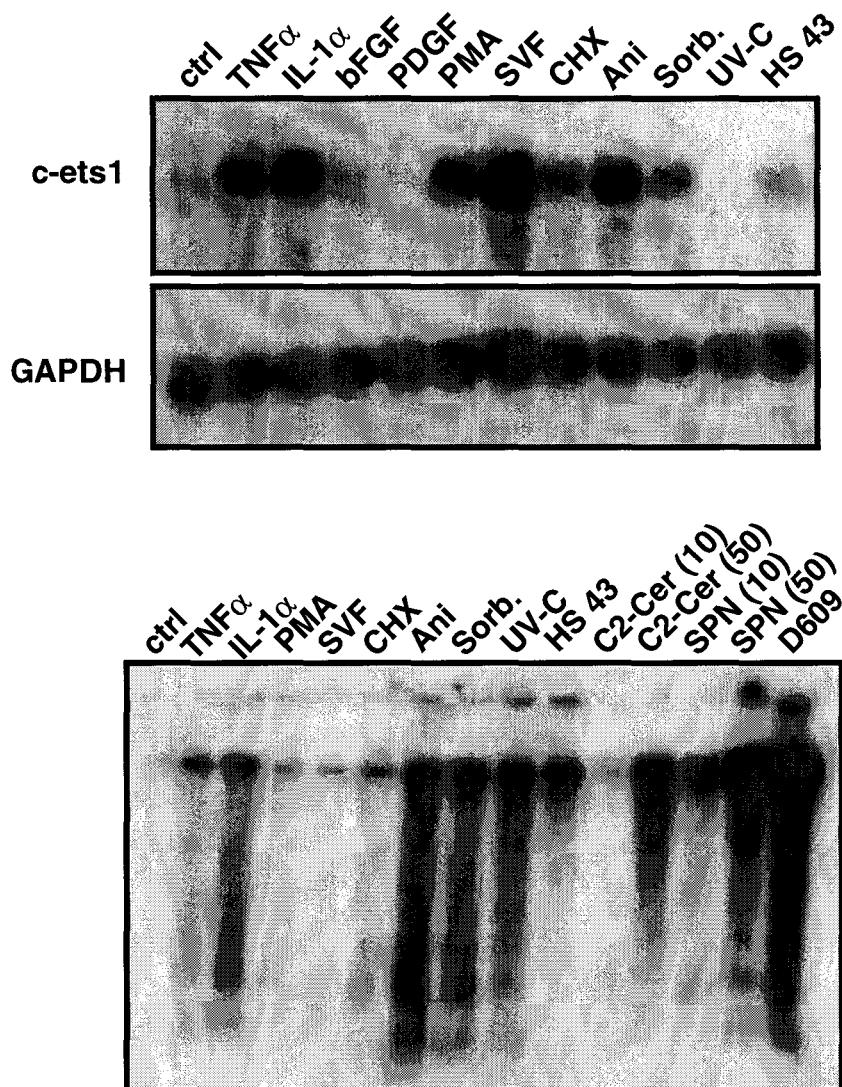


Figure 25 : Différents stress cellulaires induisent conjointement l'apoptose des fibroblastes et l'expression de *c-ets1*. (A) L'expression du gène *c-ets1* est analysée par Northern blot dans des fibroblastes subconfluents soumis à différents traitements : aucune stimulation (ctrl) ; une stimulation pendant 4 h par 10 ng/ml de TNF α , 5 ng/ml d'IL-1 α , 10 ng/ml de bFGF, 10 ng/ml de PDGF, 10 ng/ml de PMA, 10% de sérum de veau foetal (SVF), 10 μ g/ml de cycloheximide (CHX), 10 μ M d'anisomycine (Ani) ; un choc osmotique de 4 h avec 300 mM de D-sorbitol ; une irradiation par une dose de 10 J/m² d'UV-C ; un choc thermique à 43°C suivi d'une incubation pendant 3 h à 37°C (HS 43). (B) La capacité de ces traitements à induire l'apoptose des fibroblastes est déterminée par la visualisation de la fragmentation nucléosomale de l'ADN à des temps optimums : 16 h pour le TNF, (100 ng/ml), l'IL-1 α (100 ng/ml), le PMA (100 ng/ml), le sérum de veau foetal (SVF, 10%), la cycloheximide (CHX, 10 μ g/ml), l'anisomycine (Ani, 10 μ M), le choc osmotique (D-sorbitol, 300 mM), l'irradiation par les UV-C (10 J/m²) d'UV-C, le choc thermique (HS 43), le D609 (50 μ M) ; 4 h pour le C2-céramide (C2-cer, 10 ou 50 μ M), la sphingosine (SPN, 10 ou 50 μ M).

III - CONCLUSION

La recherche de la voie de transduction impliquée dans l'activation du gène *c-ets1* par le $\text{TNF}\alpha$ nous a conduit à mettre en évidence différentes voies intervenant de manière différente dans la régulation du gène *c-ets1* : la voie de l'AMP cyclique et la voie de la phospholipase A_2 répriment l'expression de *c-ets1* ; la voie du diacylglycérol/PMA et de certaines protéine kinases C et la voie de la sphingomyéline, du céramide et de la sphingosine activent l'expression de *c-ets1*. De plus, nous avons montré que l'induction de l'expression de *c-ets1* par le $\text{TNF}\alpha$ est indépendante de protéine kinases C sensibles aux esters de phorbol. Elle implique par contre la voie de la sphingomyéline, et est inhibée par l'activation de la voie de l'acide arachidonique. Une synthèse de ces résultats est proposée sur la Figure 26.

Cependant, le $\text{TNF}\alpha$ active les deux types de sphingomyélinases, A-SMase et N-SMase, dans les fibroblastes. Différents indices suggèrent que c'est la N-SMase plutôt que l'A-SMase qui est impliquée dans la signalisation du $\text{TNF}\alpha$ conduisant à l'augmentation de l'expression de *c-ets1* : (1) le D609, qui inhibe la PC-PLC et ainsi l'activation de l'A-SMase, induit une expression élevée de *c-ets1* et n'inhibe pas l'induction de *c-ets1* par le $\text{TNF}\alpha$; (2) le $\text{TNF}\alpha$ est toujours capable d'induire l'expression de *c-ets1* dans des fibroblastes déficients en activité A-SMase ; (3) l'expression de *c-ets1* augmente avec la sénescence des fibroblastes, qui est corrélée avec l'augmentation de l'activité basale de la N-SMase.

Nous n'avons pas déterminé clairement quelle cible moléculaire du céramide est impliquée dans l'induction du gène *c-ets1*. Il semble cependant que nous pouvons exclure l'activation de la protéine phosphatase CAPP et celle de la protéine kinase C ζ , car leur inhibition respective par l'acide okadaïque ou le lipopeptide mSAL ne bloque pas l'induction de *c-ets1* par le $\text{TNF}\alpha$. Par ailleurs, le fait que la sphingosine est plus efficace que le céramide pour induire l'expression de *c-ets1* et suggère que l'effet du céramide sur l'expression de *c-ets1* dépend de sa conversion en sphingosine par une céramidase, et implique plutôt des cibles moléculaires de la sphingosine.

Dans les fibroblastes, le gène *c-ets1* apparaît comme une cible commune d'agents pro-prolifératifs (PMA, sérum, diacylglycérol) et d'agents pro-apoptotiques (stress cellulaires, cytokines pro-inflammatoires, céramide, sphingosine, D609, inhibiteurs de PKCs), bien qu'aucune corrélation stricte n'ait été établie entre l'expression de *c-ets1* et la prolifération, l'apoptose, ou la survie des fibroblastes face aux stress cellulaires.

Enfin, un pseudosubstrat inhibiteur pour la PKC α induit préférentiellement l'apoptose des cellules tumorales HeLa, alors que les fibroblastes normaux y sont relativement résistants. Par contre, les deux types cellulaires sont similairement très sensibles à la cytotoxicité apoptotique d'un pseudosubstrat inhibiteur pour la PKC ζ . Ceci suggère une application possible des pseudosubstrats inhibiteurs de PKCs comme agents antitumoraux.

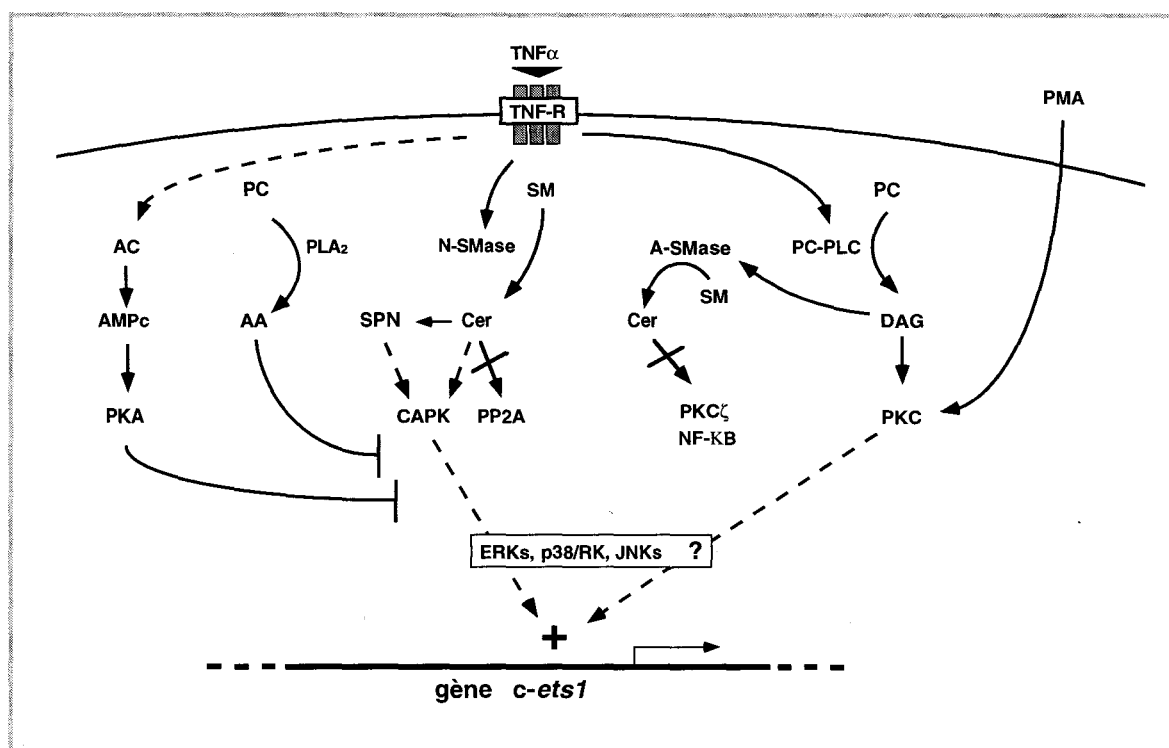


Figure 26 : Modèle de la signalisation intracellulaire du TNF α impliquée dans l'activation du gène *c-ets1* dans les fibroblastes. La voie de transduction reliant les récepteurs pour le TNF α et le gène *c-ets1* impliquerait l'activation d'une sphingomyélinase neutre (N-SMase), qui induit la production du second messager céramide (Cer) à partir de son précurseur lipidique membranaire la sphingomyéline (SM). Le céramide et/ou son métabolite la sphingosine (SPN) activeraient les protéine kinases "dirigées par la proline" : CAPK et MAPK (ERKs, JNKs ou p38/RK). L'activation des voies de transduction de l'AMPc ou de l'acide arachidonique (AA) bloquerait cette voie de signalisation et ainsi l'induction de *c-ets1* par le TNF α . En parallèle, l'activation de voies de signalisation impliquant des protéine kinases C (PKC) sensibles au PMA est également capable d'induire l'expression du gène *c-ets1*.

**DISCUSSION GENERALE
ET
CONCLUSION**

DISCUSSION GENERALE

Au cours de cette étude, nous avons abordé différents niveaux de la régulation de l'expression du proto-oncogène *c-ets1* dans des fibroblastes humains normaux en culture. L'analyse comparée de l'effet des stimuli extracellulaires, de la manipulation des seconds messagers et des protéine kinases sur l'expression de *c-ets1* nous a permis d'émettre quelques hypothèses sur les mécanismes intracellulaires impliqués dans la régulation du gène *c-ets1* ainsi que sur les rôles possibles des facteurs de transcription Ets1 dans les fibroblastes.

I - LE PROTO-ONCOGENE *c-ets1* EST UNE CIBLE COMMUNE POUR DES STIMULI VARIES

Des stimuli extracellulaires très divers sont capables d'induire l'augmentation de l'expression de *c-ets1* dans les fibroblastes. Ces stimuli comprennent des cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-1 α), des facteurs de croissance (bFGF, EGF, PDGF), le sérum, un ester de phorbol (PMA), des stress cellulaires (hyperosmolarité, hyperthermie), ou des inhibiteurs de synthèse protéique (anisomycine, cycloheximide). Ils n'induisent cependant pas l'expression de *c-ets1* avec une même efficacité. Les plus efficaces d'entre eux, qui ont un effet rapide (en moins de 4 heures), comprennent les cytokines pro-inflammatoires, le sérum, le PMA, les stress cellulaires, les inhibiteurs de synthèse protéique. Par contre, l'action des facteurs de croissance est plus tardive (après plus de 12 heures) et elle pourrait résulter d'effets secondaires et indirects.

Ces différents stimuli sont susceptibles d'induire dans les fibroblastes des réponses cellulaires différentes qui peuvent être paradoxalement antagonistes. Le sérum, les facteurs de croissance et les esters de phorbol ont principalement un effet mitogène, alors que les stress cellulaires, les cytokines pro-inflammatoires et les inhibiteurs de la traduction ont en commun la capacité de d'induire un arrêt de la croissance et la mort des cellules par apoptose. De plus, certains des stimuli capables d'induire l'expression de *c-ets1* ont des effets cumulatifs lorsqu'ils sont associés. Les facteurs de croissance potentialisent l'action du TNF α . Par contre, l'effet du PMA, de la cycloheximide ou de l'anisomycine est strictement additif à celui du TNF α . Ceci suggère que des

voies de transduction différentes, indépendantes ou convergentes, interviennent dans la signalisation de ces différents stimuli pour l'induction de l'expression de *c-ets1* dans les fibroblastes. Paradoxalement, l'expression de *c-ets1* peut donc être induite aussi bien par des stimuli susceptibles de favoriser la prolifération cellulaire, que par des stimuli susceptibles d'induire un arrêt de la croissance cellulaire. Les facteurs de transcription Ets1 pourraient par conséquent intervenir soit dans une réponse cellulaire indépendante de la croissance cellulaire, soit dans une sensibilisation des fibroblastes à un contrôle de la prolifération en fonction de l'environnement. L'hypothèse privilégiée est cependant l'existence d'au moins deux types de signalisations qui convergent au niveau du gène *c-ets1*, et cette dichotomie se retrouve à divers niveaux intracellulaires.

II - LA DIVERSITE DES STIMULI SE RETROUVE AU NIVEAU DES SECONDS MESSAGERS

En abordant l'étude de la signalisation du $\text{TNF}\alpha$, nous avons montré que différents types de seconds messagers sont capables d'induire l'expression de *c-ets1* dans les fibroblastes : un analogue du diacylglycérol, son analogue fonctionnel le PMA, des analogues de céramide, et la sphingosine.

Deux hypothèses peuvent expliquer l'effet inducteur du diacylglycérol sur l'expression du gène *c-ets1*. Le diacylglycérol est susceptible d'activer deux types d'enzymes intervenant dans la signalisation du $\text{TNF}\alpha$: des protéine kinases C et l'A-SMase. Cependant, une déplétion des fibroblastes en activités protéine kinases C sensibles au PMA (PKC conventionnelles et nouvelles) par une longue exposition au PMA, inhibe l'action du diacylglycérol et celle du PMA sur l'expression de *c-ets1*. Une telle déplétion n'a par contre aucun effet sur l'induction de *c-ets1* par le $\text{TNF}\alpha$. Ceci suggère d'une part que l'effet du diacylglycérol tout comme celui du PMA est médié par des protéine kinases C conventionnelles ou nouvelles, d'autre part que le diacylglycérol n'est sans doute pas impliqué dans la signalisation du $\text{TNF}\alpha$ conduisant à l'augmentation de l'expression du gène *c-ets1*. Par conséquent, ce n'est donc pas *via* l'activation de l'A-SMase que le diacylglycérol est capable d'induire *c-ets1*.

Par ailleurs, des analogues de céramide, le C2-céramide préférentiellement au C8-céramide, peuvent également induire une augmentation de l'expression de *c-ets1* dans les fibroblastes. Nous avons montré que le $\text{TNF}\alpha$ active effectivement des sphingomyélinases, l'A-SMase et la N-SMase, dans les fibroblastes, enzymes qui sont responsables de l'augmentation transitoire du taux de céramide membranaire. De plus, l'acide arachidonique, qui inhibe l'induction de *c-ets1* par le céramide ou la sphingomyélinase, inhibe aussi l'induction de *c-ets1* par le $\text{TNF}\alpha$. L'ensemble de ces résultats suggère que le céramide est le second messenger impliqué dans la signalisation du $\text{TNF}\alpha$ conduisant à l'induction de l'expression du gène *c-ets1*. Cependant, la sphingosine est plus efficace que les analogues de céramide pour induire l'augmentation de l'expression de *c-ets1*. L'effet du céramide pourrait donc dépendre de sa conversion rapide en sphingosine par l'action d'une céramidase. La sphingosine induit des réponses propres qui conduisent à l'arrêt de la prolifération cellulaire. Elle peut également induire des réponses qui dépendent de sa conversion rapide en sphingosine-1-phosphate par une sphingosine kinase. Celle-ci exerce à l'inverse de la sphingosine un effet mitogène qui dépend de la mobilisation du calcium à partir de réservoirs intracellulaires, ou de la production d'acide phosphatidique par l'activation de phospholipases D. La production d'acide phosphatidique est susceptible d'induire une élévation de la concentration membranaire en diacylglycérol ; l'effet du céramide sur l'expression de *c-ets1* pourrait ainsi dépendre d'une production de diacylglycérol. Or une mobilisation durable du calcium intracellulaire susceptible de se produire lors d'une stimulation des fibroblastes par la bradykinine en présence de chlorure de lithium (qui bloque le catabolisme de l' IP_3), n'a aucun effet sur l'expression basale ou induite de *c-ets1* (données non montrées). De la même façon, l'application de phospholipase D exogène sur les fibroblastes n'a aucun effet sur l'expression de *c-ets1* (données non montrées). Ceci suggère que l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire ou l'activation de phospholipase D, et donc la sphingosine-1-phosphate n'interviennent pas dans l'induction de l'expression de *c-ets1* par le céramide ou la sphingosine. Pour écarter définitivement cette hypothèse, il serait possible d'utiliser la DL-thréo-dihydrosphingosine qui bloque spécifiquement l'activité de la sphingosine kinase, et ainsi la production de sphingosine-1-phosphate à partir de sphingosine.

L'expression de *c-ets1* semble donc être induite dans les fibroblastes par deux types de seconds messagers, d'une part le diacylglycérol et d'autre part le céramide et la sphingosine. Ces deux types de seconds messagers seraient impliqués dans des signalisations différentes : l'une d'elles impliquerait la production de diacylglycérol et l'activation de certaines protéine kinases C sensibles au PMA ; l'autre impliquerait la production de céramide et de cibles moléculaires non encore déterminées. Les effets inducteurs du TNF α et du PMA, un analogue du diacylglycérol, sur l'expression de *c-ets1* sont strictement additifs ; ce qui suggère que ces deux voies de transduction sont indépendantes.

De plus, ces deux voies de signalisation sont susceptibles d'intervenir dans des réponses cellulaires antagonistes dans le contrôle de la croissance cellulaire. Le diacylglycérol et le PMA sont impliqués dans des réponses mitogènes, alors que le céramide et la sphingosine sont plutôt impliqués dans l'arrêt de la croissance cellulaire et dans la mort cellulaire par apoptose (pour revue voir Spiegel et al., 1996). Le C2-céramide et la sphingosine sont d'ailleurs cytotoxiques à forte concentration sur les fibroblastes et induisent une fragmentation nucléosomale de l'ADN qui est caractéristique de l'apoptose.

On retrouve donc au niveau des seconds messagers l'existence de deux types de signaux, qui impliquent respectivement la production de diacylglycérol ou de céramide, sont capables d'induire l'expression de *c-ets1*, et ont potentiellement des effets antagonistes sur la croissance cellulaire des fibroblastes. L'étude des seconds messagers reproduit donc au niveau de la membrane l'effet observé avec les stimuli extracellulaires. Deux types de signaux indépendants semblent capables d'activer l'expression de *c-ets1* dans les fibroblastes : certains potentiellement impliqués dans des réponses mitogènes tel que le diacylglycérol, et d'autre potentiellement impliqués dans des réponses anti-prolifératives voire apoptotiques tels que le céramide et la sphingosine.

III - QUEL TYPE DE SPHINGOMYELINASE EST IMPLIQUE DANS L'ACTIVATION DE *c-ets1* PAR LE TNF α ?

Dans la signalisation du TNF α , l'induction de l'expression de *c-ets1* dépend de l'activation d'une sphingomyélinase, de la production résultante de céramide et de la conversion de celui-ci en sphingosine par une céramidase. Cependant, nos données n'ont pour l'instant pas permis de

définir quel type de sphingomyélinase est impliqué dans l'induction de l'expression de *c-ets1*. Aussi bien la sphingomyélinase de type neutre (N-SMase) que la sphingomyélinase de type acide (A-SMase) sont activées par le TNF α dans les fibroblastes. Or chacune d'elles est susceptible de transmettre des réponses différentes voire antagonistes. La N-SMase est impliquée dans l'activation de la CAPK, des MAPKs et de la phospholipase A2. Les MAPKs ont un rôle évident dans la prolifération cellulaire, alors que la phospholipase A2 est impliquée dans les réponses inflammatoires du TNF α . Par contre, l'A-SMase, qui induit l'activation du facteur de transcription NF-KB et probablement de la cascade des SAPKs, est susceptible d'être impliquée dans la réponse cytotoxique du TNF α . Comme il n'existe pour l'instant pas d'inhibiteurs spécifiques pour l'une ou l'autre de ces enzymes, nous avons cherché à évaluer leur participation respective dans la régulation de l'expression de *c-ets1* de manière indirecte.

Dans des cultures primaires de fibroblastes isolés de patients atteints de la maladie de Niemann-Pick de type A et caractérisés par une déficience héréditaire en activité A-SMase, le TNF α est encore capable d'induire l'expression de *c-ets1*. Ceci suggère que l'activité de l'A-SMase n'est pas indispensable dans la transduction du signal d'activation du gène *c-ets1* par le TNF α . Par ailleurs, l'activation de l'A-SMase par le TNF α requiert la production de diacylglycérol par une PC-PLC. Or l'inhibition de celle-ci par le D609 induit l'expression de *c-ets1* de manière dose-dépendante. L'activation de l'A-SMase dépend également de la fusion des lysosomes et des endosomes. La vinblastine, qui empêche cette fusion augmente l'expression de *c-ets1*. L'activité de l'A-SMase dépend aussi d'un pH acide dans les endo-lysosomes. L'augmentation de celui-ci par la monensine et le chlorure d'ammonium, ce qui est susceptible de bloquer l'action de l'A-SMase, entraîne également une augmentation de l'expression de *c-ets1*. Enfin, en aval de l'A-SMase, l'inhibition de la PKC ζ par son pseudosubstrat inhibiteur spécifique, augmente l'expression de *c-ets1*. L'ensemble de ces résultats suggère que l'inhibition de l'activation ou de l'activité de l'A-SMase, ainsi que l'inhibition de la PKC ζ en aval de l'A-SMase, induisent une augmentation de l'expression de *c-ets1*. Donc, la voie de transduction TNF α -> PC-PLC -> A-SMase -> PKC ζ est susceptible de réprimer l'expression de *c-ets1* dans les fibroblastes.

Certains indices permettent de supposer que la N-SMase pourrait être impliquée dans l'induction de *c-ets1*. Les mécanismes intervenant au cours de la sénescence des cellules ou au cours de l'apoptose sont susceptibles d'impliquer des événements similaires, notamment l'activation de sphingomyélinase et la production résultante de céramide (Kahn, 1996). De plus, l'activité basale de la N-SMase est augmentée dans les cellules sénescents et est responsable d'une élévation du taux de céramide endogène (Venable et al., 1995). Dans les fibroblastes, nous avons observé un taux d'expression de *c-ets1* très faible à des passages précoces (inférieur à p20), alors qu'il est plus élevé dans les cultures à des passages plus tardifs (de p25 à p35).

Par ailleurs, la N-SMase est impliquée dans certains modes d'induction de l'apoptose, en particulier sous l'effet de certains inhibiteurs de PKCs, staurosporine, calphostine C et chlorure de chelerythrine (Chmura et al., 1996). Dans les fibroblastes, l'utilisation de lipopeptides pseudosubstrats inhibiteurs montre que l'inhibition de certaines protéine kinases C, notamment la PKC ζ , induit conjointement une augmentation de l'expression du gène *c-ets1* et une mort cellulaire par apoptose des fibroblastes. Nous n'avons cependant pas mesuré l'effet des inhibiteurs de PKCs moins spécifiques (staurosporine, calphostine C et chlorure de chelerythrine) sur l'expression basale de *c-ets1* à un temps où ils induisent l'apoptose des fibroblastes (plus de 24 heures).

Nos données suggèrent que la N-SMase plutôt que l'A-SMase serait impliquée dans la signalisation du TNF α conduisant à l'activation du gène *c-ets1*. Cependant, les signalisations intracellulaires du TNF α ne sont probablement pas monodirectionnelles. Si la N-SMase est impliquée dans des réponses cytotoxiques, notamment lors de l'apoptose induite par des inhibiteurs de PKCs, elle peut aussi jouer un rôle dans l'activation des MAPKs, et donc dans des réponses prolifératives. Inversement, l'A-SMase est impliquée dans la transmission de signaux cytotoxiques et apoptotiques du TNF α . Elle peut aussi conduire à l'activation de la PKC ζ dont le rôle essentiel dans l'activation des MAPKs et dans la prolifération est clairement démontré. Les données actuelles sur les fonctions et les modes d'activation des différents types de sphingomyélinases sont encore controversées. Elles laissent cependant envisager l'existence de cofacteurs potentiellement associés aux récepteurs pour le TNF α et qui conditionnent les types de

réponses cellulaires développées par chaque sphingomyélinase en fonction du type cellulaire et de l'environnement.

L'implication de la N-SMase dans l'activation du gène *c-ets1* pourrait être confirmée par l'utilisation de mutants de récepteurs TNF-R1. En effet, l'activation de chaque type de sphingomyélinase dépend de domaines différents dans la partie cytoplasmique de TNF-R1 (Wiegmann et al., 1994; Adam et al., 1996). Si le signal d'activation de *c-ets1* par le TNF α est transmis par le "Traf Domain" plutôt que par le "Death Domain", ceci confortera l'hypothèse de l'implication de la N-SMase. Cependant, la preuve irréfutable ne sera apportée que par l'inactivation des gènes pour la N-SMase ou l'A-SMase. Par ailleurs, il est possible qu'un autre type de sphingomyélinase soit impliqué dans la signalisation du TNF α conduisant à l'activation du gène *c-ets1*. Une sphingomyélinase neutre Mg²⁺-indépendante, et une sphingomyélinase fonctionnant à pH alcalin ont récemment été mises en évidence mais leur rôle est encore inconnu.

IV - LE ROLE DE Ets1 DANS LES REPONSES CELLULAIRES AU TNF α DEPEND DU TYPE DE MAPK IMPLIQUE DANS L'EXPRESSION DU GENE *c-ets1*.

Dans les fibroblastes, l'expression de *c-ets1* est induite par des activateurs des "protéine kinases activées par les mitogènes" de type ERKs : facteurs de croissance, esters de phorbol ou sérum. Cette expression est également induite par des activateurs des "protéine kinases activées par les stress", JNKs et p38RK : cytokines pro-inflammatoires, choc thermique, choc osmotique, anisomycine ou cycloheximide. Ces trois types de MAP kinases, ERKs, JNKs et p38RK, peuvent être activés par le TNF α . Ils sont cependant impliqués dans des réponses cellulaires différentes : les ERKs interviennent dans des signalisations conduisant à une prolifération cellulaire ; les JNKs interviennent dans la transmission des signaux d'inhibition de la croissance et dans l'induction de l'apoptose ; la p38/RK est susceptible d'intervenir dans la survie des cellules face à des stress cellulaires.

Plusieurs arguments suggèrent que *c-ets1* pourrait être un gène cible commun aux voies de transduction des ERKs et des JNKs : (1) Le PMA et le diacylglycérol induisent efficacement l'expression de *c-ets1* et l'action première de ces facteurs est l'activation de protéine kinases C.

Celles-ci sont impliquées de façon privilégiée dans la transduction de signaux mitogènes par activation de la cascade des ERKs (Marquardt *et al.*, 1994 ; Berra *et al.*, 1995). (2) Différents stress cellulaires induisent également l'expression de *c-ets1*, et ces stress activent les JNKs qui sont impliquées dans l'induction de l'apoptose induite par le $\text{TNF}\alpha$, l'IL-1 α , la voie de la sphingomyéline et les stress. (3) Certains auteurs ont montré que l'activation des ERKs et des JNKs par le $\text{TNF}\alpha$ dépend de la production de céramide (Raines *et al.*, 1993; Westwick *et al.*, 1995), et nous avons montré que le céramide est capable d'induire l'expression du gène *c-ets1* dans les fibroblastes. (4) L'activation de la cascade des ERKs conduit notamment à l'activation du facteur de transcription p62^{TCF}/Elk1 et celle des JNKs conduit à l'activation des facteurs de transcription Elk-1 et c-Jun. Le promoteur du gène *c-ets1* contient des séquences EBS et AP-1 qui sont nécessaires pour son activation. La séquence EBS est reconnue les facteurs de transcription de la famille Ets à laquelle appartient Elk-1. La séquence AP-1 est reconnue par les facteurs de transcription AP-1, et en particulier par les dimères c-Jun. L'activation de Elk-1 en aval de la cascade des ERKs et celle de Elk-1 et de c-Jun en aval de la cascade des JNKs sont donc susceptibles d'intervenir dans l'induction de la transcription du gène *c-ets1*. (5) L'aptitude plus faible des facteurs de croissance par rapport aux cytokines pro-inflammatoires s'expliquerait ainsi par le recrutement de Elk-1 seul, ou de Elk-1 et de c-jun respectivement. Ceci expliquerait également l'effet synergique observé entre ces différents stimuli : les facteurs de croissance potentialisent l'action du $\text{TNF}\alpha$, et les effets du PMA et du $\text{TNF}\alpha$ sont additifs. Cet effet résulterait d'une coopération des facteurs de transcription Elk-1 et c-Jun au niveau du promoteur de *c-ets1*.

Cependant, une irradiation par les UV-C, qui est susceptible d'activer les JNKs et qui entraîne effectivement une mort cellulaire par apoptose des fibroblastes, est incapable d'augmenter l'expression de *c-ets1*. Par ailleurs, l'expression de *c-ets1* induite par les facteurs de croissance, est bien moindre et plus tardive que celle induite par le PMA ou par le sérum. Ces résultats pourraient remettre en cause l'hypothèse de *c-ets1* comme étant une cible commune aux cascades des ERKs et des JNKs. Une deuxième hypothèse est celle de l'implication de la p38/RK dans la signalisation responsable de l'activation du gène *c-ets1* par le $\text{TNF}\alpha$. Bien que cette voie soit encore très mal connue, nous savons qu'elle peut être activée par les cytokines pro-inflammatoires

TNF α et IL-1, ainsi que par différents stress cellulaires. Grâce aux études réalisées sur son homologue HOG-1 chez la levure, nous pouvons supposer que la p38/RK intervient dans la résistance cellulaire aux stress (voir la revue de Cano et al., 1996). La p38/RK active la MAPKAP kinase 2 qui phosphoryle des petites protéines de choc thermique, hsp25 et hsp 27. Celles-ci pourraient favoriser des mécanismes de réparation et permettre ainsi la survie des cellules face aux stress. La p38/RK est également impliquée dans l'induction du gène codant l'interleukine-6 en réponse au TNF α . Or, l'activation de ce gène pourrait dépendre de la fixation de facteurs de transcription Ets sur les séquences EBS de son promoteur (voir le Tableau 1). De plus, les expériences de recombinaison homologue du gène *c-ets1* dans le système RAG-2 ont montré que l'inactivation de *c-ets1* augmente la susceptibilité des cellules lymphoïdes à entamer un programme de mort cellulaire par apoptose. Les protéines Ets1 pourraient par conséquent être impliquées dans des mécanismes de protection cellulaire contre l'apoptose, ce qui est compatible avec une activation du gène *c-ets1* en aval de la p38/RK. De plus, bien que des stimuli proapoptotiques soient capables d'induire l'expression de *c-ets1* dans les fibroblastes, l'analyse globale de cette expression par Northern blot ne permet pas de déterminer si les cellules qui expriment *c-ets1* sont les mêmes que celles qui entrent en apoptose. Ces deux phénomènes pourraient être indépendants et survenir dans des cellules distinctes. L'hypothèse de l'implication de la p38/RK dans l'induction de *c-ets1* par le TNF α est donc envisageable.

Pour trancher entre ces différentes hypothèses, la contribution de la p38/RK ou des ERKs dans l'induction de l'expression de *c-ets1* par le TNF α , seront prochainement abordées par l'utilisation d'agents pharmacologiques capables d'inhiber spécifiquement ces activités, respectivement le SB203580 (Beyaert et al., 1996) et le PD98059 (Pang et al., 1995; Langlois et al., 1995; Alessi et al., 1995; Waters et al., 1995; Dudley et al., 1995).

La détermination d'une corrélation entre le type de réponse cellulaire au TNF α , prolifération ou apoptose ou survie, et l'expression du gène *c-ets1* dans les fibroblastes implique une analyse approfondie des médiateurs des voies de transduction du TNF α , et en particulier du type de sphingomyélinase et du type de MAPK (ERKs, JNKs ou p38/RK) qui interviennent dans la signalisation du TNF α responsable de l'induction du gène *c-ets1*.

CONCLUSION

Cette étude prospective a permis de déterminer différents niveaux de la régulation de l'expression du proto-oncogène *c-ets1* dans des cultures primaires de fibroblastes humains. Nous avons tout d'abord mis en évidence différents effecteurs extracellulaires capables d'induire l'expression de *c-ets1 in vitro*. Ces effecteurs comprennent des cytokines et des facteurs de croissance, dont la production *in vivo* dans les carcinomes suggère qu'ils pourraient être impliqués dans l'induction de l'expression de *c-ets1* dans les fibroblastes du stroma tumoral. Le Tumor Necrosis factor-alpha ($\text{TNF}\alpha$) apparaît comme l'un des meilleurs stimulateurs rencontrés ; il est capable d'induire rapidement une expression élevée de *c-ets1* qui résulte d'une activation transcriptionnelle du gène *c-ets1*.

Nous avons également décrypté quelques aspects du réseau complexe des signalisations intracellulaires qui interviennent dans le contrôle positif ou négatif de l'expression du gène *c-ets1*, et mis en évidence l'existence d'au moins deux voies de transduction capables d'activer *c-ets1*. La première est activable par le PMA et implique des PKCs sensibles aux esters de phorbol. La deuxième est activable par le $\text{TNF}\alpha$, implique l'activation de sphingomyélinases. La poursuite de l'exploration des signalisations du $\text{TNF}\alpha$ renseignera à la fois sur la nature des médiateurs (protéine kinases, facteurs de transcription, etc) situés entre les sphingomyélinases et le promoteur du gène *c-ets1*, et sur le type de réponse cellulaire (prolifération, apoptose ou survie) associé avec l'expression de *c-ets1* dans les fibroblastes.

ANNEXE

ANNEXE

A - RT-PCR

Oligonucléotides utilisés :

nom	localisation	orientation	séquence (5'→3')
A5	<i>c-ets-1</i> /exon III	sens	TCACTAAAGAACAGCAACGACT
E7	<i>c-ets-1</i> /exon VIII	antisens	ATTTATCAGTGAGTAATTCCA
BR	<i>c-ets-1</i> /jonction intron VI-exon VII	sens	AGGCTTGTCCTTATTGAG
Z	<i>c-ets-1</i> /exon VII	antisens	TTTACCTCCAGGTAAACT
G5	GAPDH/exon 5	sens	GTCTTCACCACCATGGAG
G3	GAPDH/exon 7	antisens	CCAAAGTTGTCATGGATGACC

Transcription reverse (RT) :

La transcription reverse d'1 µg ARNs totaux est réalisée avec la transcriptase inverse du virus aviaire leucémogène de Moloney (M-MLV, Gibco BRL) dans son tampon de réaction additionné de 10 mM DTT (Gibco BRL), 40 U de RNAsin (Promega), 1 µg d'albumine sérique bovine acétylée (BSA, Promega), 5 µM d'oligonucléotides de séquence aléatoire (random hexamers, Perkin Elmer), 2,5 mM de chaque désoxyribonucléotide triphosphate (Pharmacia), pendant 30 min à 42°C.

Réaction en chaîne par la polymérase (PCR) :

Un dixième du volume de la transcription reverse est amplifié par PCR avec l'AmpliTaq DNA polymérase (Perkin Elmer) dans son tampon de réaction additionné de 2,5 mM de chaque désoxyribonucléotide triphosphate, 250 ng d'oligonucléotides 5' et 3' (Eurogentec), 2,5 mM de MgCl₂, et 0,5 µCi [³²P]dCTP (3000 Ci/mmol, Dupont). Vingt cinq cycles sont effectués ; chaque cycle comprend une dénaturation de l'ADN pendant 1 min à 94°C, une hybridation des oligonucléotides pendant 1 min à 55°C et une extension d'amorce pendant 1,5 min à 72°C.

Séparation des amplimères sur gel de polyacrylamide :

Les produits d'amplification sont séparés sur gel de polyacrylamide à 6% en tampon TBE, parallèlement au marqueur de poids moléculaire PHA/HinfI marqué en 5' à l'[$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP par phosphorylation avec une polynucléotide kinase. Après migration à 24 mA, le gel est séché et mis en exposition contre un film d'autoradiographie (Hyperfilm-MP, Amersham) pendant plusieurs heures à -80°C .

Taille des produits d'amplification :

ARNs alternatifs de *c-ets1* avec les oligonucléotides A5 et E7 : T, 989 pb ; ΔIV , 677 pb ; ΔVII , 667 pb ; $\Delta\text{IV-VII}$, 415 pb. ARNs sous-génomiques *c-ets1* avec les oligonucléotides BR et Z : 238 pb. ARNs GAPDH avec les oligonucléotides G5 et G3 : 206 pb.

B - ANALYSE DE LA FRAGMENTATION NUCLEOSOMIQUE DE L'ADN LORS DE L'APOPTOSE

Les cellules sont cultivées jusqu'à subconfluence dans des boîtes de 60 mm de diamètre. Après traitement, les cellules sont rincées avec du PBS, puis sont lysées dans un tampon contenant 10 mM de Tris-HCl pH 7,4, 10 mM d'EDTA, 1% de Triton et 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de protéinase K (Sigma) à 37°C pendant une nuit. L'ADN génomique est alors extrait par la méthode du phénol/chloroforme/alcool isoamylique [25:24:1], puis est précipité pendant une nuit à -20°C à l'isopropanol en présence de 0,5 M final de NaCl. Après centrifugation à 12.000g pendant 30 min à 4°C , le culot d'ADN est repris dans de l'eau. Un microgramme d'ADN est alors marqué pendant 30 min avec 0,3 U de Kleenow (Grand fragment de l'ADN polymérase d'E.coli, GIBCO-BRL), 1 μCi de [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP (3.000 Ci/mmol, DUPONT) dans un tampon contenant 5 mM de Tris-HCl pH 7,5 et 10 mM de MgCl_2 , dans un volume final de 20 μl . La réaction est ensuite arrêtée par l'addition de 5 μl d'EDTA 50 mM. La moitié du volume de chaque échantillon est ensuite déposée sur un gel d'agarose à 2p.100 (p/v) en tampon TBE et l'ADN est séparé par électrophorèse. Le gel d'agarose est enfin séché et exposé pendant quelques heures contre un film d'autoradiographie Hyperfilm MP (Amersham).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adam, D., Wiegmann, K., Adam-Klages, S., Ruff, A. and Krönke, M. (1996). A novel cytoplasmic domain of the p55 tumor necrosis factor receptor initiates the neutral sphingomyelin pathway. *J. Biol. Chem.* 271, 14617-14622.

Aggarwal, B. B. and Natarayan, K. (1996). Tumor Necrosis factors: Developments during the last decade. *Eur. Cytokine Netw.* 7, 93-124.

Aggarwal, S., Drysdale, B.-E. and Shin, H. S. (1988). Tumor necrosis factor mediated cytotoxicity involves ADP-ribosylation. *J. Immunol.* 140, 4187-4192.

Alessi, D. R., Gomez, N., Moorhead, G., Lewis, T., Keyse, S. M. and Cohen, P. (1995). Inactivation of p42 MAP kinase by protein phosphatase 2A and a protein tyrosine phosphatase, but not CL100, in various cell lines. *Curr. Biol.* 5, 283-295.

Alessi, D. R., Cuenda, A., Cohen, P., Dudley, D. T. and Saltiel, A. R. (1995) PD 98059 is a specific inhibitor of the activation of the mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* 270, 27489-27494.

Baiocchi, G., Kavanagh, J. J., Talpaz, M., Wharton, J. T., Gutterman, J. U. and Kurzrock, R. (1991). Expression of the macrophage colony stimulating factor and its receptor in gynecologic malignancies. *Cancer* 67, 990.

Baker, S. J. and Reddy, E. P. (1996). Transducers of life and death: TNF receptor superfamily and associated proteins. *Oncogene* 12, 1-9.

Balkwill, F. R. (1994). Cytokine therapy of cancer. The importance of knowing the context. *Eur. Cytokine Netw.* 5, 379-385.

Bauknecht, T., Kiechle, M., Bauer, G. and Siebers, J. W. (1986). Characterization of growth factors in human ovarian carcinomas. *Cancer Res.* 46, 2614-2618.

Beaven, M. A. (1996). Calcium signalling: sphingosine kinase versus phospholipase C? *Curr. Biol.* 6, 798-801.

Beissert, S., Bergholz, M., Waase, I., Lepsien, G., Schauer, A., Pfizenmaier, K. and Krönke, M. (1989). Regulation of tumor necrosis factor gene expression in colorectal adenocarcinoma : *In vivo* analysis by *in situ* hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 5064-5068.

Belka, C., Wiegmann, K., Adam, D., Holland, R., Neuloh, M., Herrmann, F., Kronke, M. and Brach, M. A. (1995). Tumor necrosis factor (TNF)-alpha activates c-raf-1 kinase via the p55 TNF receptor engaging neutral sphingomyelinase. *Embo J* 14, 1156-65.

Bennicelli, J. L., Elias, J., Kern, J. and Guerry IV, D. (1989). Production of interleukin 1 activity by cultured human melanoma cells. *Cancer Res.* 49, 930-935.

Berger, A., Rosenthal, D. and Spiegel, S. (1995). Sphingosylphosphocholine, a signaling molecule which accumulates in Niemann-Pick disease type A, stimulates DNA-binding activity of the transcription activator protein AP-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5885-9.

Berra, E., Diaz-Meco, M. T., Dominguez, I., Municio, M. M., Sanz, L., Lozano, J., Chapkin, R. S. and Moscat, J. (1993). Protein Kinase C z Isoform Is Critical For Mitogenic Signal Transduction. *Cell* 74, 555-563.

Berra, E., Diaz-Meco, M. T., Lozano, J., Frutos, S., Municio, M. M., Sanchez, P., Sanz, L. and Moscat, J. (1995). Evidence for a role of MEK and MAPK during signal transduction by protein kinase C z. *EMBO J.* 14, 6157-6163.

Berridge, M. J. and Irvine, R. F. (1984). Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 312, 315-321.

Beyaert, R., Cuenda, A., Vanden Berghe, W., Plaisance, S., Lee, J. C., Haegeman, G., Cohen, P. and Fiers, W. (1996). The p38/RK mitogen-activated protein kinase pathway regulates interleukin-6 synthesis in response to tumour necrosis factor. *EMBO J.* 15, 1914-1923.

Beyaert, R. and Fiers, W. (1994). Molecular mechanisms of tumor necrosis factor-induced cytotoxicity. What we do understand and what we do not. *Febs Lett.* 340, 9-16.

Bhat, N. K., Fisher, R. J., Fujiwara, S., Ascione, R. and Papas, T. S. (1987). Temporal and tissue-specific expression of mouse ets genes. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 84, 3161-3165.

Bhat, N. K., Komschlies, K. L., Fujiwara, S., Fisher, R., Mathieson, B. J., Gregorio, T. A., Young, H. A., Kasik, J. W., Ozato, K. and Papas, T. S. (1989). Expression of ets genes in mouse thymocyte subsets and T cells. *J. Immunol.* 142, 672-678.

Bhat, N. K., Fischinger, P. J., Seth, A., Watson, D. K. and Papas, T. (1996). Pleiotropic functions of EtS-1 (Review). *International Journal of Oncology* 8, 841-846.

Bhat, N. K., Thompson, C. B., Lindsten, T., June, C. H., Fujiwara, S., Koizumi, S., Fisher, R. J. and Papas, T. S. (1990). Reciprocal expression of human ets1 and ets2 genes during T-cell activation : regulatory role for the proto-oncogene ets1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 3723-3727.

Bigda, J., Beletsky, I., Brakebusch, C., Varfolomeev, Y., Engelmann, H., Bigda, J., Holtmann, H. and Wallach, D. (1994). Dual role of the p75 tumor necrosis factor (TNF) receptor in TNF cytotoxicity. *J Exp Med* 180, 445-60.

Birnbaumer, L. and Brown, A. M. (1990). G proteins and the mechanism of action of hormones, neurotransmitters, and autocrine and paracrine regulatory factors. *Am. Rev. Respir. Dis.* 141, S106-S114.

Blumer, K. J. and Johnson, G. L. (1994). Diversity in function and regulation of MAP kinase pathways. *T.I.B.S.* 19, 236-240.

Boldin, M. P., Goncharov, T. M., Goltsev, Y. V. and Wallach, D. (1996). Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 85, 803-815.

Bolon, I., Gouyer, V., Devouassoux, M., Vandebunder, B., Wernert, N., Moro, D., Brambilla, C. and Brambilla, E. (1995). Expression of c-ets-1, collagenase 1, and urokinase-type plasminogen activator genes in lung carcinomas. *Am J Pathol* 147, 1298-1310.

Bories, J.-C., Willerford, D. M., Grevin, D., Davidson, L., Camus, A., Martin, P., Stéhelin, P. and Alt, F. W. (1995) Increased T-cell apoptosis and terminal B-cell differentiation induced by inactivation of the Ets-1 proto-oncogene. *Nature* 377, 635-638.

Börset, M., Medvedev, A. E., Sundan, A. and Espevik, T. (1996). The role of the two TNF receptors in proliferation, NF-kappa b activation and discrimination between TNF and LT alpha signalling in the human myeloma cell line OH-2. *Cytokine* 8, 430-438.

Bosselut, R., Levin, J., Adjadj, E. and Ghysdael, J. (1993). A single amino-acid substitution in the Ets domain alters core DNA binding specificity of Ets1 to that of the related transcription factors Elf1 and E74. *Nucleic Acids Res* 21, 5184-91.

Boulukos, K. E., Pognonec, P., Rabault, B., Begue, A. and Ghysdael, J. (1989). Definition of an Ets1 protein domain required for nuclear localization in cells and DNA-binding activity in vitro. *Mol Cell Biol* 9, 5718-21.

Boyer, B., Jouanneau, J., Tucker, G., Vallés, A. M., Sastre, X., Moens, G. and Thiéry, J.-P. (1990). La métastase cancéreuse. *Medecine Sci.* 6, 433-442.

Breitmayer, J.-P., Bernard, A. and Aussel, C. (1994). Regulation of sphingomyelinase and sphingosine of Ca²⁺ signals elicited by CD3 monoclonal antibody, thapsigargin, or ionomycin in the Jurkat T cell line. *J. Biol. Chem.* 269, 5054-5058.

Brenner, D. A., O'Hara, M., Angel, P., Chojkier, M. and Karin, M. L. (1989). Prolonged activation of jun and collagenase genes by tumour necrosis factor- α . *Nature* 337, 661-663.

Bronzert, D. A., Pantazis, P., Antoniadis, H. N., Kasid, A., Davidson, N., Dickson, R. B. and Lippman, M. E. (1987). Synthesis and secretion of platelet-derived growth factor by human breast cancer cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *84*, 5763-5767.

Burch, R. M. and Tiffant, C. W. (1989). Tumor necrosis factor causes amplification of arachidonic acid metabolism in response to interleukin 1, bradykinin and other agonists. *J. Cell. Physiol.* *141*, 85-89.

Butler, D. M., Feldmann, M., Dipadova, F. and Brennan, F. M. (1994). p55 and p75 tumor necrosis factor receptors are expressed and mediate common functions in synovial fibroblasts and other fibroblasts. *Eur. Cytokine Netw.* *5*, 441-448.

Buttice, G. and Kurkinen, M. (1994). Oncogenes control stromelysin and collagenase gene expression. *Contrib Nephrol* *107*, 101-7.

Cahill, M. A., Janknecht, R. and Nordheim, A. (1996). Signalling pathways: jack of all cascades. *Curr. Biol.* *6*, 16-19.

Cano, E., Hazzalin, C. A. and Mahadevan, L. C. (1994). Anisomycin-activated protein kinase-p45 and kinase-p55 but not mitogen-activated protein kinase-erk-1 and kinase-erk-2 are implicated in the induction of c-fos and c-jun. *14*

Carnero, A., Liyanage, M., Stabel, S. and Lacal, J. C. (1995). Evidence for different signalling pathways for PKC ζ and *ras*-p21 in *Xenopus* oocytes. *Oncogene* *11*, 1541-1547.

Cavigelli, M., Dolfi, F., Claret, F.-X. and Karin, M. (1994). Induction of c-fos expression through JNK-mediated TCF/Elk-1 phosphorylation. *EMBO J.* *14*, 5957-5964.

Chen, J. H. (1985). The proto-oncogene *c-ets* is preferentially expressed in lymphoid cells. *Mol. Cell. Biol.* *5*, 2993-3000.

Chen, J. H., Jeha, S. and Oka, T. (1993). Negative Regulatory Elements in the Human ETS1 Gene Promoter. *Oncogene* *8*, 133-139.

Chen, J. H. and Wright, C. D. (1993). PEA3, Oct 1 and Oct 2 positively regulate the human ETS1 promoter. *Oncogene* *8*, 3375-83.

Chmura, S. J., Nodzenski, E., Weichselbaum, R. R. and Quintans, J. (1996). Protein kinase C inhibition induces apoptosis and ceramide production through activation of a neutral sphingomyelinase. *Cancer Res.* *56*, 2711-2714.

Chuang, C.-H. and Ng, S.-Y. (1994). Functional divergence of the MAP kinase pathway. ERK1 and ERK2 activate specific transcription factors. *FEBS Lett.* *346*, 229-234.

Circolo, A., Welgus, H. G., Pierce, G. F., Kramer, J. and Strunk, R. C. (1991). Differential regulation of the expression of proteinases/antiproteinases in fibroblasts. *J. Biol. Chem.* *266*, 12283-12288.

Clarck, M. A., Chen, M. J., Crooke, S. T. and Bomalaski, J. S. (1988). Tumour necrosis factor (cachectin) induces phospholipase A2 activity and synthesis of a phospholipase A2-activating protein in endothelial cells. *Biochem. J.* *250*, 125-132.

Cobb, M. H. and Goldsmith, E. J. (1995). How MAP kinases are regulated. *J. Biol. Chem.* *270*, 14843-14846.

Collyn-d'Hooghe, M., Galiegue, S., Szymiczek, D., Lantoine, D., Quief, S., Loucheux-Lefebvre, M.-H. and Kerkaert, J.-P. (1993). Quantitative and qualitative variation of Ets-1-transcripts in hematologic malignancies. *Leukemia* *7*, 1777-1785.

Craven, R. J., Xu, L.-H., Weiner, T. M., Friedell, Y.-W., Dent, G. A., Srivastava, S., Varnum, B., Liu, E. T. and Cance, W. G. (1995). Receptor tyrosine kinases expressed in metastatic colon cancer. *Int. J. Cancer* *60*, 791-797.

Crepieux, P., Coll, J. and Stéhelin, D. (1994) The Ets family of proteins: weak modulators of gene expression in quest for transcriptional partners. *Critic. Rev. Oncogenesis* *5*, 615-638.

Cuvillier, O., Pirianov, G., Kleuser, B., Vanek, P. G., Coso, O. A., Gutkind, J. S. and Spiegel, S. (1996). Suppression of ceramide-mediated cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature* *381*, 800-803.

Darnay, B. G., Reddy, S. A. G. and Aggarwal, B. B. (1994). Identification of a protein kinase associated with the cytoplasmic domain of the p60 Tumor Necrosis Factor Receptor. *J. Biol. Chem.* *269*, 20299-20304.

Darnay, B. G., Reddy, S. A. G. and Aggarwal, B. B. (1994). Physical and functional association of a serine-threonine protein kinase to the cytoplasmic domain of the p80 form of the Tumor Necrosis Factor receptor in human histiocytic lymphoma U-937 cells. *J. Biol. Chem.* *269*, 19687-.

Darnay, B. G., Singh, S., Chaturvedi, M. M. and Aggarwal, B. B. (1995). The p60 tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated kinase (TRAK) binds residues 344-397 within the cytoplasmic domain involved in TNF signaling. *J. Biol. Chem.* *270*, 14867-14870.

Davis, R. J. (1993). The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J. Biol. Chem.* *268*, 14553-14556.

Dbaiibo, G. S., Obeid, L. M. and Hannun, Y. A. (1993). Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) signal transduction through ceramide. Dissociation of growth inhibitory effects of TNF-alpha from activation of nuclear factor-kappa B. *J. Biol. Chem.* *268*, 17762-17766.

De Taisne, C., Gégonne, A., Stehelin, D., Bernheim, A. and Berger, R. (1984). Chromosomal localization of the human proto-oncogene c-ets. *Nature* *310*, 581-583.

Dekker, L. V. and Parker, P. J. (1994). Protein kinase C - a question of specificity. *TIBS* *19*, 73-77.

Delpech, B. (1991) Le stroma des cancers. *Bull. Cancer* *78*, 869-900.

Derynck, R. D., Goeddel, D. V., Ullrich, A., Gutterman, J. U., Williams, R. D., Bringman, T. S. and Berger, W. H. (1987). Synthesis of messenger RNAs for transforming growth factors alpha and beta and the epidermal growth factor receptor by human tumors. *Cancer Res.* *47*, 707-712.

Desbiens, X., Queva, C., Jaffredo, T., Stehelin, D. and Vandebunder, B. (1991). The relationship between cell proliferation and the transcription of the nuclear oncogenes c-myc, c-myb and c-ets-1 during feather morphogenesis in the chick embryo. *Development* *111*, 699-713.

Diaz-Meco (1993). A dominant negative protein kinase C α subspecies blocks NF-KB activation. *Mol. Cell. Biol.* *13*, 4770-4775.

Dobrowsky, R. T., Kamibayashi, C., Mumby, M. C. and Hannun, Y. A. (1993). Ceramide activates heterotrimeric protein phosphatase 2A. *J. Biol. Chem.* *268*, 15523-15530.

Dominguez, I., Diaz-Meco, M. T., Municio, M. M., Berra, E., Garcia de Herreros, A., Cornet, M. E., Sanz, L. and Moscat, J. (1992). Evidence for a role of protein kinase C α subspecies in maturation of *Xenopus laevis* oocytes. *Mol. Cell. Biol.* *12*, 3776-3783.

Dressler, K. A., Mathias, S. and Kolesnick, R. N. (1992). Tumor necrosis factor- α activates the sphingomyelin transduction pathway in a cell-free system. *Science* *255*, 1715-1718.

Dudley, D. T., Pang, L., Decker, S. J., Bridges, A. J. and Saltiel, A. R. (1995) A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *92*, 7686-7689.

Dvorak, H. F. (1988). Tumor stroma. *Diagnostic Immunopathology*, Raven Press, N.Y. 401-420.

Edwards, D. R., Murphy, G., Reynolds, J. J., Whitham, S. E., Docherty, A. J. P., Angel, P. and Heath, J. K. (1987). Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. *EMBO J.* *6*, 1899-1904.

Edwards, D. R., Rocheleau, H., Sharma, R. R., Wills, A. J., Cowie, A., Hassel, J. A. and Heath, J. K. (1992). Involvement of AP1 and PEA3 binding sites in the regulation of murine tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) transcription. *Biochim. Biophys. Acta* 1171, 41-55.

Eichholtz, T., deBont, D. B. A., deVidt, J., Liskamp, R. M. J. and Ploegh, H. L. (1993). A myristoylated pseudosubstrate peptide, a novel protein kinase C inhibitor. *J. Biol. Chem.* 268, 1982-1986.

Erickson, S. L., de Sauvage, F. J., Kikly, K., Carver-Moore, K., Pitts-Meek, S., Gillett, N., Sheehan, K. C. F., Schreiber, R. D., Goeddel, D. V. and Moore, M. W. (1994). Decreased sensitivity to tumour-necrosis factor but normal T-cell development in TNF receptor-2-deficient mice. *Nature* 372, 560-563.

Feinstein, E., Kimchi, A., Wallach, D., Boldin, M. and Varfolomeev, E. (1995). The death domain: a module shared by proteins with diverse cellular functions. *T.I.B.S.* 20, 342-344.

Fisher, C. L., Ghysdael, J. and Cambier, J. C. (1991). Ligation of membrane Ig leads to calcium-mediated phosphorylation of the proto-oncogene product, Ets-1. *J. Immunol.* 146, 1743-1749.

Fisher, R. J., Fivash, M., Casas, F. J., Erickson, J. W., Kondoh, A., Bladen, S. V., Fisher, C., Watson, D. K. and Papas, T. (1994). Real-time DNA binding measurements of the ETS1 recombinant oncoproteins reveal significant kinetic differences between the p42 and p51 isoforms. *Protein Sci.* 3, 257-266.

Fisher, R. J., Mavrothalassitis, G., Kondoh, A. and Papas, T. S. (1991). High-affinity DNA-protein interactions of the cellular ETS1 protein: the determination of the ETS binding motif. *Oncogene* 6, 2249-2254.

Fleischman, L. F., Holtzclaw, L., Russell, J. T., Mavrothalassitis, G. and Fisher, R. J. (1995). ets-1 in astrocytes: expression and transmitter-evoked phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* 15, 925-931.

Fleischman, L. F., Pilaro, A. M., Murakami, K., Kondoh, A., Fisher, R. J. and Papas, T. S. (1993). c-Ets-1 protein is hyperphosphorylated during mitosis. *Oncogene* 8, 771-780.

Fukamizu, H. and Grinnell, F. (1990). Spatial organization of extracellular matrix and fibroblast activity: effects of serum, transforming growth factor b, and fibronectin. *Exp. Cell Res.* 190, 276-282.

Galang, C. K., Der, C. J. and Hauser, C. A. (1994) Oncogenic Ras can induce transcriptional activation through a variety of promoter elements, including tandem c-Ets-2 binding sites. *Oncogene* 9, 2913-2921.

Galvecha-Gargova, Z., Dérijard, B., Wu, I. H. and Davis, R. J. (1994). An osmosensing signal transduction pathway in mammalian cells. *Science* 265, 806-808.

Ghosh, T. K. (1994). Sphingosine 1-phosphate generated in the endoplasmic reticulum membrane activates release of stored calcium. *J. Biol. Chem.* 269, 22628-22635.

Ghysdael, J., Gegonne, A., Pognonec, P., Dernis, D., Leprince, D. and Stehelin, D. (1986). Identification and preferential expression in thymic and bursal lymphocytes of a c-ets oncogene-encoded Mr 54,000 cytoplasmic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 1714-8.

Gille, H., Strahl, T. and Shaw, P. E. (1995). Activation of ternary complex factor Elk-1 by stress-activated protein kinases. *Curr. Biol.* 5, 1191-1200.

Godfrey, R. W., Johnson, W. J. and Hoffstein, S. T. (1987). Recombinant tumor necrosis factor and interleukin-1 both stimulate human synovial cell arachidonic release and phospholipid metabolism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 142, 235-241.

Gohda, E., Matsunaga, T., Kataoka, H., Katebe, T. and Yamamoto, I. (1994). Induction of hepatocyte growth factor in human skin fibroblasts by epidermal growth factor, platelet-derived growth factor and fibroblast growth factor. *Cytokine* 6, 633-640.

Gomez, M. A., Duffy, P. A., Martin, A., O'Brien, L., Byun, H. S., Bittman, R. and Brindley, D. N. (1995). Short-chain ceramide-1-phosphates are novel stimulators of DNA synthesis and cell division: antagonism by cell-permeable ceramides. *Mol Pharmacol* 47, 833-9.

Gomez, M. A., Martin, A., O'Brien, L. and Brindley, D. N. (1994). Cell-permeable ceramides inhibit the stimulation of DNA synthesis and phospholipase D activity by phosphatidate and lysophosphatidate in rat fibroblasts. *J Biol Chem* 269, 8937-43.

Gomez, M. A., Waggoner, D. W., O'Brien, L. and Brindley, D. N. (1995). Interaction of ceramides, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate in regulating DNA synthesis and phospholipase D activity. *J. Biol. Chem.* 270, 26318-26325.

Gorsch, S. M., Memoli, V. A., Stukel, T. A., Gold, L. I. and Arrick, B. A. (1992). Immunohistochemical staining for transforming growth factor b1 associates with disease progression in human breast cancer. *Cancer Res.* 52, 6949-6952.

Grégoire, M. and Lieubeau, B. (1995). The role of fibroblats in tumor behavior. *Cancer and Metastasis Rev.* 14, 339-350.

Grell, M., Schleurich, P., Meager, A. and Pfizenmaier, K. (1993). TR60 and TR80 tumor necrosis factor (TNF)-receptors can independently mediate cytolysis. *Lymphokine Cytokine Res.* *12*, 143-148.

Grevin, D., Chen, J. H., Raes, M. B., Stehelin, D., Vandebunder, B. and Desbiens, X. (1993). Involvement of the proto-oncogene *c-ets 1* and the urokinase plasminogen activator during mouse implantation and placentation. *Int J Dev Biol* *37*, 519-29.

Gupta, S., Barrett, T., Whitmarsh, A. J., Cavanagh, J., Sluss, H. K., Dérijard, B. and Davis, R. J. (1996). Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *EMBO J.* *15*, 2760-2770.

Gutman, A. and Wasylyk, B. (1990). The collagenase gene promoter contains a TPA and oncogene-responsive unit encompassing the PEA3 and AP-1 binding sites. *The Embo J* *9*, 2241-2246.

Guy, G. R., Cao, X., Chua, S. P. and Tan, Y. H. (1992). Okadaic acid mimics multiple changes in early protein phosphorylation and gene expression induced by tumor necrosis factor or interleukin-1. *J. Biol. Chem.* *267*, 1846-1852.

Guy, G. R., Philip, R. and Tan, Y. H. (1995). Activation of protein kinases and the inactivation of protein phosphatase 2A in tumour necrosis factor and interleukin-1 signal-transduction pathways. *Eur. J. Biochem.* *229*, 503-511.

Ha, K. S. and Exton, J. H. (1993). Differential translocation of protein kinase C isoenzymes by thrombin and platelet-derived growth factor. A possible function for phosphatidylcholine-derived diacylglycerol. *J. Biol. Chem.* *268*, 10534-10539.

Hagman, J. and Grosschedl, R. (1992). An inhibitory carboxyl-terminal domain in Ets-1 and Ets-2 mediates differential binding of ETS family factors to promoter sequences of the *mb-1* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *89*, 8889-8893.

Haliday, E. M., Ramesha, C. S. and Ringold, G. (1991). TNF induces *c-fos* via a novel pathway requiring conversion of arachidonic acid to a lipoxygenase metabolite. *EMBO J.* *10*, 109-115.

Hamilton, J. A., Piccoli, D., Leizer, T., Butler, D. M., Croatto, M. and Royston, K. M. (1991). Transforming growth factor β stimulates urokinase-type plasminogen activator and DNA synthesis, but not prostaglandin E₂ production in human synovial fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *88*, 7180-7184.

Hannun, Y. A. (1994). The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide. *J. Biol. Chem.* *269*, 3125-3128.

Hannun, Y. A. and Lincardic, C. M. (1993). Sphingolipid breakdown products: anti-proliferative and tumor-suppressor lipids. *Biochim. Biophys. Acta 1154*, 223-236.

Heino, J. and Heinonen, T. (1990). Interleukin-1b prevents the stimulatory effect of transforming growth factor-b on collagen gene expression in human skin fibroblasts. *Biochem. J. 271*, 827-830.

Heller, R. A. and Kroncke, M. (1994). Tumor necrosis factor receptor-mediated signaling pathways. *J. Cell. Biol. 126*, 5-9.

Heller, R. A., Song, K. and Fan, N. (1993). Cytotoxicity by Tumor Necrosis Factor mediated by both p55 and p70 receptors. *Cell 73*, 216.

Henkart, P. A. (1996). ICE family proteases: mediators of all apoptotic cell death ? *Immunity 4*, 195-201.

Hoeck, W. G., Ramesha, C. S., Chang, D. J., Fan, N. and Heller, R. A. (1993). Cytoplasmic phospholipase A2 activity and gene expression are stimulated by tumor necrosis factor: dexamethasone blocks the induced synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A 90*, 4475-9.

Hohmann, H.-P., Brockhaus, M., Baeuerle, P. A., Remy, R., Kolbeck, R. and Van Loon, A. P. G. M. (1990). Expression of the types A and B tumor necrosis factor (TNF) receptors is independently regulated, and both receptors mediate activation of the transcription factor NF- κ B. *J. Biol. Chem. 265*, 22409-22417.

Hsu, H. L., Shu, H. B., Pan, M. G. and Goeddel, D. V. (1996). TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell 84*, 299-308.

Hunter, T. (1995). Protein kinases and phosphatases: the Yin and Yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell 80*, 225-236.

Hunter, T. and Karin, M. (1992). The regulation of transcription by phosphorylation. *Cell 70*, 375-387.

Imamura, K., Sherman, M. L., Spriggs, D. and Kufe, D. (1988). Effect of tumor necrosis factor on GTP binding and GTPase activity in HL-60 and L929 cells. *J. Biol. Chem. 263*, 10247-10253.

Iwata, M., Herrington, J. and Zager, R. A. (1995). Sphingosine: a mediator of acute renal tubular injury and subsequent cytoresistance. *Proc Natl Acad Sci USA 92*, 8970-8974.

Janknecht, R. and Nrodheim, A. (1993) Gene regulation by Ets proteins. *Biochim. Biophys. Acta 1155*, 346-356.

Jayadev, S., Linardic, C. M. and Hannun, Y. A. (1994). Identification of arachidonic acid as a mediator of sphingomyelin hydrolysis in response to tumor necrosis factor α . *J. Biol. Chem.* *269*, 5757-5763.

Jayadev, S., Liu, B., Bielawska, A. E., Lee, J. Y., Nazaire, F., Pushkareva, M. Y., Obeid, L. M. and Hannun, Y. A. (1995). Role of ceramide in cell cycle arrest. *J. Biol. Chem.* *270*, 2047-2052.

Ji, L., Zhang, G. and Hirabayashi, Y. (1995). Inhibition of tumor necrosis factor α - and ceramide-induced internucleosomal DNA fragmentation by herbimycin A in U937 cells. *Biochem Biophys Res Commun* *212*, 640-7.

Jorcyk, C. L., Watson, D. K., Mavrothalassitis, G. J. and Papas, T. S. (1991). The human *ets1* gene : genomic structure, promoter characterization and alternative splicing. *Oncogene* *6*, 523-532.

Joseph, A., Weiss, G. A., Jin, L., Fuchs, A., Chowdhury, S., O'Shaughnessy, P., Goldberg, I. D. and Rosen, E. M. (1995). Expression of scatter factor in human bladder carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* *87*, 372-377.

Joseph, C. K., Byun, H.-S., Bittman, R. and Kolesnick, R. N. (1993). Substrate recognition by ceramide-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* *268*, 20002-20006.

Kahn, A. (1995). Génétique et cancer: progrès et perspectives. *Pathologie Biologie* *43*, 139-142.

Kahn, A. (1996). Cellular senescence and apoptosis: is ceramide involved. *M S-Med Sci* *12*, 658-659.

Karin, M. and Hunter, T. (1995). Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Curr. Biol.* *5*, 747-757.

Kaufmann, Y., Silverman, T., Levi, B. Z. and Ozato, K. (1987). Induction of *c-ets* and *c-fos* gene expression upon antigenic stimulation of a T cell hybridoma with inducible cytolytic capacity. *J Exp Med* *166*, 810-5.

Kaya, M., Yoshida, K., Higashino, F., Mitaka, T., Ishii, S. and Fujinaga, K. (1996). A single *ets*-related transcription factor, E1AF, confers invasive phenotype on human cancer cells. *Oncogene* *12*, 221-227.

Kim, M.-Y., Linardic, C., Obeid, L. and Hannun, Y. A. (1991). Identification of sphingomyelin turnover as an effector mechanism for the action of tumor necrosis factor- α and γ -interferon. *J. Biol. Chem.* *266*, 484-489.

Klein, J. B., Scherzer, J. A., Harding, G., Jacobs, A. A. and McLeish, K. R. (1995). TNF- α stimulates increased plasma membrane guanine nucleotide binding protein activity in polymorphonuclear leukocytes. *J Leukoc Biol* 57, 500-6.

Knopf, J. L., Lee, M.-H., Sultzman, L. A., Kriz, R. W., Loomis, C. R. and Bell, R. M. (1986). Cloning and expression of multiple protein kinase C cDNAs. *Cell* 46, 491-502.

Köck, A., Schwartz, T., Urbanski, A., Peng, Z., Vetterlein, M., Micksche, M., Ansel, J. C., Kung, H. F. and Luger, T. A. (1989). Expression and release of interleukin-1 by different human melanoma cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* 81, 36-42.

Koizumi, S., Fisher, R. J., Fujiwara, S., Jorcyk, C., Bhat, N. K., Seth, A. and Papas, T. S. (1990). Isoforms of the human ets-1 protein: generation by alternative splicing and differential phosphorylation. *Oncogene* 5, 675-681.

Kola, I., Brookes, S., Green, A. R., Garber, R., Tymms, M., Papas, T. S. and Seth, A. (1993). The Ets1 transcription factor is widely expressed during murine embryo development and is associated with mesodermal cells involved in morphogenetic processes such as organ formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 7588-92.

Kolesnick, R. and Golde, D. W. (1994). The sphingomyelin pathway in tumor necrosis factor and interleukin-1 signaling. *Cell* 77, 325-328.

Kovacs, E. J. (1991). Fibrogenic cytokines: the role of immune mediators in the development of scar tissue. *Immunol. Today* 12, 17-23.

Kovacs, E. J. and DiPietro, L. A. (1994). Fibrogenic cytokines and connective tissue production. *FASEB J.* 8, 854-861.

Kyriakis, J. M., Banerjee, P., Nikolakaki, E., Dai, T., Rubie, E. A., Ahmad, M. F., Avruch, J. and Woodgett, J. R. (1994). The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* 369, 156-160.

Langlois, W. J., Sasaoka, T., Saltiel, A. R. and Olefsky, J. M. (1995) Negative feedback regulation and desensitization of insulin- and epidermal growth factor-stimulated p21ras activation. *J. Biol. Chem.* 270, 25320-25323.

Laudet, V., Niel, C., Duterquecoquillaud, M., Leprince, D. and Stehelin, D. (1993). Evolution of the ets Gene Family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190, 8-14.

Lautenberger, J. A., Burdett, L. A., Gunnell, M. A., Qi, S., Watson, D. K., O'Brien, S. J. and Papas, T. S. (1992). Genomic dispersal of the ets gene family during metazoan evolution. *Oncogene* 7, 1713-1719.

Le, J. and Vilcek, J. (1987). Biology of disease. Tumor necrosis factor and interleukin 1: cytokines with multiple overlapping biological activities. *Lab. Invest.* 56, 234-248.

Leeuwenberg, J. F. M., van Tits, L. J. H., Jeunhomme, T. M. A. A. and Buurman, W. A. (1995). Evidence for exclusive role in signalling of Tumor Necrosis Factor p55 receptor and potentiating function of p75 receptor on human endothelial cells. *Cytokine* 7, 457-462.

Lemarchandel, V., Ghysdael, J., Mignotte, V., Rahuel, C. and Romeo, P.H. (1993) GATA and Ets cis-acting sequences mediate megacaryocyte-specific expression. *Mol. Cell. Biol.* 13, 668-676.

Leprince, D., Gégonne, A., Coll, J., de, T. C., Schneeberger, A., Lagrou, C. and Stehelin, D. (1983). A putative second cell-derived oncogene of the avian leukaemia retrovirus E26. *Nature* 306, 395-397.

Liscovich, M. and Cantley, L. C. (1994). Lipid second messengers. *Cell* 77, 329-334.

Liu, J., Mathias, S., Yang, Z. and Kolesnick, R. N. (1994). Renaturation and tumor necrosis factor- α stimulation of a 97-kDa ceramide-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 269, 3047-3052.

Loetscher, H., Pan, Y.-C. E., Lahm, H.-W., Gentz, R., Brockhaus, M., Tabuchi, H. and Lesslauer, W. (1990). Molecular cloning and expression of the human 55 kd Tumor Necrosis Factor Receptor. *Cell* 61, 351-359.

Lozano, J., Berra, E., Municio, M. M., Diaz-Meco, M. T. and Moscat, J. (1994). Protein kinase C α isoform is critical for KB-dependent promoter activation by sphingomyelinase. *J. Biol. Chem.* 269, 19200-19202.

Mackay, A. R., Ballin, M., Pelina, M. D., Farina, A. R., Nason, A. M., Hartzler, J. L. and Thorgeirsson, U. (1992). Effect of phorbol ester and cytokines on matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase expression in tumor and normal cell lines. *Invasion and Metastasis* 12, 168-184.

MacLeod, K., Leprince, D. and Stehelin, D. (1992). The *ets* gene family. *TIBS* 17, 251-256.

Mahé, Y., Piau, J.-P., Wakasugi, N., Tursz, T., Gacon, G. and Wagasaki, H. (1988). *Eur. J. Immunol.* 18, 2029-2036.

Majerus, M. A., Bibollettruche, F., Telliez, J. B., Wasylyk, B. and Bailleul, B. (1992). Serum, A-1 and Ets-1 Stimulate the Human *ets-1* Promoter. *Nucleic Acids Res* 20, 2699-2703.

Maroulakou, I. G., Papas, T. S. and Green, J. E. (1994). Differential expression of *ets-1* and *ets-2* proto-oncogenes during murine embryogenesis. *Oncogene* 9, 1551-65.

Marquardt, B., Frith, D. and Stabel, S. (1994). Signalling from TPA to MAP kinase requires protein kinase C, raf and MEK: reconstitution of the signalling pathway *in vitro*. *Oncogene* 9, 3213-3218.

Marshall, C. J. (1995). Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular-regulated kinase activation. *Cell* 80, 179-185.

Martin, S. J. and Green, D. R. (1995). Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell* 82, 349-352.

Mathias, S., Dressler, K. A. and Kolesnick, R. N. (1991). Characterization of a ceramide-activated protein kinase: Stimulation by tumor necrosis factor α . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 10009-10013.

Matrisian, L. M. (1990) Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *T.I.G.* 6, 121-125.

Mauviel, A. (1993). Cytokine regulation of metalloproteinase gene expression. *J. Cell. Biochem.* 53, 288-295.

Mavrothalassitis, G., Fisher, R. J., Smyth, F., Watson, D. K. and Papas, T. S. (1994). Structural inferences of the ets1 DNA-Binding domain determined by mutational analysis. *Oncogene* 9, 425-435.

Metz, T. and Graf, T. (1991). Fusion of the nuclear oncoproteins v-Myb and v-Ets is required for the leukemogenicity of E26 virus. *Cell* 66, 95-105.

Metz, T. and Graf, T. (1991). v-myb and v-ets transform chicken erythroid cells and cooperate both in trans and in cis to induce distinct differentiation phenotypes. *Genes Dev* 5, 369-80.

Mignatti, P. and Rifkin, D. B. (1993). Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol. Rev.* 73, 161-195.

Miles, D. W., Happerfield, L. C., Naylor, M. S., Bobrow, L. G., Rubens, R. D. and Balkwill, F. R. (1994). Expression of tumour necrosis factor (TNF α) and its receptors in benign and malignant breast tissue. *Int. J. Cancer* 56, 777-782.

Minden, A., Lin, A., McMahon, M., Lange-Carter, C., Dérijard, B., Davis, R. J., G.L., J. and M., K. (1994). Differential activation of ERK and JNK mitogen-activated protein kinases by Raf-1 and MEKK. *Science* 266, 1719-1722.

Mitchell, P. G. and Cheung, H. S. (1991). Tumor necrosis factor alpha and epidermal growth factor regulation of collagenase and stromelysin in adult porcine articular chondrocytes. *J Cell Physiol* 149, 132-40.

Moriguchi, T., Kuroyanagi, N., Yamaguchi, K., Gotoh, Y., Irie, K., Kano, T., Shirakabe, K., Muro, Y., Shibuya, H., Matsumoto, K., Nishida, E. and Hagiwara, M. (1996). A novel kinase cascade mediated by mitogen-activated protein kinase kinase 6 and MKK3. *J. Biol. Chem.* *271*, 13675-13679.

Morrisson, R. S., Gross, J. L., Herblin, W. F., Reilly, T. M., Lascala, P. A., Alterman, R. L., Moskal, J. R., Kornblith, P. L. and Dexter, D. L. (1990). Basic fibroblast growth factor-like activity and receptors are expressed in a human glioma cell line. *Cancer Res.* *50*, 2524-2529.

Mosialos, G., Birkenbach, M., Yalamanchili, R., vanArsdale, T., Ware, C. and Kieff, E. (1995). The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the Tumor Necrosis Factor receptor family. *Cell* *80*, 389-399.

Muller, G., Ayoub, M., Storz, P., Rennecke, J., Fabbro, D. and Pfizenmaier, K. (1995). PKC ζ is a molecular switch in signal transduction of TNF- α , bifunctionally regulated by ceramide and arachidonic acid. *EMBO J.* *14*, 1961-1969.

Murakami, K. and Routtenberg, A. (1985). Direct activation of purified protein kinase C by unsaturated fatty acids (oleate and arachidonate) in the absence of phospholipids and Ca^{2+} . *FEBS Lett.* *192*, 189-193.

Muthusamy, N., Barton, K. and Leiden, J. M. (1995) Defective activation and survival of T-cells lacking the Ets-1 transcription factor. *Nature* *377*, 639-642.

Nakanishi, H., Brewer, K. A. and Exton, J. H. (1993). Activation of the ζ isoenzyme of protein kinase C by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J. Biol. Chem.* *268*, 13-16.

Naldini, L., Tamagnone, L., Vigna, E., Sachs, M., Hartmann, G., Birchmeier, W., Daikuhara, Y., Tsubouchi, H., Blasi, F. and Comoglio, P. M. (1992). Extracellular proteolytic cleavage by urokinase is required for activation of hepatocyte growth factor/scatter factor. *EMBO J.* *11*, 4825-4833.

Naylor, M. S., Malik, S. T., Stamp, G. W., Jobling, T. and Balkwill, F. R. (1990). In situ detection of tumour necrosis factor in human ovarian cancer specimens. *Eur. J. Cancer* *26*, 1027-1030.

Naylor, M. S., Stamp, G. W. H. and Balkwill, F. R. (1990). Investigation of cytokine gene expression in human colorectal cancer. *Cancer Res.* *50*, 4436-4440.

Naylor, M. S., Stamp, G. W. H., Foulkes, W. D., Eccles, D. and Balkwill, F. R. (1993). Tumor necrosis factor and its receptors in human ovarian cancer. *J. Clin. Invest.* *91*, 2194-2206.

Neale, M. L., Fiera, R. A. and Matthews, N. (1988). Involvement of phospholipase A2 activation in tumor cell killing by Tumor Necrosis Factor. *Immunology* *64*, 81-85.

Neer, E. J. (1995). Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* 80, 249-257.

Nerlov, C., Rorth, P., Blasi, F. and Johnsen, M. (1991). Essential AP-1 and PEA3 binding elements in the human urokinase enhancer display cell type-specific activity. *Oncogene* 6, 1583-1592.

Nerlov, C., De Cesare, D., Pergola, F., Caracciolo, A., Blasi, F., Johnsen, M. and Verde, P. (1992). A regulatory element that mediates co-operation between a PEA3-AP-1 element and an AP-1 site is required for phorbol ester induction of urokinase enhancer activity in HepG2 hepatoma cells. *EMBO J.* 11, 4573-4582.

Nishizuka, Y. (1988). The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* 334, 661-665.

Nunn, M. F., Seeburg, P. H., Moscovici, C. and Duesberg, P. H. (1983). Tripartite structure of the avian erythroblastosis virus E26 transforming gene. *Nature* 306, 391-395.

Obeid, L. M. and Hannun, Y. A. (1995). Ceramide: a stress signal and mediator of growth suppression and apoptosis. *J. Cell. Biochem.* 58, 191-198.

Ohta, H., Yatomi, Y., Sweeney, E. A., Hakomori, S. and Igarashi, Y. (1994). A possible role of sphingosine in induction of apoptosis by tumor necrosis factor- α in human neutrophils. *FEBS Lett* 355, 267-70.

Oka, T., Rairkar, A. and Chen, J. H. (1991). Structural and functional analysis of the regulatory sequences of the *ets-1* gene. *Oncogene* 6, 2077-2083.

Olivera, A. and Spiegel, S. (1993). Sphingosine-1-phosphate as messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens. *Nature* 365, 557-560.

Olson, T. A., Mohanraj, D., Carson, L. F. and Ramakrishnan, S. (1994). Vascular permeability factor gene expression in normal and neoplastic human ovaries. *Cancer Res.* 54, 276.

Palombella, V. J. and Vilcek, J. (1989). Mitogenic and cytotoxic actions of tumor necrosis factor in BALB/c 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* 264, 18128-18136.

Pang, L., Sawada, T., Decker, S. J. and Saltiel, A. R. (1995) Inhibition of MAP kinase blocks the differentiation of PC-12 cells induced by Nerve Growth Factor. *J. Biol. Chem.* 270, 13585-13588.

Pankov, R., Umezawa, A., Maki, R., Der, C. J., Hauser, C. A. and Oshima, R. G. (1994) Oncogene activation of human keratin 18 transcription via the Ras signal transduction pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 873-877.

Patel, T., Gores, G. J. and Kaufmann, S. H. (1996). The role of proteases during apoptosis. *FASEB J.* 10, 587-597.

Pelech, S. L. and Sanghera, J. S. (1992). MAP kinases: charting the regulatory pathways. *Science* 257, 1355-1356.

Penault-Llorca, F., Bertucci, F., Adelaide, J., Parc, P., Coulier, F., Jacquemier, J., Birnbaum, D. and deLapeyriere, O. (1995). Expression of FGF and FGF receptor genes in human breast cancer. *Int. J. Cancer* 61, 170-176.

Pognonec, P., Boulukos, K. E., Bosselut, R., Boyer, C., Schmitt, V. A. and Ghysdael, J. (1990). Identification of a Ets1 variant protein unaffected in its chromatin and in vitro DNA binding capacities by T cell antigen receptor triggering and intracellular calcium rises. *Oncogene* 5, 603-610.

Pognonec, P., Boulukos, K. E., Gesquiere, J. C., Stehelin, D. and Ghysdael, J. (1988). Mitogenic stimulation of thymocytes results in the calcium-dependent phosphorylation of c-ets-1 proteins. *Embo J* 7, 977-83.

Pognonec, P., Boulukos, K. E. and Ghysdael, J. (1989). The c-ets1 protein is chromatin associated and binds to DNA in vitro. *Oncogene* 4, 691-697.

Queva, C., Leprince, D., Stehelin, D. and Vandembunder, B. (1993). p54c-ets-1 and p68c-ets-1, the two transcription factors encoded by the c-ets-1 locus, are differentially expressed during the development of the chick embryo. *Oncogene* 8, 2511-20.

Rabault, B. and Ghysdael, J. (1994). Calcium-induced phosphorylation of Ets1 inhibits its specific DNA binding activity. *J. Biol. Chem.* 269, 28143-28151.

Raines, M. A., Kolesnick, R. N. and Golde, D. W. (1993). Sphingomyelinase and ceramide activate mitogen-activated protein kinase in myeloid HL-60 cells. *J Biol Chem* 268, 14572-5.

Raingeaud, J., Gupta, S., Rogers, J. S., Dickens, M., Han, J., Ulevitch, R. J. and Davis, R. J. (1995). Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J. Biol. Chem.* 270, 7420-7426.

Rao, V. N. and Reddy, E. S. (1994). elk-1 proteins interact with MAP kinases. *Oncogene* 9, 1855-1860.

Reddy, E. S. and Rao, V. N. (1988). Structure, expression and alternative splicing of the human c-ets-1 proto-oncogene. *Oncogene Res* 3, 239-246.

Reddy, S. A., Chaturvedi, M. M., Darnay, B. G., Chan, H., Higuchi, M. and Aggarwal, B. B. (1994). Reconstitution of nuclear factor kappa B activation induced by tumor necrosis factor requires membrane-associated components. Comparison with pathway activated by ceramide. *J Biol Chem* 269, 25369-72.

Robaye, B. and Dumont, J. E. (1992). Multiple biochemical pathways involved in the Tumor Necrosis Factor cytotoxicity. *Eur. Cytok. Netw.* 3, 185.

Romano-Spica, V., Suzuki, H., Georgiou, P., Chen, S., Ascione, R., Papas, T. S. and Bhat, N. K. (1994). Expression of ets family genes in hematopoietic cells. *J. Oncol.* 4, 521-531.

Rorth, P., Nerlov, C., Blasi, F. and Johnsen, M. (1990). Transcription factor PEA3 participates in the induction of urokinase plasminogen activator transcription in murine keratinocytes stimulated with epidermal growth factor or phorbol-ester. *Nucleic Acids Res.* 18, 5009-5017.

Rossi, F., McNagny, K. M., Logie, C., Stewart, A. F. and Graf, T. (1996). Excision of Ets by an inducible site-specific recombinase causes differentiation of Myb-ets-transformed hematopoietic progenitors. *Current Biol.* 6, 866-872.

Rothe, J., Lesslauer, W., Lotscher, H., Lang, Y., Koebel, P., Kontgen, F., Althage, A., Zinkernagel, R., Stéinmetz, M. and Bluethmann, H. (1993). Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated cytotoxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes*. *Nature* 364, 798-802.

Rothe, M., Pan, M. G., Henzel, W. J., Ayres, T. M. and Goeddel, D. V. (1995). The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral-inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* 83, 1243-1252.

Rothe, M., Wong, S. C., Henzel, W. J. and Goeddel, D. V. (1994). A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 78, 681-692.

Rovigatti, U., Watson, D. K. and Yunis, J. J. (1986). Amplification and rearrangement of Hu-ets-1 in leukemia and lymphoma with involvement of 11q23. *Science* 232, 398-400.

Sacchi, N., Perroni, L. and Papas, T. S. (1986). A polymorphic SstI site within the human ets-1 gene in the 11q23 region. *Nucleic Acids Res.* 14,

Sacchi, N., Watson, D. K., Guerts, v. K. A., Hagemeijer, A., Kersey, J., Drabkin, H. D., Patterson, D. and Papas, T. S. (1986). Hu-ets-1 and Hu-ets-2 genes are transposed in acute leukemias with (4;11) and (8;21) translocations. *Science* 231, 379-382.

Sanchez, I., Hughes, R. T., Mayer, B. J., Yee, K., Woodgett, J. R., Avruch, J., Kyriakis, J. M. and Zon, L. I. (1994). Role of SAPK/ERK kinase-1 in the stress-activated pathway regulating transcription of c-jun. *Nature* 372, 794-798.

Santana, P., Pena, L. A., Haimovitz-Friedman, A., Martin, S., Green, D., McLoughlin, M., Cordon-Cardo, C., Schuchman, E. H., Fuks, Z. and Kolesnick, R. (1996). Acid sphingomyelinase-deficient human lymphoblasts and mice are defective in radiation-induced apoptosis. *Cell* 86, 189-199.

Sasaki, C. Y. and Patek, P. Q. (1995). The involvement of protein tyrosine kinase activity in a tumor necrosis factor resistance mechanism. *Proc Soc Exp Biol Med* 210, 25-32.

Sawai, H., Okazaki, T., Yamamoto, H., Okano, H., Takeda, Y., Tashima, M., Sawada, H., Okuma, M., Ishikura, H., Umehara, H. and Domae, N. (1995). Requirement of AP-1 for ceramide-induced apoptosis in human leukemia HL-60 cells. *J. Biol. Chem.* 270, 27326-27331.

Schall, T. J., Lewis, M., Koller, K. J., Lee, A., Rice, G. C., Wong, G. H. W., Gatanaga, T., Granger, G. A., Lentz, R., Raab, H., Kohr, W. J. and Goeddel, D. V. (1990). Molecular cloning and expression of a receptor for human Tumor Necrosis Factor. *Cell* 61, 361-370.

Schneikert, J., Lutz, Y. and Wasylyk, B. (1992). Two independent activation domains in c-Ets-1 and c-Ets-2 located in non-conserved sequences of the ets gene family. *Oncogene* 7, 249-256.

Schütze, S., Berkovic, D., Tomsing, O., Unger, C. and Krönke, M. (1991). Tumor Necrosis Factor induces rapid production of 1,2-diacylglycerol by a phosphatidylcholine-specific phospholipase C. *J. Exp. Med.* 174, 975.

Schütze, S., Machleidt, T. and Krönke, M. (1994). The role of diacylglycerol and ceramide in tumor necrosis factor and interleukin-1 signal transduction. *J. Leukocyte Biol.* 56, 533-541.

Schütze, S., Nottrott, S., Pfizenmaier, K. and Krönke, M. (1990). Tumor necrosis factor signal transduction. *J. Immunol.* 144, 2604-2608.

Schütze, S., P., S., Pfizenmaier, K. and Krönke, M. (1989). Tumor necrosis factor signal transduction. *J. Biol. Chem.* 264, 3562-3567.

Schütze, S., Potthoff, K., Machleidt, T., Berkovic, D., Wiegmann, K. and Krönke, M. (1992). TNF activates NF-kappa B by phosphatidylcholine-specific phospholipase C-induced "acidic" sphingomyelin breakdown. *Cell* 71, 765-776.

Scott, J.D., Fischer, E.H., Demaille, J.G. and Krebs, E.G. (1985) Identification of an inhibitory region of the heat-stable protein inhibitor of the cAMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 4379-4383.

Seth, A. and Papas, T. S. (1990). The c-ets-1 proto-oncogene has oncogenic activity and is positively autoregulated. *Oncogene* 5, 1761-1767.

Seth, A., Ascione, R., Fisher, R.J., Mavrothalassitis, G. J., Bhat, N. K. and Papas, T. S. (1992) The ets gene family. *Cell. Growth. Differ.* 3, 327-334.

Sluss, H. K., Barrett, T., Derijard, B. and Davis, R. J. (1994). Signal transduction by tumor necrosis factor mediated by JNK protein kinases. *Mol. Cell. Biol.* 14, 8376-8384.

Smale, S. T. and Baltimore, D. (1989). The "initiator" as a transcription control element. *Cell* 57, 103-113.

Smith, C. A., Farrah, T. and Goodwin, R. G. (1994). The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* 76, 959-962.

Song, H. Y., Rothe, M. and Goeddel, D. V. (1996). The tumor necrosis factor-inducible zinc finger protein A20 interacts with TRAF1/TRAF2 and inhibits NF-KB activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 6721-6725.

Spiegel, S., Foster, D. and Kolesnick, R. (1996). Signal transduction through lipid second messengers. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 8, 159-167.

Spiegel, S., Olivera, A. and Carlson, R. O. (1993). The role of sphingosine in cell growth regulation and transmembrane signaling. *Adv. Lipid. Res.* 25, 105-129.

Sporn, M. B. and Roberts, A. B. (1986). Peptide growth factors and inflammation, tissue repair, and cancer. *J. Clin. Invest.* 78, 329-332.

Sporn, M. B., Roberts, A. B., Wakefield, L. M. and DeCrombrughe, B. (1987). Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor-beta. *J. Cell. Biol.* 105, 1039-1045.

Stacey, K. J., Fowles, L. F., Colman, M. S., Ostrowski, M. C. and Hume, D. A. (1995) Regulation of urokinasetype plasminogen activator gene transcription by macrophage colony-stimulating factor. *Mol. Cell. Biol.* 15, 3430-3441.

Stanger, B. Z., Leder, P., Lee, T., Kim, E. and Seed, B. (1995). RIP: a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death. *Cell* 81, 513-523.

Sugarman, B. J., Aggarwal, B. B., Hass, P. E., Figari, I. S., Palladino, M. A. and Shepard, H. M. (1985). Recombinant human tumor necrosis factor-a : effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. *Science* 230, 943-945.

Takeyama, H., Wakamya, N., O'Hara, C., Arthur, K., Niloff, J., Kufe, D., Sakarai, K. and Spriggs, D. (1991). Tumor necrosis factor expression by human ovarian carcinoma *in vivo*. *Cancer Res.* *51*, 4476-4480.

Tang, W.-J. and Gilman, A. G. (1992). Adenylyl cyclases. *Cell* *70*, 869-872.

Tartaglia, L. A., Ayres, T. M., Wong, G. H. W. and Goeddel, D. V. (1993). A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* *74*, 845-853.

Tartaglia, L. A. and Goeddel, D. V. (1992). Two TNF receptors. *Immunol. Today* *13*, 151-153.

Tartaglia, L. A., Rothe, M., Hu, Y. F. and Goeddel, D. V. (1993). Tumor necrosis factor's cytotoxic activity is signaled by the p55 TNF receptor. *Cell* *73*, 213-216.

Thelen, M., Rosen, A., Nairn, C. and Aderem, A. (1990). Tumor Necrosis Factor α modifies agonist-dependent responses in human neutrophils by inducing the synthesis and myristoylation of a specific protein kinase C substrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *87*, 5603.

Thomas, G. (1992). MAP kinase by any other name smells just as sweet. *Cell* *68*, 3-6.

Treisman, R. (1996). Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr. Opin. Cell Biol.* *8*, 205-215.

Trimble, M. S., Xin, J. H., Guy, C. T., Muller, W. J. and Hassel, J. A. (1993). PEA3 is overexpressed in mouse metastatic mammary adenocarcinomas. *Oncogene* *8*, 3037-3042.

Uren, A. G., Pakusch, M., Hawkins, J., Puls, K. L. and Vaux, D. L. (1996). Cloning and expression of apoptosis inhibitory proteins homologs that function to inhibit apoptosis and/or bind Tumor Necrosis Factor receptor-associated factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *93*, 4974-4978.

Van Lint, J., Agostinis, P., Vandevoorde, V., Haegeman, G., Fiers, W., Merlevede, W. and Vandenneede, J. R. (1992). Tumor necrosis factor stimulates multiple serine/threonine protein kinases in Swiss 3T3 and L929 cells. Implication of casein kinase-2 and extracellular signal-regulated kinases in the tumor necrosis factor signal transduction pathway. *J Biol Chem* *267*, 25916-25921.

vanArsdale, T. L. and Ware, C. F. (1994). TNF receptor signal transduction. Ligand-dependent stimulation of a serine protein kinase activity associated with (CD120a) TNFR60. *J. Immunol.* *153*, 3043-3050.

Vandenabeele, P., Goossens, V., Beyaert, R., Declercq, W., Grooten, J., Vanhaesebroeck, B., Van, d. C. M., Vercammen, D., Depuydt, B., Denecker, G. and et, a. l. (1994). Functional

requirement of the two TNF receptors for induction of apoptosis in PC60 cells and the role of mitochondria in TNF-induced cytotoxicity. *Circ Shock* 44, 196-200.

Vandenbunder, B., Pardanaud, L., Jaffredo, T., Mirabel, M. A. and Stehelin, D. (1989). Complementary patterns of expression of c-ets 1, c-myb and c-myc in the blood-forming system of the chick embryo. *Development* 107, 265-274.

Vandenbunder, B., Queva, C., Desbiens, X., Wernert, N. and Stehelin, D. (1994). Expression of the transcription factor c-Ets1 correlates with the occurrence of invasive processes during normal and pathological development. *Invasion Metastasis* 14, 198-209.

Vandenbunder, B., Wernert, N. and Stehelin, D. (1993). Does the c-ets1 Protooncogene Take Part in the Regulation of Tumour Angiogenesis. *Bull Cancer* 80, 38-49.

vanHinsbergh, V. W., Vermeer, M., Koolwijk, P., Grimbergen, J. and Kooistra, T. (1994). Genistein reduces tumor necrosis factor alpha-induced plasminogen activator inhibitor-1 transcription but not urokinase expression in human endothelial cells. *Blood* 84, 2984-91.

Venable, M. E., Lee, J. Y., Smyth, M. J., Bielawska, A. and Obeid, L. M. (1995). Role of ceramide in cellular senescence. *J Biol Chem* 270, 30701-30708.

Verheij, M., Bose, R., Lin, X. H., Yao, B., Jarvis, W. D., Grant, S., Birrer, M. J., Szabo, E., Zon, L. I., Kyriakis, J. M., Haimovitzfriedman, A., Fuks, Z. and Kolesnick, R. N. (1996). Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature* 380, 75-79.

Vietor, I., Schwenger, P., Li, W., Schlessinger, J. and Vilcek, J. (1993). Tumor necrosis factor-induced activation and increased tyrosine phosphorylation of mitogen-activated protein (MAP) kinase in human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 268, 18994-18999.

Vilcek, J., Palombella, V. J., Henryksen-DeStephano, D., Swenson, C., Feinman, R., Hirai, M. and Tsujimoto, M. (1986). Fibroblast growth enhancing activity of tumor necrosis factor and its relationship to other polypeptide growth factors. *J Exp Med* 163, 632-643.

Waskiewicz, A. J. and Cooper, J. A. (1995). Mitogen and stress response pathways: MAP kinase cascades and phosphatase regulation in mammals and yeast. *Curr. Biol.* 7, 798-805.

Wasylyk, B., Wasylyk, C., Flores, P., Begue, A., Leprince, D. and Stehelin, D. (1990) The c-ets proto-oncogenes encode transcription factors that cooperate with c-Fos and c-Jun for transcriptional activation. *Nature* 346, 191-193.

Wasylyk, C., Gutman, A., Nicholson, R. and Wasylyk, B. (1991). The c-Ets oncoprotein activates the stromelysin promoter through the same elements as several non-nuclear oncoproteins. *EMBO J.* 10, 1127-1134.

Wasylyk, C., Kerckaert, J. P. and Wasylyk, B. (1992). A Novel Modulator Domain of Ets Transcription Factors. *Gene Develop.* 6, 965-974.

Wasylyk, B., Hahn, S. L. and Giovane, A. (1993). The Ets family of transcription factors. *Eur. J. Biochem.* 211, 7-18.

Waters, S. B., Holt, K. H., Ross, S. E., Syu, L.-J., Guan, K.-L., Saltiel, A. R., Koretzky, G. A. and Pessin, J. E. (1995) Desensitization of ras activation by a feedback disassociation of the SOS-Grb2 complex. *J. Biol. Chem.* 270, 20883-20886.

Weinstat-Saslow, D. and Steeg, P. S. (1994). Angiogenesis and colonization in the tumor metastatic process: basic and applied advances. *FASEB J.* 8, 401-407.

Wernert, N., Raes, M. B., Lassalle, P., Dehouck, M. P., Gosselin, B., Vandebunder, B. and Stéhelin, D. (1992). The c-ets-1 proto-oncogene is a transcription factor expressed in endothelial cells during tumor vascularisation and other forms of angiogenesis in man. *Am. J. Pathol.* 140, 119-127.

Westwick, J. K., Bielawska, A. E., Dbaibo, G., Hannun, Y. A. and Brenner, D. A. (1995). Ceramide activates the stress-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* 270, 22689-22692.

Wiegmann, K., Schütze, S., Machleidt, T., Witte, D. and Krönke, M. (1994). Functional dichotomy of neutral and acidic sphingomyelinases in tumor necrosis factor signaling. *Cell* 78, 1005-1015.

Woessner, J. F. (1991). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J.* 5, 2145-2154.

Wolf, C., Lefebvre, O., Rouyer, N., Chenard, M.-P., Bellocq, J.-P., Rio, M.-C., Chambon, P. and Basset, P. (1994) Protéases d'origine stromale et progression tumorale. *M/S-Med. Sci.* 10, 507-515.

Wolff, R. A., Dobrowsky, R. T., Bielawska, A., Obeid, L. M. and Hannun, Y. A. (1994). Role of ceramide-activated protein phosphatase in ceramide-mediated signal transduction. *J. Biol. Chem.* 269, 19605-19609.

Wotton, D., Ghysdael, J., Wang, S., Speck, N. A., Owen, M. J. (1994) Cooperative binding of Ets-1 and core binding factor to DNA. *Mol. Cell. Biol.* 14, 840-850.

Yan, M., Dai, T., Deak, J. C., Kyriakis, J. M., Zon, L. I., Woodgett, J. R. and Templeton, D. J. (1994). Activation of stress-activated protein kinase by MEKK1 phosphorylation of its activator SEK1. *Nature* 372, 798-800.

Yanaga, F., Abe, M., Koga, T. and Hirata, M. (1992). Signal transduction by tumor necrosis factor alpha is mediated through a guanine nucleotide-binding protein in osteoblast-like cell line, MC3T3-E1. *J Biol Chem* 267, 5114-21.

Yang, B.-S., Hauser, C. A., Henkel, G., Colman, M. S., VanBeveren, C., Stacey, K. J., Hume, D. A., Maki, R. A. and Ostrowski, M. C. (1996). Ras-mediated phosphorylation of a conserved threonine residue enhances the translation activities of c-Ets1 and c-Ets2. *Mol. Cell. Biol.* 16, 538-547.

Yang, L., Camoratto, A. M., Baffy, G., Raj, S., Manning, D. and Williamson, J. R. (1993). Epidermal growth factor-mediated signaling of Gi-protein to activation of phospholipases in rat cultured hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 268, 3739-3746.

Yao, B., Zhang, Y., Delikat, S., Mathias, S., Basu, S. and Kolesnick, R. (1995). Phosphorylation of Raf by ceramide-activated protein kinase. *Nature* 378, 307-310.

Yee, D., Morales, F. R., Hamilton, T. C. and VonHoff, D. D. (1991). Expression of insulin like growth factor, its binding proteins and its receptor in ovarian cancer. *Cancer res.* 51, 5107.

Zanke, B. W., Boudreau, K., Rubie, E., Winnet, E., Tibles, L. A., Zon, L., Kyriakis, J., Liu, F.-F. and Woodgett, J. R. (1996). The stress-activated protein kinase pathway mediates cell death following injury induced by cis-platinum, UV irradiation or heat. *Curr. Biol.* 6, 606-613.

Zeisel, S. H. (1993). Choline phospholipids: signal transduction and carcinogenesis. *FASEB J.* 7, 551-557.

Zhang, Y., Lin, J. X., Yip, Y. K. and Vilcek, J. (1988). Enhancement of cAMP levels and protein kinase activity by tumor necrosis factor and interleukin 1 in human fibroblasts: role in the induction of interleukin 6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 6802-6805.

