

50376  
1997  
191

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE



**THESE**

présentée pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE**

**EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

par

**Jean Philippe BASUYAUX**

**ETUDES DES INTERACTIONS ENTRE LES FACTEURS  
DE TRANSCRIPTION ETS ET AP-1 DANS LA REGULATION  
DE LA COLLAGENASE-1 ET DE LA STROMELYSINE-1**

<sup>14</sup>  
Présentée en octobre 1997 devant la commission d'examen :

Président : **Pr André VERBERT**

Rapporteurs : **Dr Jean Marie BLANCHARD**

**Pr Philippe BIREMBAUT**

Examineurs : **Dr Giovanna BUTTICE**

**Dr Yvan de LAUNOIT**

**Dr Dominique LEPRINCE**

Directeur de thèse : **Pr Dominique STEHELIN**

jeu 2006/10

# 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 14 octobre 1997

par **Jean Philippe BASUYAUX**

devant la commission d'examen :

Président : **Jean Pierre BOHIN**, Professeur des Universités,  
Université des Sciences et Technologies de Lille  
Laboratoire de Chimie Biologique  
Bâtiment C9  
59655 VILLENEUVE D'ASCQ

Rapporteurs : **Jean Marie BLANCHARD**, Docteur,  
Directeur de Recherche CNRS,  
Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier  
CNRS UMR 5535  
1919, route de Mende  
34293 MONTPELLIER CEDEX 5

**Philippe BIREMBAUT**, Professeur des Universités  
et Praticien Hospitalier  
INSERM U314  
CHR Maison Blanche  
45, rue Cognacq Jay  
51093 REIMS CEDEX

Examineurs : **Giovanna BUTTICE**, Docteur,  
CNRS UMR 319

**Yvan de LAUNOIT**, Docteur,  
Chargé de Recherche CNRS,  
CNRS UMR 319

**Dominique LEPRINCE**, Docteur,  
Directeur de Recherche CNRS,  
Institut de Recherche sur le Cancer de Lille  
Place de Verdun  
59045 LILLE

Directeur de thèse  
et examinateur : **Dominique STEHELIN**, Professeur,  
Directeur de Recherche CNRS,  
Institut de Biologie de Lille  
Unité des Mécanismes du Développement et de la Cancérisation  
CNRS UMR 319,  
1, rue du Professeur Calmette B.P. 447  
59021 LILLE  
tel : (33) 03 20 87 10 12/13 - télécopie : (33) 03 20 87 10 19

## Dédicace

Ce mémoire est dédié aux personnes qui ont rendu possible ce travail et qui m'ont encouragé par leur présence,

à ma famille, qui m'a accompagné par sa grande sollicitude tout au long de mes études et dont l'amour est toute la base de mon développement et de mon équilibre,

à mes collègues et amis, qui m'ont accueilli dans leur laboratoire, dans leur groupe, dont j'ai partagé le travail, qui m'ont aidé à de nombreuses occasions et qui m'ont encore témoigné leur attention en corrigeant ce mémoire,

à mes amis, de Lille et d'autres régions, dont l'affection très généreuse a été un soutien véritable et très précieux,

aux membres du jury et à Paul BASSET, qui ont accepté de se consacrer à l'évaluation minutieuse de mon travail,

à ceux qui nous ont quittés, à Marie-Pierre LAGET qui m'est encore présente par sa clarté et ses qualités.

# Table des matières

<b>1. LES METALLOPROTEASES DE LA MATRICE.....</b>	<b>15</b>
<b>1.1. Présentation.....</b>	<b>15</b>
<b>1.2. La classification des métalloprotéases.....</b>	<b>16</b>
1.2.1. Les métalloprotéases à zinc. ....	16
1.2.2. La super-famille des metzincines. ....	16
<b>1.3. Les métalloprotéases de la matrice (MMPs).....</b>	<b>17</b>
1.3.1. La famille des MMPs.....	17
1.3.1.1. Caractéristiques générales de la famille.....	17
1.3.1.2. La structure des MMPs.....	18
1.3.1.3. La localisation des MMPs.....	19
1.3.2. L'activation des pro-MMPs.....	19
1.3.2.1. Le mécanisme d'activation de la plupart des MMPs.....	19
1.3.2.2. Activation par des MMPs.....	20
1.3.2.3. Activation par le système du plasminogène.....	22
1.3.2.4. Activation par la cathepsine B.....	23
1.3.2.5. Activation par des protéases de mastocytes.....	24
1.3.2.6. Activation par l'ESAF.....	24
1.3.2.7. Activation de la stromélysine-3 et des MT-MMPs.....	24
1.3.3. Les substrats des MMPs.....	25
1.3.3.1. Introduction : la matrice extracellulaire.....	25
1.3.3.2. La matrice des tissus conjonctifs.....	25
1.3.3.3. La membrane basale.....	27
1.3.3.4. Activité des MMPs sur la matrice extracellulaire.....	27
1.3.3.5. Les autres substrats des MMPs.....	27
<b>1.4. Les tissu-inhibiteurs des métalloprotéases (TIMPs).....</b>	<b>28</b>
1.4.1. La famille TIMP.....	28
1.4.2. L'inhibition des MMPs par les TIMPs.....	29
1.4.3. Régulation de TIMP-2 par la plasmine. ....	30
1.4.4. Propriétés particulières des gélatinases et des TIMPs 1 et 2.....	31
1.4.4.1. Le complexe TIMP-2 / gélatinase A.....	31
1.4.4.2. Les complexes MT-MMP / TIMP-2 / gélatinase A.....	31
1.4.4.3. L'inhibiteur long des métalloprotéases.....	32
1.4.4.4. Deux états pour la gélatinase A.....	32
1.4.4.5. Le complexe TIMP-1 / gélatinase B. ....	32
1.4.4.6. Conclusion.....	33
1.4.5. Les TIMPs et la prolifération cellulaire.....	33
1.4.5.1. TIMP-1 stimule la croissance cellulaire.....	33
1.4.5.2. La prolifération des cellules endothéliales. ....	34
1.4.6. L'activité potentiatrice érythroïde des TIMPs 1 et 2.....	34
1.4.7. Conclusion.....	34
<b>1.5. Expression des MMPs et des TIMPs dans le développement.....</b>	<b>34</b>
1.5.1. L'implantation du blastocyste.....	34
1.5.2. La différenciation de l'endoderme. ....	35
1.5.3. La formation des os. ....	35
1.5.4. La morphogenèse de branchement.....	36
1.5.5. La morphogenèse des glandes salivaires.....	36

<b>1.6. Les MMPs et TIMP-1 dans la réparation des blessures.</b>	<b>36</b>
1.6.1. Introduction.....	36
1.6.2. Localisation histologique de la collagénase-1 et de TIMP-1.....	37
1.6.3. Expression comparative des MMPs.....	37
1.6.4. Le bFGF et la réparation des blessures.....	38
1.6.5. Conclusion.....	38
<b>1.7. Implication des MMPs et des TIMPs dans l'invasion tumorale et la formation des métastases.</b>	<b>39</b>
1.7.1. Introduction : la progression tumorale.....	39
1.7.2. Expression des MMPs dans les tumeurs.....	42
1.7.2.1. Introduction.....	42
1.7.2.2. Diversité de l'expression des MMPs.....	42
1.7.2.3. Expression précoce de la matrilysine.....	42
1.7.2.4. Gélatinase A, MT-MMP-1 et invasion tumorale.....	44
1.7.2.5. Expression des MMPs et pronostic clinique.....	44
1.7.2.6. Conclusion.....	45
1.7.3. Expression des TIMPs dans les tumeurs.....	45
1.7.3.1. Introduction.....	45
1.7.3.2. TIMP peut inhiber la progression tumorale.....	46
1.7.3.3. TIMP pourrait promouvoir la progression tumorale.....	47
1.7.3.4. Conclusion.....	48
1.7.4. Utilisation thérapeutique des inhibiteurs de protéases.....	49
1.7.5. Interactions cellules néoplasiques / fibroblastes.....	49
1.7.5.1. Modélisation des interactions néoplasme / stroma.....	49
1.7.5.2. Expression des MMPs et de TIMP-1.....	49
1.7.5.3. Implication du facteur de transcription Ets1.....	50
<b>1.8. Implication des MMPs et TIMPs dans l'angiogenèse tumorale.</b>	<b>51</b>
1.8.1. Introduction.....	51
1.8.2. Cultures de cellules endothéliales.....	52
1.8.2.1. Expression des MMPs et des TIMPs.....	52
1.8.2.2. Facteurs de transcription liés à l'angiogenèse.....	52
1.8.3. Un modèle de l'angiogenèse tumorale.....	52
1.8.4. Observations <i>in vivo</i> .....	53
1.8.5. L'activité anti-angiogénique des TIMPs 1 et 2.....	54
1.8.6. Conclusion.....	54
<b>1.9. La régulation transcriptionnelle des MMPs et des TIMPs.</b>	<b>55</b>
1.9.1. Eléments régulateurs et facteurs de transcription.....	55
1.9.1.1. Présentation d'ensemble.....	55
1.9.1.2. Les sites EBS et AP-1. Le site TTCA.....	55
1.9.1.3. Induction par E1A-F.....	60
1.9.1.4. Le site SPRE.....	60
1.9.1.5. Le site TIE et l'inhibition par le TGF- $\beta$ .....	61
1.9.1.6. Les sites NIP et UEF3/NIP.....	62
1.9.1.7. Boîte TATA versus sites Sp1.....	62
1.9.2. Autres mécanismes régulateurs.....	62
1.9.2.1. Induction de la stromélysine-1 par la cycloheximide.....	62
1.9.2.2. Facteurs de croissance et cytokines.....	63
1.9.2.3. Régulation par les récepteurs nucléaires.....	66
1.9.2.4. Régulation des MMPs par les intégrines et la MEC.....	71
1.9.2.5. Induction de MMPs par SPARC.....	73
1.9.2.6. Le facteur tumoral stimulant la collagénase.....	74
1.9.2.7. Inhibition par la protéine E1A de l'adénovirus.....	74
1.9.3. Conclusion.....	76

<b>2. LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION FOS ET JUN.....</b>	<b>78</b>
<b>2.1. Les familles Fos et Jun.....</b>	<b>78</b>
<b>2.2. La dimérisation des facteurs Fos et Jun.....</b>	<b>78</b>
2.2.1. La dimérisation des facteurs Fos et Jun entre eux.....	78
2.2.2. La dimérisation avec ATF-CREB.....	79
2.2.3. La dimérisation avec Maf.....	79
2.2.4. La dimérisation avec NF-IL6.....	80
<b>2.3. Liaison à l'ADN.....</b>	<b>80</b>
2.3.1. Les sites AP-1 et TRE.....	80
2.3.2. Le site ATF/CRE.....	81
<b>2.4. Activité transcriptionnelle.....</b>	<b>81</b>
2.4.1. Activité des différents facteurs Fos et Jun.....	81
2.4.1.1. Généralités.....	81
2.4.1.2. Régulation du promoteur de l'IL-2.....	82
2.4.2. Activité des hétérodimères Fos-Jun / ATF-CREB.....	83
2.4.2.1. Généralités.....	83
2.4.2.2. Régulation de l'uPA.....	83
2.4.2.3. Régulation du TNF- $\alpha$ .....	83
2.4.3. Conclusion.....	84
<b>2.5. Régulation par phosphorylation.....</b>	<b>84</b>
2.5.1. c-Jun est activé par phosphorylation.....	84
2.5.2. Plusieurs kinases phosphorylent les facteurs Fos-Jun.....	84
<b>2.6. CREM est un antagoniste des facteurs Fos et Jun.....</b>	<b>85</b>
<b>2.7. Autres modulateurs de Fos-Jun et de ATF-CREB.....</b>	<b>87</b>
2.7.1. IP-1.....	87
2.7.2. AF-1.....	87
2.7.3. ABP.....	87
<b>2.8. Le complexe c-Fos / c-Jun courbe l'ADN.....</b>	<b>87</b>
<b>2.9. Interaction physique avec la machinerie transcriptionnelle.....</b>	<b>88</b>
2.9.1. Le complexe d'initiation de la transcription.....	88
2.9.2. Interaction avec la machinerie transcriptionnelle.....	88
2.9.3. Conclusion.....	89
<b>2.10. Régulation de l'expression des gènes fos et jun.....</b>	<b>89</b>
2.10.1. Introduction.....	89
2.10.2. Régulation de <i>c-jun</i> via les TREs.....	90
2.10.3. Régulation de <i>junB</i> .....	90
2.10.4. Régulation de <i>junD</i> .....	91
2.10.5. Régulation de <i>c-fos</i> .....	92
2.10.5.1. Régulation via les sites adjacents SRE et FAP.....	92
2.10.5.2. Régulation via le CRE.....	94
2.10.5.3. Régulation par le GMPC.....	94
2.10.5.4. Régulation via le SIE.....	95
2.10.5.5. Régulation post-transcriptionnelle.....	95
2.10.6. Régulation de <i>fosB</i> .....	95
2.10.7. Régulation de <i>fra1</i> et de <i>fra2</i> via des sites AP-1.....	96
2.10.8. Conclusion.....	96
<b>2.11. Conclusion.....</b>	<b>96</b>

<b>3. LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION ETS.....</b>	<b>97</b>
<b>3.1. La famille.....</b>	<b>97</b>
<b>3.2. Liaison à l'ADN : les sites EBS.....</b>	<b>97</b>
3.2.1. Le site EBS.....	97
3.2.2. Liaison d'une paire de sites EBS.....	98
3.2.3. Régulation intramoléculaire de la liaison à l'ADN.....	99
3.2.4. La liaison à l'ADN induit un changement de conformation.....	100
<b>3.3. Les domaines régulateurs de l'activité transcriptionnelle.....</b>	<b>100</b>
<b>3.4. Régulation par phosphorylation.....</b>	<b>100</b>
3.4.1. Régulation de la liaison à l'ADN.....	100
3.4.2. Régulation de la capacité transactivatrice.....	101
3.4.2.1. Régulation de Ets1 et Ets2.....	101
3.4.2.2. Régulation des TCFs.....	101
3.4.2.3. Régulation de Erf.....	102
3.4.3. Conclusion.....	102
<b>3.5. Stabilité des protéines.....</b>	<b>102</b>
<b>3.6. Régulation par réduction ou oxydation.....</b>	<b>102</b>
<b>3.7. Activité transcriptionnelle.....</b>	<b>103</b>
3.7.1. Activation <i>versus</i> inhibition.....	103
3.7.2. Coopérations et antagonismes.....	103
3.7.2.1. Coopération avec Myb.....	103
3.7.2.2. Coopération avec AP-1 ou antagonisme.....	104
3.7.2.3. Coopération avec Sp1.....	106
3.7.2.4. Induction et inhibition via des sites EBS.....	106
3.7.2.5. Antagonismes Ets / récepteurs nucléaires.....	107
3.7.2.6. Inhibition par Ets1 via un site ISRE.....	108
3.7.2.7. Inhibition par Elf1 via un site GAS.....	108
3.7.3. Interactions physiques de Ets avec d'autres facteurs.....	108
3.7.3.1. Ets1 et GHF1.....	108
3.7.3.2. Ets1 et PEBP2 $\alpha$ .....	109
3.7.3.3. Ets1 et MafB.....	109
3.7.3.4. Erg et c-Fos / c-Jun.....	109
3.7.3.5. Elf1 et Jun.....	109
3.7.3.6. Elf1 et NF $\kappa$ B/NFAT.....	110
3.7.3.7. Elk et Pax5.....	111
3.7.3.8. Elk et SRF.....	111
3.7.3.9. GABP $\alpha$ et GABP $\beta$ .....	112
3.7.3.10. Le domaine d'oligomérisation de Tel.....	112
3.7.4. Interaction de PU.1 avec la machinerie transcriptionnelle.....	112
3.7.5. Conclusion.....	112
<b>3.8. Régulation de l'expression des gènes ets.....</b>	<b>113</b>
3.8.1. L'expression des gènes <i>ets</i> .....	113
3.8.2. Expression de <i>ets1</i> .....	113
3.8.2.1. Régulation transcriptionnelle.....	113
3.8.2.2. Epissage alternatif.....	114
3.8.3. Régulation transcriptionnelle de <i>ets2</i> .....	114
3.8.4. Les isoformes Erg.....	115
<b>3.9. Conclusion.....</b>	<b>115</b>

<b>4. RESULTATS.....</b>	<b>116</b>
<b>4.1. Publication 1.....</b>	<b>116</b>
4.1.1. Résumé.....	116
4.1.2. Discussion.....	122
<b>4.2. Publication 2.....</b>	<b>124</b>
4.2.1. Résumé.....	124
4.2.2. Discussion.....	150
<b>4.3. Résultats complémentaires.....</b>	<b>152</b>
4.3.1. Introduction.....	152
4.3.2. Résultats.....	152
4.3.3. Conclusion.....	153
<b>5. DISCUSSION.....</b>	<b>156</b>
<b>5.1. Signification physiologique de la régulation par Ets2 et Erg.....</b>	<b>156</b>
<b>5.2. La régulation des MMPs et les protéines CBP et p300.....</b>	<b>156</b>
5.2.1. Présentation.....	156
5.2.2. CBP, p300 et la machinerie transcriptionnelle.....	157
5.2.3. CBP et p300 sont des cofacteurs d'AP-1 ciblés par E1A.....	157
5.2.3.1. Interaction de CBP/p300 avec c-Fos et c-Jun.....	157
5.2.3.2. Ciblage de CBP/p300 par E1A.....	158
5.2.4. Interaction de CBP avec des facteurs Ets.....	159
5.2.4.1. Régulation du gène MSR.....	159
5.2.4.2. Induction de c-fos.....	160
5.2.5. Ets2, mais pas Erg, interagit physiquement avec p300.....	160
5.2.5.1. Présentation.....	160
5.2.5.2. Résultats.....	161
5.2.6. Conclusion.....	161
5.2.7. Remerciements.....	162
<b>6. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>164</b>

## Table des illustrations

<u>Figure 1.</u> Domaines fonctionnels de six membres représentatifs de la famille des métalloprotéases de la matrice. ....	18
<u>Figure 2.</u> Un modèle d'activation pour la plupart des métalloprotéases de la matrice. ....	20
<u>Figure 3.</u> Représentation schématique des activations de MMPs par d'autres MMPs.....	21
<u>Figure 4.</u> L'activation en cascade de différentes familles de protéases conduit à la dégradation de la matrice extracellulaire. ....	23
<u>Figure 5.</u> Structure primaire de TIMP-1. ....	29
<u>Figure 6.</u> L'équilibre MMPs / TIMPs conditionne l'effet de l'apport d'une MMP ou d'un TIMP, sur l'activité protéolytique extracellulaire.....	30
<u>Figure 7.</u> Histologie de la progression tumorale. ....	40
<u>Figure 8.</u> La régulation de l'activité protéolytique extracellulaire fait partie d'un réseau d'événements interdépendants qui concourent à la progression tumorale. ....	41
<u>Figure 9.</u> Sites fonctionnels ou potentiels des promoteurs de quelques MMPs et TIMPs. ....	56
<u>Figure 10.</u> Transduction des signaux mitogènes et de stress <i>via</i> des protéines kinases.....	86
<u>Figure 11.</u> Classification des membres de la famille Ets.....	98
<u>Figure 12.</u> Ets2 et Erg coopèrent à la liaison à l'ADN. ....	154
<u>Figure 13.</u> Modèle d'interaction entre Ets2 et Erg dans la régulation du promoteur de la stromélysine-1.....	155
<u>Figure 14.</u> Les protéines Ets2, Erg et ERM interagissent différemment avec la p300.....	163
<u>Table 1.</u> Les composants de la matrice extracellulaire sont des substrats des métalloprotéases de la matrice. ....	26
<u>Table 2.</u> Expression des métalloprotéases de la matrice dans les tumeurs humaines. ....	43
<u>Table 3.</u> Régulation des MMPs et des TIMPs par des facteurs de croissance et des cytokines.....	64
<u>Table 4.</u> La progestérone et les œstrogènes régulent l'expression de plusieurs MMPs et TIMPs dans l'utérus (endomètre, myomètre, col).....	71
<u>Table 5.</u> L'activation des intégrines régule l'expression de la collagénase-1, de la stromélysine-1 et des gélatinases A et B.....	72
<u>Table 6.</u> Des facteurs spécifiques des familles Fos-Jun et ATF-CREB forment des hétérodimères.....	79

## Abréviations

ADNc :	ADN complémentaire d'un ARN messenger
AMPc :	adénosine 3', 5'-monophosphate
AP-1 :	protéine activatrice 1 (peut désigner un complexe Fos / Jun ou son site de fixation sur l'ADN)
APMA :	4-aminophénylmercurique acétate
AR :	récepteur des androgènes
ARNm :	ARN messenger
bFGF :	facteur de croissance basique des fibroblastes
CaM-KII :	kinase dépendante du calcium et de la calmoduline
CBP :	protéine liant CREB
CRE :	élément activateur régulé par l'AMPc
CREB :	protéine liant le CRE
DBD :	domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription
DMBA :	7, 12-dimethylbenz(a)anthracène
EBS :	site de liaison de Ets
<i>egr</i> :	gène de réponse précoce de la croissance
EPA :	activité potentiatrice érythroïde
ER :	récepteur des œstrogènes
ERK :	protéine kinase régulée par des signaux extracellulaires
ESAF :	facteur d'angiogenèse stimulant les cellules endothéliales
GAS :	site activé par l'interféron $\gamma$
GR :	récepteur des glucocorticoïdes
H7 :	un inhibiteur des kinases PKA, PKC et PKG
IL :	interleukine
ISRE :	élément de réponse stimulé par l'interféron $\alpha$
JNK :	kinase du domaine N-terminal de Jun
LBD :	chez un récepteur, domaine de liaison au ligand
like :	terme anglais qualifiant un site sur l'ADN dont la séquence est semblable au consensus reconnu par un facteur de transcription
MAP kinase :	protéine kinase activée par des agents mitogènes
matrigel :	extrait de membrane basale d'un sarcome de Engelbreth-Holm-Swarm, constituant un milieu semi-solide utilisé en culture cellulaire
MEK :	MAP ou ERK kinase
MMP :	métalloprotéase de la matrice
n :	un nucléotide G, A, T ou C

NIP :	protéine nucléaire d'inhibition
PA :	activateur du plasminogène (uPA ou tPA)
PAI :	inhibiteur d'un activateur du plasminogène
PEA3 :	élément activateur A3 du virus du polyome
PKA :	protéine kinase dépendante de l'AMP cyclique
PKC :	protéine kinase C
PKG :	protéine kinase dépendante du GMP cyclique
PMA :	phorbol 12-myristate 13-acétate (un ester de phorbol)
PR :	récepteur de la progestérone
RA :	acide rétinoïque
RAR, RXR :	récepteurs de l'acide rétinoïque
RARE :	élément de réponse à l'acide rétinoïque
RSK :	kinase ribosomale S6
SDS :	dodécyl sulphonate de sodium
Ser :	sérine
SPARC :	protéine sécrétée acide et riche en cystéine
SPRE :	élément de réponse au PDGF de la stromélysine-1
SRE :	élément de réponse au sérum
TBP :	protéine liant la boîte TATA
TCF :	facteur de complexe ternaire
TGF- $\beta$ :	facteur de croissance transformant bêta
Thr :	thréonine
TIE :	élément d'inhibition TGF- $\beta$
TIMP :	tissu-inhibiteur des MMPs
TK :	thymidine kinase
TNF :	facteur de nécrose de tumeur
TPA :	agent promoteur de tumeur, 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate (un ester de phorbol)
tPA :	tissu-activateur du plasminogène
TRE :	élément de réponse au TPA
Tyr :	tyrosine
U.V. :	rayons ultra-violets
UEF :	facteur de l'élément activateur de l'uPA
uPA :	activateur du plasminogène de type urokinase
uPA-R :	récepteur de l'uPA
VEGF :	facteur de croissance endothélial vasculaire
VIH :	virus de l'immunodéficiência humaine
x :	un acide aminé indéterminé

## Notes

1. Afin de faciliter la consultation du mémoire, des termes sont indiqués en gras tout au long du texte. Cette disposition permet l'identification rapide des acteurs biologiques et des processus impliqués dans les résultats présentés.

2. Le terme anglais « like », qui signifie semblable, a été utilisé pour désigner de manière concise un site semblable, mais pas identique, à un site consensus permettant la liaison d'un facteur de transcription à l'ADN avec une affinité optimale. Par exemple, TGACACA est un site AP-1 like, c'est-à-dire un site semblable au consensus TGA(G/C)TCA reconnu par les facteurs de la famille AP-1. La distinction entre site consensus et site « like » est biologiquement significative au niveau transcriptionnel. D'une manière schématique, un facteur de transcription peut lier seul d'une manière stable un site consensus. Au contraire, la stabilisation du complexe formé par un facteur sur un site « like » de faible affinité nécessitera une interaction physique avec un deuxième facteur, reconnaissant un autre site dans un même promoteur. Cette combinatoire favorise le recrutement des facteurs de transcription sur l'ADN et contribue à la spécificité de la régulation des gènes cibles.

La notation « like » est particulièrement pratique quand il s'agit de désigner une paire de sites voisins dont l'un n'est pas un site consensus. La notation « paire EBS-AP-1 like » désigne ainsi la « paire d'un site EBS et d'un site semblable à AP-1 ».

## **Le stage de thèse**

Le stage permettant cette candidature au doctorat a débuté en septembre 1993 et est dirigé par le Professeur Dominique STEHELIN, directeur de l'Unité des Mécanismes du Développement et de la Cancérisation, UMR 319 du CNRS. J'ai rejoint le groupe du Docteur Giovanna BUTTICE dont le thème de recherche est la régulation transcriptionnelle des métalloprotéases de la matrice par les oncogènes. Elisabeth FERREIRA, Assistant Ingénieur CNRS, nous a rejoint en 1994. J'ai bénéficié d'une allocation du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (1993-96) et d'une allocation de l'Association pour la Recherche sur le Cancer (1996-97).

## **Présentation du mémoire**

Le mémoire comporte une introduction détaillée sur la famille des métalloprotéases de la matrice (MMPs) et leurs inhibiteurs (TIMPs), sur leur biochimie, leur expression dans le développement, la réparation des blessures, l'invasion tumorale, l'angiogenèse tumorale, la formation des métastases, ainsi que sur leur régulation transcriptionnelle. Les familles de facteurs de transcription Fos-Jun (AP-1) et Ets sont également présentées. Ce sont des oncoprotéines impliquées dans la régulation de nombreux gènes, en particulier de plusieurs MMPs et de TIMP-1, un inhibiteur des MMPs. Ces facteurs de transcription réalisent des interactions protéiques entre eux et avec plusieurs autres familles, ce qui contribue à la complexité et à la spécificité de la régulation de leurs gènes cibles.

Nos résultats expérimentaux sont présentés sous la forme de deux articles. Nous montrons que les promoteurs de la collagénase-1 et de la stromélysine-1 sont régulés différemment par Ets2, Erg et c-Fos / c-Jun. La spécificité de cette régulation met en jeu des interactions physiques de Ets2 et Erg avec c-Fos / c-Jun et de Ets2 avec Erg. Alors que le mémoire est en cours de rédaction, le premier article est publié et le deuxième est soumis à The Journal of Biological Chemistry. Les discussions proposées dans les articles sont résumées en français dans le mémoire. Les articles sont suivis de quelques résultats complémentaires. La discussion qui termine le mémoire s'intéresse plus particulièrement à l'implication des coactivateurs CBP et p300 dans la régulation de la transcription par les facteurs Fos-Jun et Ets. Ces facteurs pourraient jouer un rôle clé dans la spécificité de la régulation de la collagénase-1 et de la stromélysine-1 par Ets2 et Erg.

## Résumé

La collagénase-1 et la stromélysine-1 sont des métalloprotéases de la matrice (MMPs) qui dégradent différents composants de la membrane basale et de la matrice extracellulaire. Les MMPs jouent un rôle critique dans le développement des cancers, dans l'invasion tumorale, l'angiogenèse et la formation des métastases. Les familles de facteurs de transcription Fos-Jun et Ets sont constituées d'oncoprotéines impliquées dans la génération de plusieurs cancers. Dans notre étude expérimentale, nous nous sommes intéressés à la régulation de la stromélysine-1 et de la collagénase-1 par des membres spécifiques de ces familles.

c-Fos et c-Jun forment un dimère qui lie le site AP-1 et qui induit les promoteurs de plusieurs MMPs. L'induction *via* AP-1 est le mécanisme transcriptionnel majeur de l'expression de la collagénase-1 et de la stromélysine-1. Toutefois, AP-1 n'agit pas seul. Les facteurs de la famille Ets lient des sites EBS et coopèrent avec les facteurs AP-1 pour l'induction de la transcription. Nous montrons que Erg (« gène se rapprochant de *ets* ») est recruté sur un site EBS (-89) de la collagénase-1 par le dimère c-Fos / c-Jun lié au site AP-1 voisin (-72). Au contraire, Erg n'induit pas le promoteur de la stromélysine-1 et il inhibe l'expression induite par Ets2 *via* un tandem inversé de sites EBS (-216, -208) distant du site AP-1 (-70).

Afin de comprendre au niveau moléculaire les mécanismes régulateurs de la transcription de la collagénase-1 et de la stromélysine-1, nous avons étudié les interactions protéiques directes entre ces facteurs de transcription. Nous utilisons la technique de retard sur gel, un système de double-hybride en levure et un système d'interaction *in vitro* utilisant la protéine Ets2 fusionnée à la glutathion S-transférase (GST) et des produits c-Fos, c-Jun, Ets1, Ets2 et Erg traduits *in vitro*. Nous montrons que Erg et le complexe c-Fos / c-Jun lient la protéine de fusion GST-Ets2. L'utilisation de protéines GST-Ets2 tronquées indique que Erg lie à la fois la région transactivatrice N-terminale de Ets2 et la région C-terminale liant l'ADN. Le complexe c-Fos / c-Jun ne lie que la région C-terminale de Ets2. De plus, l'interaction entre c-Fos / c-Jun et Ets2 est favorisée par un fragment présentant les deux sites EBS du promoteur de la stromélysine-1. Ces données suggèrent que des interactions protéiques entre des facteurs de transcription peuvent moduler différemment l'expression de gènes ayant des motifs semblables, mais organisés différemment, comme dans le cas de la collagénase-1 et de la stromélysine-1.

## Mots clés

Métalloprotéases de la matrice, régulation de la transcription, oncogènes, famille AP-1 (c-Fos, c-Jun), famille Ets (Ets2, Erg), interactions protéiques directes.

## **Abstract**

Collagenase-1 and stromelysin-1 are matrix metalloproteinases (MMPs) that degrade several components of basal membranes and extracellular matrix. MMPs are critically involved during cancer progression, in tumor invasion, angiogenesis and metastasis. Fos-Jun and Ets transcription factors are oncogene families expressed in several cancers. Our experimental work focuses on collagenase-1 and stromelysin-1 regulation by specific members of these families.

c-Fos and c-Jun are components of a dimer that binds the AP-1 site and induces several MMPs promoters. Induction *via* AP-1 factors is the major transcriptional mechanism regulating collagenase-1 and stromelysin-1. However, this mechanism does not involve AP-1 only. Ets factors bind to EBS sites and cooperate with AP-1 factors to induce transcription. We show that Erg (*ets* related gene) is recruited to a collagenase-1 EBS site (-89) by the c-Fos / c-Jun dimer bound to the adjacent AP-1 site (-72). On the contrary, Erg does not induce stromelysin-1 and inhibits the expression induced by Ets2 *via* an inverted EBS repeat (-216, -208) distant from the AP-1 site (-70).

To understand in molecular detail the mechanisms regulating collagenase-1 and stromelysin-1 transcription, we have investigated the direct protein interactions between these transcription factors. We use an electrophoretic mobility shift assay, a double hybrid system in yeast and an *in vitro* protein interaction assay (pull down) with Ets2 protein fused to the glutathione S-transferase (GST) and Fos, Jun, Ets1, Ets2 and Erg *in vitro* translated. We demonstrate that Erg and c-Fos / c-Jun bind to the GST-Ets2 fusion protein. GST-Ets2 deletants show that Erg binds both the N-terminal transactivation region and the C-terminal DNA binding region of Ets2, while c-Fos / c-Jun binds only to the C-terminal region. Moreover, the interaction between c-Fos / c-Jun and Ets2 is enhanced by two EBS sites from the stromelysin-1 promoter. These results suggest that direct protein interactions between transcription factors may differentially regulate the expression of genes with similar elements but differently organised, as for collagenase-1 and stromelysin-1.

## **Keywords**

Matrix metalloproteinases, transcription regulation, oncogenes, AP-1 family (c-Fos, c-Jun), Ets family (Ets2, Erg), direct protein interactions.

# 1. Les métalloprotéases de la matrice.

## 1.1. Présentation.

Les **métalloprotéases de la matrice** (MMPs) constituent une famille d'enzymes extracellulaires capables de dégrader les composants des membranes basales et de la matrice extracellulaire des tissus conjonctifs. Elles sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques normaux ou pathologiques, ce qui motive l'étude de la régulation de leur expression. Les MMPs sont impliquées dans le cycle menstruel (§ 1.9.2.3.6), dans l'implantation du blastocyste et dans le développement embryonnaire (§ 1.5), dans divers processus inflammatoires, dans l'artériosclérose (prolifération des cellules musculaires d'un vaisseau après dégradation de la membrane basale) (Newby, et al., 1994), dans la réparation des blessures (§ 1.6), dans l'arthrite (Meikle, et al., 1995, Ishiguro, et al., 1996, Kikuchi, et al., 1996), dans la périodontite (Ryan, et al., 1996) et dans le cancer (invasion tumorale, angiogénèse, métastases) (§ 1.7 et 1.8).

Les métalloprotéases de la matrice sont régulées au niveau transcriptionnel (expression des gènes codant pour les pro-enzymes, stabilisation des ARNm), ainsi qu'au niveau post-traductionnel (activation des pro-enzymes par clivage protéolytique, inhibition des enzymes). Leur activité est contrôlée par les **tissu-inhibiteurs des métalloprotéases** (TIMPs). Dans plusieurs cas, l'expression des MMPs et des TIMPs est régulée simultanément par les mêmes agents. L'activité protéolytique extracellulaire est une fonction complexe du niveau d'expression des protéases extracellulaires et de leurs inhibiteurs. Nous nous intéresserons plus particulièrement aux facteurs de transcription des familles Ets et AP-1 qui sont les principaux facteurs de transcription impliqués dans l'induction de plusieurs MMPs et TIMPs.

Le plasminogène (précurseur de la plasmine), ses activateurs (uPA et tPA), le récepteur de l'uPA (uPA-R), les inhibiteurs des activateurs (PAIs) et les inhibiteurs de la plasmine ( $\alpha$ 2-antiplasmine et  $\alpha$ 2-macroglobuline) constituent un système d'activité sérine protéase extracellulaire (Plow, et al., 1995). Le système du plasminogène a une importance comparable au système MMPs / TIMPs dans la régulation de l'adhérence cellulaire, de la migration, de l'invasion et de la formation des métastases (Conese et Blasi, 1995).

Physiologiquement, les protéases dégradant la matrice extracellulaire (MEC) agissent ensemble selon une cascade d'événements protéolytiques conduisant à la manifestation d'activités protéolytiques à large spectre. Par exemple, la plasmine et l'uPA contrôlent directement l'activation de plusieurs MMPs (§ 1.3.2.3). Les systèmes du plasminogène et des MMPs peuvent coopérer dans la progression tumorale (DeClerck et Laug, 1996).

Notre étude expérimentale concerne la régulation différentielle de la collagénase-1 et de la stromélysine-1 par des facteurs de transcription qui interagissent physiquement entre eux : Ets-2, Erg (famille Ets), c-Fos et c-Jun (famille AP-1).

## 1.2. La classification des métalloprotéases.

### 1.2.1. Les métalloprotéases à zinc.

Les métalloprotéases de la matrice constituent une famille de métalloprotéases à zinc. D'une manière générale, les métalloprotéases à zinc sont classées en fonction de leur site de liaison du zinc (Jiang et Bond, 1992). Ce site comporte deux résidus histidine (H), mais les autres résidus sont variables. On distingue les **gluzincines**, définies par le motif **HExxH...E** avec un autre acide glutamique (E) pour troisième ligand du zinc (x : un acide aminé indéterminé), les **metzincines**, définies par le motif **HExxH...H**, avec une histidine pour troisième ligand, les **inverzincines**, enzymes dégradant l'insuline, définies par le motif **HxxEH**, les **carboxypeptidases**, définies par le motif **HxxE**, et les **DD-carboxypeptidases**, définies par le motif **HxH** (Hooper, 1994).

### 1.2.2. La super-famille des metzincines.

Plus précisément, le site catalytique des metzincines présente un domaine conservé **HExxHxxGxxH** (G : glycine). Cette famille regroupe ainsi les **astacines** (des protéases de l'intestin et du rein et des protéines morphogénétiques), les **serralysines** (bactériennes), les **reprolysines** (des métalloprotéases de venin de serpent et des protéases de mammifère impliquées dans la reproduction) (Bjarnason et Fox, 1995, Fox et Bjarnason, 1995) et les **matrixines ou métalloprotéases de la matrice**. Les domaines catalytiques des metzincines présentent une faible homologie de séquence, mais ont des topologies similaires qui ont motivé leur regroupement dans une super-famille. Elles partagent en particulier un résidu méthionine proche du site de liaison du zinc (Stöcker et Bode, 1995).

Une autre famille dont certains membres sont des métalloprotéases a été caractérisée chez les mammifères. Il s'agit de la famille **ADAMs** (« A Disintegrin And Metalloprotease domain ») définie par la présence d'un domaine métalloprotéase et d'un domaine désintégrine (Wolfsberg, et al., 1995). Les désintégrines sont des protéines de venin de serpent de faible poids qui se lient aux intégrines et inhibent les interactions cellules / matrice et l'agrégation des plaquettes sanguines (Williams, 1992). Les ADAMs 1, 8, 9 et 10 présentent un site conservé de liaison du zinc **HExGHNxGxxH**, conforme au domaine consensus des metzincines et particulièrement semblable à celui des reprolysines.

ADAM 10 est connue comme une métalloprotéase fonctionnelle. Au contraire, les ADAMs 2, 7 et 11 n'ont probablement pas d'activité protéolytique car leur domaine de type métalloprotéase ne contient pas la séquence **HExxH**. **MDC** (« protéine de type Métalloprotéase et Désintégrine riche en Cystéine », ADAM 11) est un suppresseur de tumeur potentiel du locus **BRCA1**. Ce gène est inactivé dans deux tumeurs indépendantes du sein (Emi, et al., 1993). Le dimère fertilines  $\alpha / \beta$  (ADAMs 1 et 2) est nécessaire à la fusion spermatozoïde-ovule. Il n'est pas établi si toutes les ADAMs sont des molécules d'adhésion

fonctionnelles. Par leurs fonctions protéolytiques, adhésives ou fusogéniques, les ADAMs pourraient être impliquées dans de nombreux processus physiologiques ou pathologiques.

### **1.3. Les métalloprotéases de la matrice (MMPs).**

#### **1.3.1. La famille des MMPs.**

##### **1.3.1.1. Caractéristiques générales de la famille.**

La famille des MMPs (Matrisian, 1990, Woessner, 1991) regroupe des enzymes ayant les caractéristiques suivantes :

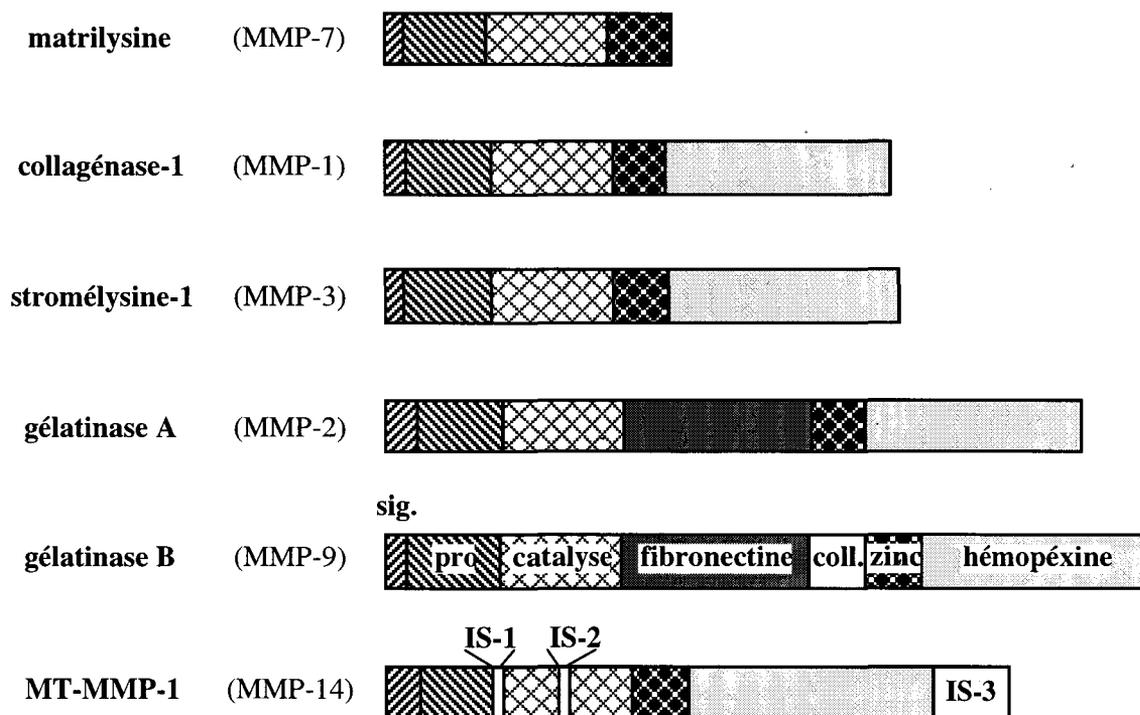
- Elles dégradent au moins un composant de la matrice extracellulaire (§ 1.3.3).
- Elles présentent des domaines fonctionnels conservés (figure 1).
- Elles fixent un ion zinc par un domaine conservé de séquence **HE<sub>x</sub>GH<sub>x</sub>LGL<sub>x</sub>H** (Takino, et al., 1995).
- Ce sont des pro-enzymes activées par clivage protéolytique. Elles sont sécrétées ou membranaires (§ 1.3.1.3).
- Elles sont inhibées par des inhibiteurs spécifiques, les tissu-inhibiteurs des métalloprotéases (TIMPs) (§ 1.4.2).

On dénombre aujourd'hui 17 métalloprotéases de la matrice caractérisées (table 1, page 26). Le premier membre identifié de la famille des MMPs, la collagénase interstitielle ou collagénase-1 (MMP-1), a été découvert en 1962 dans le cadre d'une étude sur la résorption de la queue des têtards en métamorphose (Gross et Lapière, 1962). Un système de nomenclature sous les appellations MMP-1, MMP-2, ... a été proposé (Okada, et al., 1986). MMP-4 (Nakano et Scott, 1987) et MMP-6 (Azzo et Woessner, 1986) n'ont été décrites que dans un seul laboratoire et leurs séquences ne sont pas disponibles. MMP-5 est identique à MMP-2. Deux nouvelles MMPs, appelées MMPs 18 (Cossins, et al., 1996) et 19 (Pendas, et al., 1997), sont partiellement caractérisées. La MMP-19 pourrait définir un nouveau groupe de MMPs. La collagénase-4, isolée chez le xénope, a été simultanément dénommée MMP-18 (Stolow, et al., 1996).

Les MMPs sont parfois classées par groupes en fonction de leurs domaines fonctionnels (table 1, page 26) ou de leurs substrats. Ces deux critères de classification sont en partie redondants et en partie complémentaires. La spécificité de substrat permet de distinguer, au sein du groupe des MMPs à domaine hémopéxine, un sous-groupe stromélysines et un sous-groupe collagénases-métalloélastase.

### 1.3.1.2. La structure des MMPs.

La gélatinase B (MMP-9) est le plus grand membre de la famille des MMPs. Elle présente 9 **domaines fonctionnels** (figure 1). Le peptide signal dirige la sécrétion de la pro-enzyme. Le pro-peptide est perdu lors de l'activation de l'enzyme. Le domaine catalytique est séparé du domaine liant le zinc par un domaine de type collagène V de fonction inconnue et par un domaine de type fibronectine qui interviendrait dans la reconnaissance des substrats, homologue du domaine de la fibronectine liant le collagène. Le domaine C-terminal de type hémopéxine lie spécifiquement la fibronectine et l'héparine en présence d'ions calcium (Wallon et Overall, 1997) et contribuerait également à la spécificité de substrat. Des insertions spécifiques sont observées chez les métalloprotéases membranaires (MT-MMPs) : les domaines IS-1 (11 résidus), IS-2 (8 résidus insérés dans le domaine catalytique) et IS-3 (74 résidus qui contiennent le domaine trans-membranaire de 24 acides aminés hydrophobes). La stromélysine-3 (MMP-11) présente aussi une insertion de 10 résidus semblable à IS-1 (Takino, et al., 1995). Le domaine IS-1 est impliqué dans le mécanisme original d'activation de ces MMPs (§ 1.3.2.7).



**Figure 1.** Domaines fonctionnels de six membres représentatifs de la famille des métalloprotéases de la matrice.

Sig. : peptide signal ; pro : pro-peptide ; catalyse : domaine catalytique ; coll. : domaine collagène V ; zinc : domaine de liaison de l'ion zinc ; IS-1, 2 et 3 : insertions spécifiques dans les MT-MMPs. Les différents domaines sont décrits dans les publications (Matrisian, 1990, Woessner, 1991, Takino, et al., 1995).

### 1.3.1.3. La localisation des MMPs.

La majorité des MMPs sont **sécrétées**. Dans la plupart des types cellulaires, les MMPs ne sont pas stockées, à l'exception des neutrophiles et des macrophages. Par exemple, la gélatinase A (MMP-2) est exprimée dans la lignée des granulocytes (neutrophiles, monocytes-macrophages) et est localisée chez les neutrophiles dans les granules secondaires qui sont un marqueur de différenciation myéloïde terminale (Graubert, et al., 1993). Les métalloprotéases sécrétées sont toujours des pro-enzymes inactives, sauf dans le cas de la stromélysine-3 (MMP-11) qui subit un clivage activateur pendant sa maturation intracellulaire (§ 1.3.2.7). La pro-gélatinase A (sécrétée) et la gélatinase A ont été détectées **immobilisées sur la MEC** (Keski, et al., 1992). Le domaine fibronectine des gélatinases pourrait directement expliquer leur liaison au collagène. Des études *in vivo* par immunohistochimie montrent que la collagénase-1 est détectée au niveau des fibres de collagène (Hembry, et al., 1986). La stromélysine-1 activée, la pro-stromélysine-1, la collagénase-1 activée, mais pas la pro-collagénase-1 lient des fibres de collagène *in vitro* (Allan, et al., 1991).

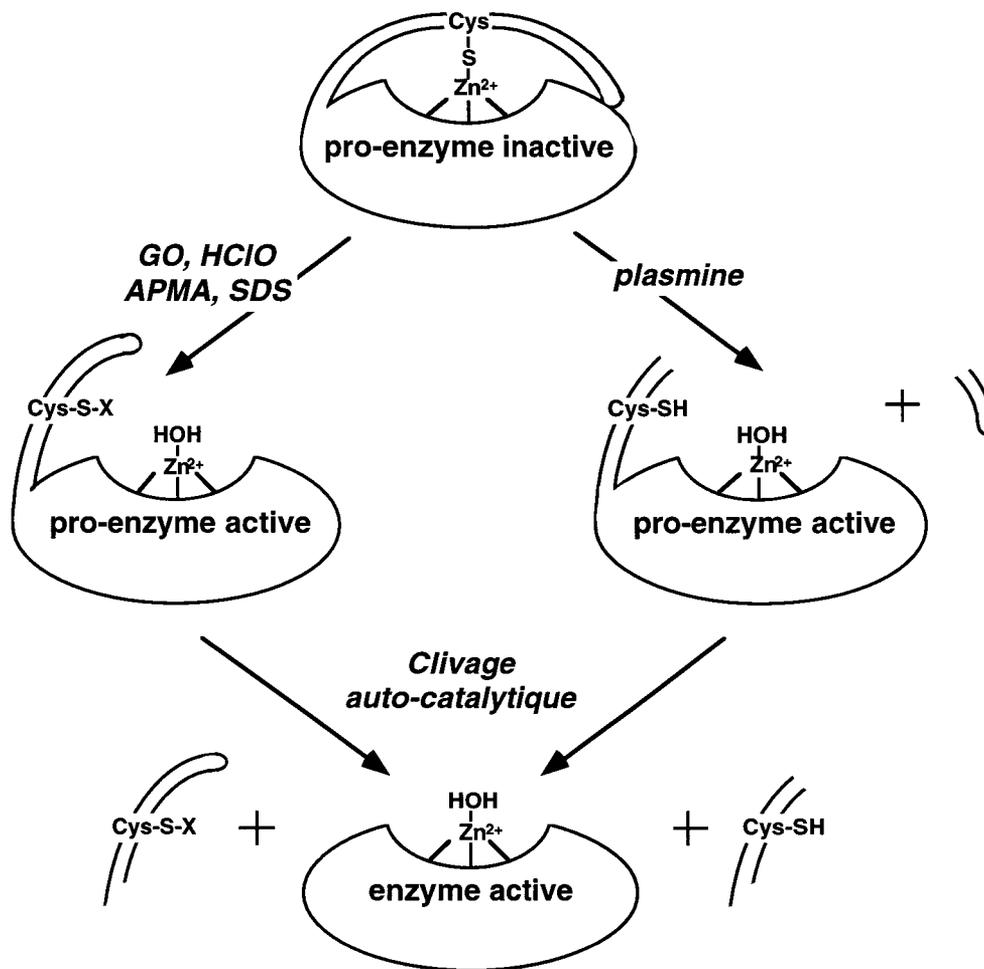
Quatre **MMPs membranaires** (MMPs 14 à 17) ont été découvertes récemment : MT-MMP-1 (Sato, et al., 1994), MT-MMP-2 (Takino, et al., 1995), MT-MMP-3 (Will et Hinzmann, 1995, Shofuda, et al., 1997) et MT-MMP-4 (Puente, et al., 1996). Une étude a également rapporté un cas de **sécrétion** de la MT-MMP-1 dans le milieu d'une culture de cellules MDA-MB-231 (lignée de cancer du sein) (§ 1.4.4.2). Par ailleurs, des ADNc codant la MT-MMP-3 et une protéine variante sans domaine transmembranaire ont été isolés à partir d'une banque de cellules SMC (cellules de muscle lisse de rat) (Shofuda, et al., 1997).

## 1.3.2. L'activation des pro-MMPs.

### 1.3.2.1. Le mécanisme d'activation de la plupart des MMPs.

Un modèle de « **commutateur cystéine** » a été proposé pour l'activation des pro-MMPs. Un résidu cystéine conservé dans le **pro-peptide** est le quatrième ligand de l'ion zinc (figure 2). L'activité enzymatique serait obtenue après la liaison d'une molécule d'eau à l'ion zinc, à la place de la cystéine. De nombreux agents chimiques modifiant la conformation du pro-peptide ou réagissant avec la cystéine peuvent supprimer le contact cystéine-zinc et activer la pro-enzyme. La pro-enzyme activée est ensuite auto-clivée selon un mécanisme intra ou inter-moléculaire qui élimine le pro-peptide (Springman, et al., 1990). Une étude récente confirme que le clivage correct du pro-peptide de la stromélysine-1 est nécessaire à l'obtention de l'activité complète. De plus, le clivage est également déterminant pour la spécificité de l'activité catalytique (Benbow, et al., 1996).

*In vivo*, l'activation procéderait par un premier clivage sans élimination de la cystéine (par exemple par la plasmine, § 1.3.2.3.1), suivi d'un auto-clivage conduisant à la forme active permanente.



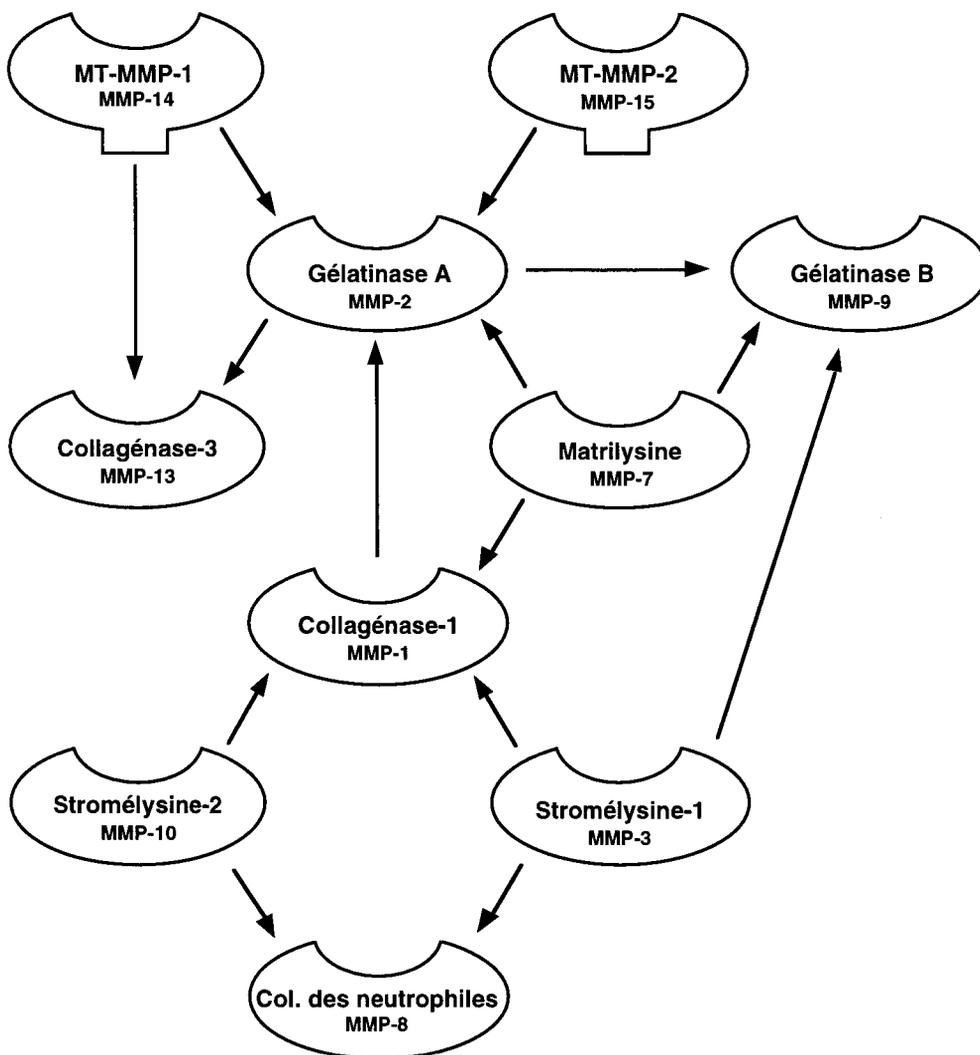
**Figure 2.** Un modèle d'activation pour la plupart des métalloprotéases de la matrice.

L'activation peut être induite par des agents supprimant l'interaction cystéine-zinc ou par un clivage protéolytique. Un auto-clivage conduit ensuite à la forme active permanente (Springman, et al., 1990, Woessner, 1991). GO : glutathion oxydé ; HClO : acide hypochloreux ; SDS : dodécyl sulphonate de sodium ; APMA : 4-aminophénylmercurique acétate.

### 1.3.2.2. Activation par des MMPs.

Des processus d'activation de MMPs par plusieurs enzymes spécifiques sont connus. En premier lieu, il est remarquable que plusieurs MMPs puissent activer une ou plusieurs autres MMPs (figure 3). Ces observations ont été réalisées *in vitro*, c'est-à-dire en culture cellulaire ou dans des systèmes biochimiques acellulaires (Cao, et al., 1995). La signification physiologique des réactions d'activation par des MMPs n'a le plus souvent pas été déterminé. L'activation de la collagénase-1 par la stromélysine-1 a été documentée en culture cellulaire (Ishibashi, et al., 1987, Brinckerhoff, et al., 1990, Unemori, et al., 1991). L'activation de la gélatinase A par la MT-MMP-1 semble particulièrement significative, en culture cellulaire et *in vivo* dans plusieurs contextes physiologiques (§ 1.4.4.2, § 1.5.3, § 1.6.3, § 1.7.2.4, § 1.7.3.3, § 1.7.5.2, § 1.8.2.1, § 1.9.2.2.2).

L'un des mécanismes d'activation de la gélatinase A procède en deux étapes. La pro-gélatinase A (72 kDa) est clivée par la MT-MMP-1 en une forme intermédiaire (64 kDa) qui est ensuite clivée en la forme mature (62 kDa). Cette deuxième étape est inhibée par des inhibiteurs de la plasmine et par des anticorps anti-uPA, ce qui révèle une implication du système du plasminogène (Baramova, et al., 1997).



**Figure 3.** Représentation schématique des activations de MMPs par d'autres MMPs.

La stromélysine-1 active par clivage la collagénase -1 en sa forme la plus active (Suzuki, et al., 1990). La stromélysine-1 active également la gélatinase B (Ogata, et al., 1992) et la collagénase des neutrophiles (Knauper, et al., 1996b), activée aussi par la stromélysine-2 (Knauper, et al., 1996a). La collagénase-1 est également activée par la stromélysine-2 et par la matrilysine (Woessner, 1991). La gélatinase A est activée par la collagénase-1 (Crabbe, et al., 1994a), par les MT-MMPs 1, 2 et 3 (Kinoshita, et al., 1996, Sato, et al., 1996b, Will, et al., 1996, Kolkenbrock, et al., 1997, Shofuda, et al., 1997) et par la matrilysine (Crabbe, et al., 1994b). La gélatinase B est activée aussi par la gélatinase A (Fridman, et al., 1995) et la matrilysine (Imai, et al., 1995). La collagénase-3 est activée par la MT-MMP-1 et la gélatinase A (Knauper, et al., 1996c).

### 1.3.2.3. Activation par le système du plasminogène.

#### 1.3.2.3.1. Activation par la plasmine.

Certaines MMPs sont activées par la plasmine, *in vitro* ou en culture cellulaire (Murphy, et al., 1992a) (figure 4). Des fibroblastes peuvent induire l'activation de pro-collagénase-1 et de pro-stromélysine-1 ajoutées dans le milieu de culture. L'activation de la **stromélysine-1** est inductible par la plasmine ou par l'uPA (protéase capable de convertir le plasminogène en plasmine). La pro-**collagénase-1** est clivée par la plasmine en une forme peu active. L'ajout d'une faible quantité de pro-stromélysine-1 conduit à l'obtention d'une collagénase-1 pleinement active, grâce à un clivage par la stromélysine-1 (Murphy, et al., 1992b). La coculture de fibroblastes exprimant la pro-collagénase-1 et la pro-stromélysine-1 et de kératinocytes exprimant l'uPA conduit à l'activation des deux MMPs (HE, et al., 1989).

La **gélatinase B**, mais pas la gélatinase A, peut être activée par la plasmine. L'activation de la gélatinase B peut également être obtenue par la stromélysine-1, sans synergie avec la plasmine (Murphy, et al., 1992a). Cette observation suggère que l'activation de la gélatinase B par la plasmine n'est pas médiée par la stromélysine-1.

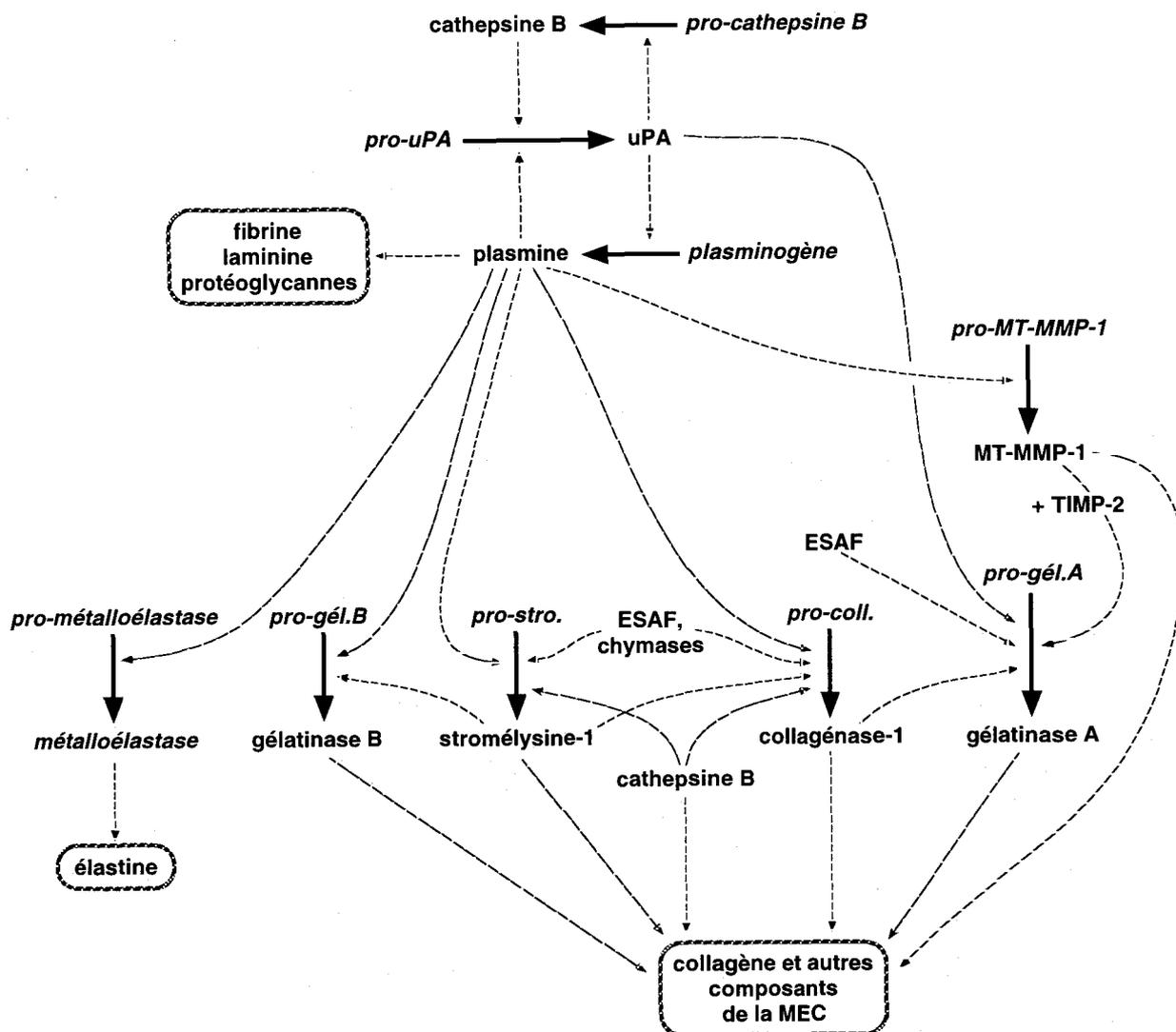
La plasmine est également un activateur de la **MT-MMP-1** (§ 1.3.2.7) et de la **métalloélastase** (MMP-12, élastase des macrophages) (Chapman et Stone, 1984).

#### 1.3.2.3.2. Activation par l'uPA.

La **gélatinase A** peut être directement activée par l'uPA. Dans une culture de fibroblastes et en présence d'uPA, la pro-gélatinase A sécrétée (72 kDa) est clivée en la forme active de 62 kDa. Ce clivage est inhibé par des anticorps dirigés contre l'uPA, mais pas par l'aprotinine, un inhibiteur de la plasmine. Au contraire, le tPA, un autre activateur du plasminogène, n'induit pas le clivage. Ces résultats montrent que l'activation de la gélatinase A induite par l'uPA n'est pas médiée par la plasmine (Keski, et al., 1992). De plus, nous avons vu que la plasmine seule n'active pas la gélatinase A (§ 1.3.2.3.1), bien qu'elle puisse être impliquée dans la deuxième étape d'une activation de la gélatinase A initiée par la MT-MMP-1 (§ 1.3.2.2).

#### 1.3.2.3.3. Conclusion

Des éléments spécifiques du système du plasminogène, l'uPA et la plasmine, contribuent par des mécanismes différents à la régulation de la composition de la MEC *via* l'activation de MMPs spécifiques.



**Figure 4.** L'activation en cascade de différentes familles de protéases conduit à la dégradation de la matrice extracellulaire.

Les pro-enzymes sont indiquées en italique, les enzymes activées en typographie standard, les réactions d'activation par des flèches continues et les catalyses enzymatiques (clivage de pro-peptide ou de composants de la MEC) en pointillé. La plasmine, l'uPA (§ 1.3.2.3) et les chymases de mastocytes (§ 1.3.2.5) sont des sérine protéases. La cathepsine B (§ 1.3.2.4) est une cystéine protéase. Les inhibiteurs des MMPs (TIMPs), des PAs (PAIs) et de la plasmine ( $\alpha 2$ -antiplasmine et  $\alpha 2$ -macroglobuline) apportent des contributions spécifiques complexes non représentées. Le schéma est adapté de deux figures publiées (Murphy, et al., 1992a, Mignatti et Rifkin, 1993), complétées par des résultats présentés dans ce mémoire et dans la publication (Dalet-Fumeron, et al., 1993).

#### 1.3.2.4. Activation par la cathepsine B.

La cathepsine B appartient à une famille de cystéine protéases lysosomales. Elle peut également être trouvée à l'extérieur des cellules. La cathepsine B induit l'activation de la **stromélysine-1** par clivage, dans une culture de fibroblastes (Murphy, et al., 1992b). Elle induit également l'activation de la **collagénase-1** (Eeckhout et Vaes, 1977).

La cathepsine B est par ailleurs capable de dégrader le **collagène IV**, la **fibronectine** et la **laminine** (Buck, et al., 1992, Guinec, et al., 1993). Ces deux propriétés, activation de MMPs et dégradation de composants de la MEC, trouvent leur signification physiologique *in vivo* dans certains cancers. L'expression et l'activité de la cathepsine B est corrélée à la progression tumorale dans plusieurs cancers (Keppler et Sloane, 1996). Dans le cancer du colon, la cathepsine B est un marqueur de différenciation qui distingue adénomes et adénocarcinomes (Satoh, et al., 1996). Elle est exprimée aux sites d'invasion tumorale (Emmert-Buck, et al., 1994). L'expression de la cathepsine B dans une tumeur est parfois un facteur pronostique corrélé à la formation de métastases, en particulier dans le cancer du sein (Budihna, et al., 1995), du col de l'utérus (Makarewicz et Drewa, 1996) ou de l'estomac (Herszenyi, et al., 1995).

#### *1.3.2.5. Activation par des protéases de mastocytes.*

Des protéases de mastocytes peuvent également activer des MMPs. Des mastocytes ont été observés dans des zones de dégradation des tissus conjonctifs, tout particulièrement à des sites d'invasion tumorale ou d'érosion du cartilage dans l'arthrite. Les tryptases et les chymases, les principales protéases de ces cellules, ont peu d'activité sur les composants de la MEC. Cependant, certaines chymases (sérine protéases) activent la **collagénase-1** et la **stromélysine-1**, mais pas les gélatinases. Des tryptases activent la stromélysine-1, mais pas la collagénase-1 (Lees, et al., 1994, Suzuki, et al., 1995). Les protéases produites par les mastocytes pourraient donc contribuer à la dégradation de la matrice *via* l'activation de MMPs.

#### *1.3.2.6. Activation par l'ESAF.*

L'ESAF (facteur d'angiogenèse stimulant les cellules endothéliales) active la **collagénase-1**, la **stromélysine-1** et la **gélatinase A**. L'ESAF est aussi la seule  physiologique connue capable de **réactiver un complexe TIMP / MMP**. Il réactive les complexes formés entre ces trois MMPs et TIMP-1 ou TIMP-2. Sa liaison à une MMP prévient la liaison de TIMP et l'inhibition de la MMP. L'ESAF pourrait jouer un rôle dans l'angiogenèse non-inflammatoire (McLaughlin et Weiss, 1996).

#### *1.3.2.7. Activation de la stromélysine-3 et des MT-MMPs.*

Contrairement à d'autres MMPs, l'activité de la stromélysine-3 et des MT-MMPs 1 et 2 n'est pas inductible par le SDS ou l'APMA. Le mécanisme d'auto-clivage ne concerne peut-être pas la stromélysine-3 et les MT-MMPs. Ces MMPs présentent un site **RxKR**, cible potentielle des enzymes apparentées aux subtilisines bactériennes (Seidah, et al., 1994). Ce site fait partie d'un domaine furine, appelé également IS-1 chez les MT-MMPs. Il est situé entre le pro-peptide et le domaine catalytique (figure 1, page 18).

A la différence des autres MMPs sécrétées, la **stromélysine-3** est sécrétée sous forme active. L'activation de la stromélysine-3 est régulée par une séquence conforme au consensus

**RxRxKR** reconnue par la **furine**, une convertase semblable aux subtilisines et associée à l'appareil de Golgi (Pei et Weiss, 1995). L'activation a lieu au cours du trafic intracellulaire. Dans les cellules MCF7 (lignée d'un carcinome du sein), l'activation de la stromélysine-3 est inhibée par l'expression stable d'un inhibiteur de la furine exogène (Santavicca, et al., 1996). La furine semble donc être l'activateur physiologique de la stromélysine-3 et serait une nouvelle cible thérapeutique potentielle.

La **furine** est capable d'activer *in vitro* la **MT-MMP-1** produite en bactérie (Sato, et al., 1996a). La mutation des résidus NVRKR en LVPRGS conduit à l'expression en culture cellulaire d'une pro-enzyme qui n'est plus activée. (Imai, et al., 1996). Un autre groupe a récemment démontré une activation de la MT-MMP-1 par la **plasmine**, également par clivage au niveau du site RRKR (Okumura, et al., 1997). Ces résultats montrent que le site furine est nécessaire à l'activation de la MT-MMP-1.

### 1.3.3. Les substrats des MMPs.

#### 1.3.3.1. Introduction : la matrice extracellulaire.

La matrice extracellulaire (MEC) est un réseau complexe et dynamique, assemblé à l'extérieur des cellules à partir des glycoprotéines et des protéoglycanes qu'elles sécrètent. La MEC constitue la matrice des tissus conjonctifs et les membranes basales. Elle influence des processus cellulaires comme l'adhérence, la migration, la prolifération, la différenciation et est impliquée dans la morphogenèse des tissus.

#### 1.3.3.2. La matrice des tissus conjonctifs.

Le composant principal des tissus conjonctifs est le **collagène**, dont au moins 19 types sont connus (van der Rest et Garrone, 1991, Brown et Timpl, 1995). Les collagènes de type I et III sont présents dans la plupart des tissus conjonctifs, alors que les types II et IX se trouvent dans le cartilage. Les collagènes I, II, III, V et XI forment des fibres. Les collagènes IX, XII et XIV sont des collagènes associés aux fibres avec triples hélices interrompues (FACITs). Ils relient les fibres de collagène aux autres composants de la matrice. Le collagène VII forme des fibres qui relient les fibres de collagène des tissus conjonctifs aux membranes basales. Le collagène VI pourrait relier les fibres de collagène aux cellules. Les tissus conjonctifs contiennent aussi les composants suivants : **fibronectine, élastine, protéoglycanes, ténascine, acide hyaluronique**. La **laminine** et l'**entactine** sont des composants de la membrane basale qui sont trouvés également dans certains tissus conjonctifs. L'**aggrecan** est un composant du cartilage.

Groupe	Numéro	Nom	Masse (kDa)	Substrats
<b>MMP minimale</b>	MMP-7	<b>Matrilysine</b> (PUMP-1, MMP utérine)	28 / 19	gélatines I, III, IV, V, protéoglycanes, fibronectine, laminine, collagène IV, élastine, entactine, ténascine
<b>MMPs à domaine hémopéxine</b>	MMP-1	<b>Collagénase-1</b> (Collagénase interstitielle)	52 / 42	collagènes I, II, III, VII, VIII, X, gélatines
	MMP-8	<b>Collagénase des neutrophiles</b>	85 / 65	collagènes I, II, III, aggrecan
	MMP-13	<b>Collagénase-3</b>	-	collagène I, II, III, IV, IX, X, XIV, gélatines, fibronectine, ténascine
	MMP-18	<b>Collagénase-4</b> (du xénope)	-	collagène I
	MMP-3	<b>Stromélysine-1</b> (Transine)	57 / 48	collagènes III, IV, V, IX, X, gélatines I, III, IV, V, protéoglycanes, fibronectine, élastine (faiblement), laminine
	MMP-10	<b>Stromélysine-2</b>	53 / 47	collagènes III, IV, V, IX, X, gélatines I, III, IV, V, protéoglycanes, fibronectine
	MMP-11	<b>Stromélysine-3</b>	56 / 47	laminine, fibronectine (faiblement)
	MMP-12	<b>Métalloélastase</b> (Elastase des macrophages)	54 / 22	élastine, fibronectine, fibrinogène
	MMP-18	<b>MMP-18</b>	-	-
	MMP-19	<b>MMP-19</b>	-	-
<b>MMPs à domaine fibronectine (et hémopéxine)</b>	MMP-2	<b>Gélatinase A</b> (Gélatinase de 72 kDa, Collagénase de type IV de 72 kDa)	72 / 66	collagènes I, IV, V, VII, X, gélatine I, fibronectine, élastine
	MMP-9	<b>Gélatinase B</b> (Gélatinase de 92 kDa, Collagénase de type IV de 92 kDa)	92 / 84	collagènes IV, V, gélatines I, V, élastine
<b>MMPs membranaires</b>	MMP-14	<b>MT-MMP-1</b>	63	collagènes I, II, III, gélatines, fibronectine, laminine, vitronectine, protéoglycanes
	MMP-15	<b>MT-MMP-2</b>	-	-
	MMP-16	<b>MT-MMP-3</b>	-	gélatines.
	MMP-17	<b>MT-MMP-4</b>	-	-

**Table 1.** Nomenclature et substrats des métalloprotéases de la matrice.

Les substrats connus de chaque enzyme sont indiqués, ainsi que le poids moléculaire des formes pro-enzyme / enzyme activée (Woessner, 1991, Baramova et Foidart, 1995, Coussens et Werb, 1996, Powell et Matrisian, 1996). Les tirets représentent des informations non renseignées. Les MMPs sont classées en fonction de leurs domaines fonctionnels.

### ***1.3.3.3. La membrane basale.***

Les membranes basales présentent une structure en feuillet. Elles isolent les cellules épithéliales ou endothéliales du tissu conjonctif sous-jacent. Les composants principaux des membranes basales sont les **collagènes IV et V**, la **laminine**, l'**pentactine** et des **protéoglycanes**. Ces composants s'organisent en réseau par des interactions non-covalentes.

Les membranes basales forment une barrière contre le déplacement des cellules et compartimentent les tissus et les organes. Dans des conditions physiologiques, la membrane basale peut être pénétrée spécifiquement par des leucocytes. Au contraire, le franchissement de la membrane basale par des cellules néoplasiques est une étape clé de la progression tumorale (figure 7A, page 40).

### ***1.3.3.4. Activité des MMPs sur la matrice extracellulaire.***

La table 1 présente quels composants de la MEC sont les substrats des MMPs. Les MMPs activées par clivage par d'autres MMPs (figure 3, page 21) et les autres substrats des MMPs (§ 1.3.3.5) ne sont pas indiqués ici.

Parmi les MMPs, la **stromélysine-1** a le plus large éventail de substrats : fibronectine, laminine, protéoglycanes de la matrice et de nombreux types de collagène, dont le collagène IV de la membrane basale. Au contraire, les **collagénases 1 et 3**, la **collagénase des neutrophiles** et la **MT-MMP-1** (et peut-être les autres MT-MMPs) sont les seules enzymes connues capable de cliver les collagènes natifs de types I, II et III et d'en "dérouler" les fibres. Après une première dégradation, le **collagène** se présente sous une forme dénaturée, appelée **gélatine**, qui peut être la cible d'autres enzymes. La **stromélysine-3** est inactive sur la plupart des composants de la MEC et dégrade faiblement la laminine et la fibronectine (MacDougall et Matrisian, 1995, Noel, et al., 1995).

### ***1.3.3.5. Les autres substrats des MMPs.***

#### **1.3.3.5.1. Le précurseur du TNF- $\alpha$ .**

Le précurseur du TNF- $\alpha$  est également un substrat de certaines MMPs. Le TNF- $\alpha$  est une cytokine pro-inflammatoire et régulatrice du système immunitaire. Elle est impliquée dans l'arthrite et dans certains cancers. Le TNF- $\alpha$  est exprimé sous forme d'un précurseur membranaire (233 acides aminés) qui conduit, après clivage, à la cytokine mature (157 acides aminés). Des inhibiteurs synthétiques des MMPs inhibent la production de TNF- $\alpha$  actif dans une culture de leucocytes (Gearing, et al., 1994). La **collagénase-1**, la **stromélysine-1**, la **matrilysine** et les **gélatinases A et B** purifiées peuvent cliver le pro-TNF- $\alpha$  (Gearing, et al., 1995).

#### 1.3.3.5.2. Le pro-uPA et l'uPA.

La **matrilysine** est également capable de cliver l'uPA et le pro-uPA. Le clivage sépare le domaine sérine protéase du domaine lié à la membrane cellulaire, ce dernier exerçant une activité de facteur de croissance sur certains types cellulaires. La matrilysine pourrait donc être importante dans la régulation de l'activité de l'uPA (Marcotte, et al., 1992).

#### 1.3.3.5.3. L' $\alpha$ 1-antiprotéase et l' $\alpha$ 2-macroglobuline.

La **matrilysine** contrôle également indirectement l'activité de l'**élastase des leucocytes**, une sérine protéase, en clivant son principal inhibiteur physiologique, l' $\alpha$ 1-antiprotéase ( $\alpha$ 1-PI). Elle est plus efficace que les autres MMPs testées pour cette propriété d'inactivation (sans considération pour le site particulier de la coupure) : 30 fois plus efficace que la gélatinase B, 70 fois plus que la collagénase-1 et 180 fois plus que la stromélysine-1 (Sires, et al., 1994). La **stromélysine-3** peut aussi inactiver l' $\alpha$ 1-PI (Pei, et al., 1994).

La **MT-MMP-1** dégrade l' $\alpha$ 1-PI, ainsi que l' $\alpha$ 2-macroglobuline qui est un inhibiteur de la plasmine (Ohuchi, et al., 1997).

### 1.4. Les tissu-inhibiteurs des métalloprotéases (TIMPs).

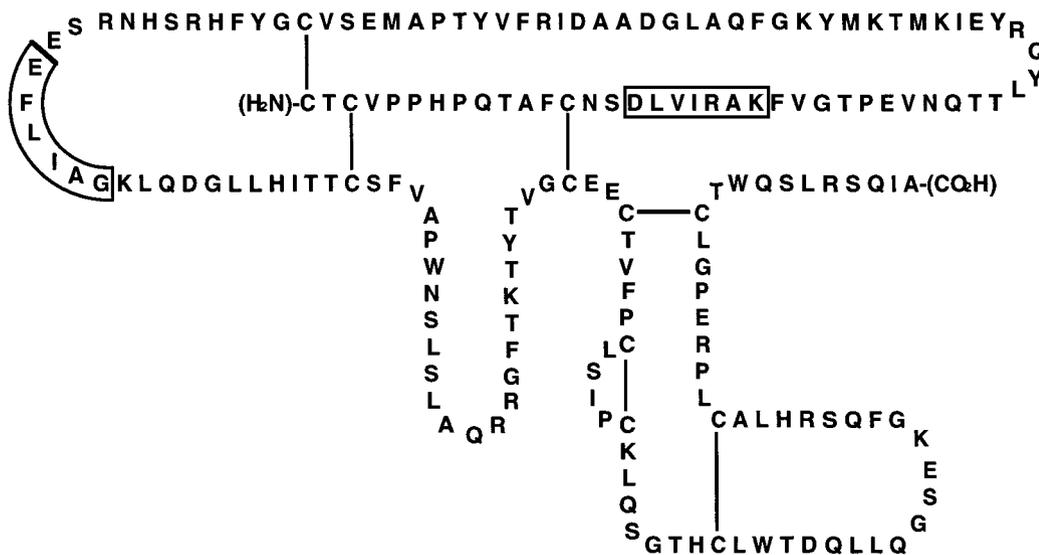
#### 1.4.1. La famille TIMP.

L'activité des MMPs sur les composants de la MEC dépend d'un **équilibre** entre les MMPs et leurs inhibiteurs (Matrisian, 1990, Woessner, 1991, Denhardt, et al., 1993). Les tissu-inhibiteurs des métalloprotéases (TIMPs) forment une famille de quatre membres. La région la plus conservée des TIMPs consiste en 22 résidus N-terminaux (comptés après l'élimination du peptide signal), dont 16 sont identiques dans 8 protéines TIMPs 1, 2 et 3 d'espèces animales différentes (Denhardt, et al., 1993).

**TIMP-1** est une protéine glycosylée de 28.5 kDa avec un squelette protéique de 21 kDa. Douze résidus cystéine conservés forment six ponts disulfures et organisent la molécule en deux domaines, contenant chacun trois boucles internes. Des références sur la découverte et la caractérisation de TIMP-1 sont données plus loin (§ 1.4.6). La figure 5 représente la structure primaire de TIMP-1.

Chez l'homme, **TIMP-2** (21 kDa) présente 38% d'identité de séquence avec TIMP-1 (Stetler-Stevenson, et al., 1989, Boone, et al., 1990). La masse apparente de TIMP-2 *in vivo* reste de 20 kDa. Le **TIMP-3** humain (24-25 kDa) a été isolé comme l'homologue de TIMP-3/ChIMP-3 chez le poulet (Uria, et al., 1994, Wick, et al., 1994, Kishnani, et al., 1995). TIMP-3 présente 30 et 38% d'identité de séquence avec TIMP-1 et TIMP-2 respectivement. **TIMP-4** (224 résidus) a été isolé à partir d'une lignée de cellule de cancer du sein. Il présente 37% d'identité avec TIMP-1 et 51% avec les TIMPs 2 et 3. L'expression normale de TIMP-4 chez l'adulte n'a été détectée que dans le cœur (Greene, et al., 1996).

D'autres inhibiteurs de métalloprotéases ont été décrits, mais leurs séquences ne sont pas connues : **IMP-a** (29 kDa), **IMP-b** (30 kDa) (Kishnani, et al., 1995), **IMP-1** (22-26 kDa), **IMP-2** (19-21 kDa) et **IMP-3** (16.5-18 kDa) (Apodaca, et al., 1990, Banda, et al., 1992). Nous notons que l'examen des masses moléculaires apparentes ne permet pas d'exclure des identités IMP-1 / TIMP-3 ou IMP-2 / TIMP-2.



**Figure 5.** Structure primaire de TIMP-1.

La structure primaire de la protéine TIMP-1 humaine est indiquée, avec ses six ponts disulfures (Carmichael, et al., 1986). Les résidus encadrés sont identiques dans TIMP-1 chez l'homme, la souris, le lapin et dans TIMP-2 chez l'homme et le bœuf (Woessner, 1991).

#### 1.4.2. L'inhibition des MMPs par les TIMPs.

Aucun TIMP ne semble très sélectif dans l'inhibition des différentes MMPs. La collagénase-1, la collagénase des neutrophiles, les gélatinases A et B et les stromélysines 1, 2 et 3 sont inhibées par les TIMPs 1, 2 et 3 (Denhardt, et al., 1993). TIMP-1 forme un complexe avec la collagénase-1 et la stromélysine-1 selon une stœchiométrie équimolaire (Cawston, 1986).

Les TIMPs inhibent l'activité des MMPs en bloquant leur site catalytique. L'activité inhibitrice des TIMPs 1 et 2 est portée par leur **région N-terminale**. La région Cys<sup>3</sup>-Cys<sup>13</sup> est critique pour l'activité de TIMP et tout particulièrement les résidus **His<sup>7</sup>** et **Gln<sup>9</sup>** que l'on suppose impliqués dans une interaction avec l'ion zinc des MMPs (O'Shea, et al., 1992).

L'inhibition de la **collagénase-1** par TIMP-1 résulte de la formation, en deux étapes, d'un complexe stable. Un complexe inactif peu stable, impliquant la région C-terminale de la collagénase-1, est rapidement formé. Dans un deuxième temps, un complexe ayant une

constante de dissociation 80 fois plus faible se forme lentement à partir du premier complexe. Si la région C-terminale de la collagénase-1 est supprimée, un complexe se forme en une seule étape ; il est 25 fois moins stable que le complexe formé avec la collagénase-1 entière (Taylor, et al., 1996).

D'une manière semblable, la délétion de la région C-terminale de la **collagénase-3** diminue d'un facteur 33 sa liaison à TIMP-1, à TIMP-3 et à une chimère TIMP-2 N-ter. / TIMP-1 C-ter. mais n'affecte que marginalement sa liaison à TIMP-2 ou à une chimère TIMP-1 N-ter. / TIMP-2 C-ter. (Knauper, et al., 1997). Ces observations suggèrent une interaction stabilisante de la région C-terminale de la collagénase-3 avec la **région C-terminale** de TIMP-1, mais pas avec TIMP-2.

L'activité protéolytique extracellulaire dépend d'un équilibre dont le contrôle nécessite à la fois la régulation des gènes codant les MMPs et des gènes codant les TIMPs. Une augmentation de l'expression des MMPs (endogènes ou exogènes) peut élever significativement l'activité protéolytique extracellulaire, à moins que les MMPs ne soient déjà en excès par rapport aux TIMPs. Inversement, une augmentation du niveau des TIMPs peut réduire l'activité protéolytique extracellulaire, à moins que les TIMPs ne soient déjà en excès (figure 6).



**Figure 6.** L'équilibre MMPs / TIMPs conditionne l'effet de l'apport d'une MMP ou d'un TIMP, sur l'activité protéolytique extracellulaire.

### 1.4.3. Régulation de TIMP-2 par la plasmine.

La plasmine est capable de dégrader TIMP-2. Cette activité constitue une nouvelle contribution du système du plasminogène à la régulation de la MEC *via* le système MMPs / TIMPs. *In vitro*, la plasmine clive TIMP-2 en générant un fragment de 14 kDa ayant encore une activité anti-métalloprotéase. Ce fragment subit une dégradation ultérieure qui supprime l'activité anti-MMP (DeClerck et Laug, 1996).

#### 1.4.4. Propriétés particulières des gélatinases et des TIMPs 1 et 2.

##### 1.4.4.1. Le complexe TIMP-2 / gélatinase A.

TIMP-1 est capable de former un complexe spécifique avec la pro-gélatinase B et TIMP-2 avec la pro-gélatinase A (Kleiner, et al., 1993). Un fragment actif de 43 kDa de la gélatinase A, ne contenant ni le pro-peptide ni une région C-terminale, est obtenu après une auto-activation. Ce fragment lie TIMP-2. De plus, un peptide de 29 kDa, correspondant à une région C-terminale de la pro-gélatinase A, lie également TIMP-2, avec une meilleure affinité. La liaison de TIMP-2 au fragment de 43 kDa, mais pas à la gélatinase A complète, est inhibée par la 1, 10-phénanthroline. Ce produit est un chélateur des ions  $Zn^{2+}$  qui inhibe les MMPs. Il inhibe la liaison de TIMP-1 à la pro-gélatinase A, au niveau de son site actif. Ces résultats mettent en évidence un domaine de liaison à TIMP-2 dans la région C-terminale de la gélatinase A, distinct de son site actif. Ce domaine n'est pas reconnu par TIMP-1 (Howard et Banda, 1991).

Le complexe TIMP-2 / pro-gélatinase A peut inhiber la gélatinase B en formant avec elle un complexe ternaire, ce qui indique que le domaine N-terminal de TIMP-2 reste accessible (Kolkenbrock, et al., 1991). Une étude récente a montré que TIMP-2 et TIMP-4, mais pas TIMP-1, lient la gélatinase A et la pro-gélatinase A au niveau du **domaine hémopéxine C-terminal**, mais pas au niveau du domaine central de type fibronectine (Bigg, et al., 1997).

L'homologie entre les régions C-terminales des TIMPs 1 et 2 est réduite. Un groupe a proposé que la **région C-terminale de TIMP-2** contiendrait le site de liaison spécifique à la gélatinase A (Kleiner et Stetler-Stevenson, 1993).

Le complexe TIMP-2 / pro-gélatinase A peut être activé transitoirement par l'APMA. En présence d'APMA, le complexe se réorganise et la pro-gélatinase A activée lie la partie N-terminale de TIMP-2. Elle ne présente pas d'activité gélatinolytique. Une faible quantité de gélatinase A pleinement active induit un clivage de la pro-gélatinase A au sein du complexe avec TIMP-2. Le complexe obtenu est cependant sans activité gélatinolytique. En présence d'APMA, la stromélysine-1, mais pas la collagénase-1, clive également la pro-gélatinase A liée à TIMP-2. La stromélysine-1 permet de plus le blocage de TIMP-2 nécessaire à la manifestation de l'activité de la gélatinase A (Itoh, et al., 1995).

##### 1.4.4.2. Les complexes MT-MMP / TIMP-2 / gélatinase A.

Nous avons indiqué que la gélatinase A est activée par les MT-MMPs 1 et 2 (§ 1.3.2.2). Nous précisons ici que l'activation de la gélatinase A peut être induite par la formation préalable d'un complexe ternaire MT-MMP-1 / TIMP-2 / pro-gélatinase A, localisé au niveau de la membrane cellulaire (Strongin, et al., 1995). Des études cinétiques en présence d'une quantité variable de TIMP-2 montrent que la pro-gélatinase A ne se lie pas à la membrane cellulaire indépendamment de TIMP-2. Une séquence partielle du récepteur membranaire indique une identité avec la MT-MMP-1.

D'une manière inattendue, la MT-MMP-1 est sécrétée dans une culture de cellules MDA-MB-231 (lignée de cancer du sein) et a été purifiée sous forme d'un complexe avec TIMP-2. Ce complexe présente une activité gélatinolytique et est capable de former un complexe ternaire MT-MMP-1 / TIMP-2 / pro-gélatinase A (Imai, et al., 1996). Un domaine catalytique de MT-MMP-1 recombinant est capable d'activer la pro-gélatinase A et le complexe TIMP-2 / pro-gélatinase A (Lichte, et al., 1996, Pei et Weiss, 1996, Will, et al., 1996). Ce processus est inhibé par les TIMPs 2 et 3, mais pas par TIMP-1. Les TIMPs 2 et 3 lient plus rapidement le domaine catalytique de la MT-MMP-1 que celui de la gélatinase A (Will, et al., 1996).

La possibilité d'une activation de la gélatinase A *in vivo* par une isoforme MT-MMP-1 sans domaine trans-membranaire reste hypothétique. Une étude antérieure a en effet rapporté que l'activation de la gélatinase A par la MT-MMP-1 nécessite le domaine trans-membranaire de la MT-MMP-1. Un domaine transmembranaire hétérologue convient également (Cao, et al., 1995).

La pro-gélatinase A et le complexe TIMP-2 / pro-gélatinase A sont également activés par la MT-MMP-2. Le complexe MT-MMP-2 / TIMP-2 / pro-gélatinase A est inactif et la pro-gélatinase A est activée par la MT-MMP-2 en excès molaire par rapport à TIMP-2. Après son activation, la gélatinase A reste liée à la membrane dans un complexe MT-MMP-2 / TIMP-2 / gélatinase A (Kolkenbrock, et al., 1997).

#### ***1.4.4.3. L'inhibiteur long des métalloprotéases.***

Un inhibiteur long des métalloprotéases (LIMP) de 76 kDa a été isolé par filtration sur gel d'un milieu de culture conditionné par des fibroblastes fœtaux humains. LIMP forme un complexe avec la collagénase-1, la stromélysine-1 et la gélatinase A. Il n'est pas reconnu par des anticorps polyclonaux dirigés contre TIMP-1 (Cawston, et al., 1990). LIMP est en fait un complexe TIMP-2 / gélatinase A (Kolkenbrock, et al., 1991, Curry, et al., 1992).

#### ***1.4.4.4. Deux états pour la gélatinase A.***

La liaison de TIMP-2 avec le domaine C-terminal de la gélatinase A inhibe la faible auto-activation de la pro-gélatinase A et la rapide auto-dégradation de la protéase activée. Le complexe TIMP-2 / gélatinase A présente une activité sur les substrats de la MEC qui représente 5 à 10% de l'activité de la gélatinase A (Howard, et al., 1991).

La gélatinase A se présente donc sous deux phénotypes physiologiques : une enzyme libre, très active et rapidement dégradée, et une enzyme liée à TIMP-2, faiblement active mais résistante à l'auto-dégradation.

#### ***1.4.4.5. Le complexe TIMP-1 / gélatinase B.***

Les données disponibles sur le complexe TIMP-2 / gélatinase A ne sont pas *a priori* transposables au cas du complexe TIMP-1 / gélatinase B. Il semble qu'il n'ait pas été

déterminé si l'association de TIMP-1 à la gélatinase B peut la stabiliser (Howard et Banda, 1991). Nous pouvons noter une similarité entre les TIMPs 1 et 2 : la délétion du domaine C-terminal de la gélatinase A réduit son inhibition par TIMP-1 ou TIMP-2 d'un facteur 100 (Willenbrock, et al., 1993). TIMP-1 pourrait interagir avec un domaine de la gélatinase B homologue du domaine de la gélatinase A interagissant avec TIMP-2.

Le traitement du complexe TIMP-1 / pro-gélatinase B par l'APMA suffit à induire le clivage protéolytique qui génère les formes actives de la gélatinase B. Cependant, l'activité gélatinolytique n'est pas observée, en raison de la liaison de TIMP-1 au site actif de la gélatinase B (Ogata, et al., 1995). La collagénase-1 peut induire l'activation de la pro-gélatinase B libre, mais pas l'activation du complexe TIMP-1 / pro-gélatinase B. Celui-ci forme un complexe ternaire avec la collagénase-1 et l'inhibe (Goldberg, et al., 1992). Un résultat semblable est obtenu vis-à-vis de la stromélysine-1. Elle ne peut activer le complexe TIMP-1 / pro-gélatinase B que si elle est en excès molaire, de manière à saturer TIMP-1 (Itoh et Nagase, 1995).

#### **1.4.4.6. Conclusion.**

Ces travaux montrent que les TIMPs 1 et 2 régulent l'activation des pro-gélatinases. Selon les partenaires présents, ils peuvent favoriser ou inhiber leur activation, ainsi que la manifestation effective de leur activité gélatinolytique.

#### **1.4.5. Les TIMPs et la prolifération cellulaire.**

##### **1.4.5.1. TIMP-1 stimule la croissance cellulaire.**

TIMP-1 stimule la prolifération de kératinocytes humains. Cette propriété a d'abord été mise en évidence sur un modèle de peau *in vitro* reconstituant un derme et un épiderme (Bertaux, et al., 1990). La croissance des kératinocytes n'est pas affectée quand on les cultive sur les composants extracellulaires déposés par des cellules dont la croissance a été induite par un TIMP-1 exogène. Cette observation montre que la croissance induite par TIMP-1 n'est pas la conséquence d'une modification de la composition ou de la densité de la MEC et qu'elle serait donc indépendante de l'activité anti-MMP de TIMP-1 (Bertaux, et al., 1991).

Un autre groupe rapporte que TIMP-1 est un facteur de croissance potentiel pour plusieurs types cellulaires, dont la lignée MCF7 de carcinome du sein. La déplétion en TIMP-1 du sérum utilisé dans les cultures réduit significativement ou totalement l'effet stimulateur du sérum. L'effet stimulateur est restauré par un TIMP-1 exogène. Au contraire, l'ajout d'un anticorps spécifique dirigé contre TIMP-1 conduit à une suppression totale de la stimulation par le sérum. Dans une culture sans sérum, TIMP-1, mais pas TIMP-2, stimule la prolifération de fibroblastes humains et d'une lignée cellulaire de lymphome de Burkitt. TIMP-1 serait donc un nouveau facteur de croissance du sérum (Hayakawa, et al., 1992b).

#### **1.4.5.2. La prolifération des cellules endothéliales.**

Des observations contrastées ont été rapportées concernant l'influence des TIMPs sur la prolifération des cellules endothéliales. Un groupe rapporte que TIMP-1 induit la prolifération de cellules endothéliales bovines (Hayakawa, et al., 1992b). Un autre groupe rapporte que TIMP-2 inhibe la prolifération de cellules endothéliales induite par le bFGF, mais n'affecte pas leur adhérence ou leur migration. L'inhibition n'est pas observée avec TIMP-1 ou avec un inhibiteur synthétique des MMPs. Les auteurs ne mentionnent pas non plus de stimulation de la prolifération par TIMP-1 (Murphy, et al., 1993).

#### **1.4.6. L'activité potentiatrice érythroïde des TIMPs 1 et 2.**

L'existence d'une protéine inhibitrice associée à des MMPs a été rapportée (Russell, et al., 1981) plusieurs années avant le clonage du gène TIMP-1 (Docherty, et al., 1985). Le clonage de TIMP-1 a révélé une identité avec le gène codant l'activité potentiatrice érythroïde (EPA), c'est-à-dire une activité qui stimule la croissance des progéniteurs érythroïdes (Gasson, et al., 1985). L'utilisation expérimentale d'une protéine TIMP-1 modifiée a permis de montrer que la stimulation de la croissance des progéniteurs érythroïdes est indépendante de l'activité anti-MMP de TIMP-1 (Chesler, et al., 1995). TIMP-1 est également nécessaire à la différenciation d'une lignée cellulaire d'érythroleucémie induite par l'érythropoïétine (Murate, et al., 1993). TIMP-2 présente également une activité EPA (Stetler-Stevenson, et al., 1992).

#### **1.4.7. Conclusion.**

Des mécanismes biochimiques spécifiques, distincts de la propriété d'inhibition des MMPs, ont été mis en évidence chez les TIMPs 1 et 2. Il est remarquable que l'interaction de la pro-gélatinase A avec TIMP-2, un inhibiteur de MMPs, est impliqué dans son activation par les MT-MMPs 1 et 2. Dans le complexe TIMP-2 / gélatinase A, la protéase est inhibée partiellement mais elle est stabilisée contre la dégradation. *In vitro*, TIMP-1 exerce une propriété de facteur de croissance sur plusieurs types cellulaires. Ces observations pourraient relativiser dans certains cas l'activité anti-tumorale que l'on est tenté de prêter aux TIMPs (§ 1.7.3).

### **1.5. Expression des MMPs et des TIMPs dans le développement.**

Les propriétés des métalloprotéases suggèrent qu'elles pourraient jouer un rôle dans le développement, en particulier dans l'implantation du blastocyste (processus invasif) ou dans les remodelages de la MEC dans l'embryon.

#### **1.5.1. L'implantation du blastocyste.**

L'implantation d'un blastocyste nécessite son association avec la surface de l'utérus, suivie du mouvement du blastocyste à travers la couche épithéliale vers le tissu conjonctif de l'endomètre. Lors de l'implantation, la **collagénase-1**, les **stromélysines 1, 2 et 3**, les

**gélatinases A et B**, les **TIMPs 1 et 2** sont exprimés par les cellules de l'embryon. Parmi les protéases, la gélatinase B est prédominante. **TIMP-3** est exprimé dans les cellules maternelles immédiatement adjacentes aux cellules embryonnaires exprimant la gélatinase B. Ces observations suggèrent que la gélatinase B est un médiateur important de l'invasion cellulaire lors de l'implantation de l'embryon et que TIMP-3 est un régulateur maternel qui limite l'invasion cellulaire au niveau du site d'implantation (Werb, et al., 1992, Shimonovitz, et al., 1994, Lefebvre, et al., 1995, Reponen, et al., 1995, Alexander, et al., 1996, Leco, et al., 1996).

### 1.5.2. La différenciation de l'endoderme.

Dans le développement du blastocyste, une première différenciation conduit à la distinction du trophoctoderme et de la masse des cellules intérieures (ICM). Peu après, l'endoderme se différencie à partir de l'ICM. Les progéniteurs de l'endoderme migrent pour former l'endoderme extra-embryonnaire. *In vitro*, cette différenciation s'accompagne de l'induction d'activités **gélatinase, collagénase et PA**, ce qui suggère la mise en place d'une cascade protéolytique complète.

D'une manière surprenante, l'application d'un **TIMP-1** exogène sur des blastocystes en culture augmente très nettement le nombre des cellules de l'endoderme et leur distance de migration. L'origine de ce phénomène n'est pas identifiée. Des composants de la MEC, en particulier la fibronectine, facilitent les mouvements morphogénétiques dans l'embryogenèse en favorisant l'adhérence des cellules sur la MEC. En principe, l'activité anti-MMP de TIMP pourrait protéger la fibronectine et apporter une contribution favorable à la migration. Néanmoins, les cellules en migration produisent des protéases (Werb, et al., 1992).

### 1.5.3. La formation des os.

Les sites d'expression de la collagénase-1 ont été étudiés par hybridation *in situ* et par immunohistochimie, entre les jours E6.5 et E17 de l'embryogenèse de la souris (Gack, et al., 1995, Mattot, et al., 1995). La **collagénase-1** est exclusivement détectée au début de la formation des os. L'expression est localisée au niveau des chondrocytes (cellules qui produisent la MEC du cartilage) hypertrophiés dans des zones où le cartilage subit un remodelage intense, dans les ostéoblastes (cellules qui produisent l'os) et dans les cellules endothéliales qui ont migré dans les zones où l'os se forme. L'expression de **TIMP-2** précède celle de la collagénase-1. Ces observations suggèrent que la collagénase-1 joue un rôle spécifique dans la formation des os et qu'elle est susceptible d'être régulée par TIMP-2.

Une autre étude par hybridation *in situ* et immunohistochimie chez la souris montre que la **MT-MMP-1** est exprimée dans les cellules des tissus en ossification. Ces cellules expriment également la **gélatinase A** et **TIMP-2**. Le taux d'activation de la gélatinase A, quantifié par zymographie, est proportionnel à l'expression de la MT-MMP-1. Ces observations suggèrent

un rôle fonctionnel de l'activation de la gélatinase A par la MT-MMP-1 dans la formation des os (Kinoh, et al., 1996).

La **stromélysine-3** est également détectée pendant la morphogenèse des os, dans les cellules invasives (Lefebvre, et al., 1995).

#### **1.5.4. La morphogenèse de branchement.**

*In vivo*, les **gélatinases A et B** sont détectées par immunohistochimie dans le mésenchyme des **reins** d'un embryon de souris au jour E11. L'activité des gélatinases A ou B peut être spécifiquement inhibée dans le milieu de culture d'un rein embryonnaire par des anticorps spécifiques. L'inhibition de la gélatinase A n'a pas d'effet sur la morphogenèse *in vitro*. Au contraire, l'inhibition de la gélatinase B supprime la morphogenèse de branchement et les divisions cellulaires du bourgeon de l'uretère. Cet effet est également observé après un apport de TIMP-1, inhibiteur naturel de la gélatinase B. Cette étude montre que la gélatinase B est nécessaire à la morphogenèse de branchement du rein (Lelongt, et al., 1997).

Des observations semblables ont été réalisées dans la morphogenèse de la **glande mammaire** chez la souris. Les **stromélysines 1 et 3** et la **gélatinase A** sont exprimées pendant la morphogenèse de branchement des conduits. Les transcrits de la stromélysine-1 sont exprimés spécifiquement au niveau des fibroblastes du stroma positionnés le long des conduits en élongation (Witty, et al., 1995).

#### **1.5.5. La morphogenèse des glandes salivaires.**

Une ou plusieurs MMPs semblent également impliquées dans la morphogenèse des glandes salivaires chez la souris. Des glandes sub-mandibulaires rudimentaires d'un embryon au jour E12 sont cultivées *in vitro*. Elles forment en moyenne 2 cryptes en 24 h, où s'accumule le collagène III. Elles en forment 5 en présence de TIMP bovin et n'en forment aucune en présence de collagénase-1. Ces résultats suggèrent que une ou des MMPs pourraient réguler la formation des cryptes des glandes salivaires en contrôlant la structure des fibres de collagène de la MEC (Hayakawa, et al., 1992a).

### **1.6. Les MMPs et TIMP-1 dans la réparation des blessures.**

#### **1.6.1. Introduction.**

La réparation d'une blessure consiste à restaurer une couche épithéliale et un tissu conjonctif vascularisé présentant une architecture extracellulaire appropriée. Ce processus régénérateur nécessite le remodelage de la MEC par les MMPs et un nouveau dépôt de composants de la MEC. Les études réalisées ont souvent pour objet le dépôt, l'accumulation et la solidité des composants de la MEC, mais plus rarement la cinétique de leur expression et la régulation des MMPs. L'étude de ces dernières est motivée par le besoin de comprendre les

mécanismes impliqués dans les blessures chroniques qui présentent une activité MMP dérégulée (Moses, et al., 1996).

### 1.6.2. Localisation histologique de la collagénase-1 et de TIMP-1.

Chez l'homme, la réparation de brûlures de l'épiderme et du derme s'accompagne de l'expression de la **collagénase-1** et de **TIMP-1**. Leur expression, évaluée par immunohistochimie, présente des distributions semblables. Dans l'épiderme, l'expression n'est pas détectée dans les deux premiers jours et elle diminue à partir de trois semaines. La collagénase-1 et TIMP-1 sont présents au bord de la blessure au niveau des kératinocytes non stratifiés en migration. Le marquage est plus intense au niveau du compartiment adjacent constitué de kératinocytes en prolifération. Des kératinocytes de glandes ou de conduits sudorifères et de follicules ayant survécu à la brûlure migrent jusqu'à la surface de la blessure et participent aussi à la re-épithélialisation. La collagénase-1 et TIMP-1 sont exprimés à la pointe des structures formées par ces cellules, avec toutefois des variantes (Stricklin, et al., 1993).

Ces résultats sont à rapprocher d'études en culture cellulaire qui indiquent que l'expression de la collagénase-1 et de TIMP-1 par des kératinocytes est inhibée par la laminine ou un matrigel (extraits de membrane basale) et est stimulée par les collagènes I et IV (Petersen, et al., 1990, Saarialho-Kere, et al., 1993).

Dans le derme, les distributions de la collagénase-1 et de TIMP-1 sont également similaires. Aux jours 2 à 4, l'expression est très forte dans des zones très localisées : bord de la brûlure dans les cas superficiels, autour des vaisseaux (vraisemblablement cellules endothéliales et macrophages) dans le cas de brûlures profondes. Aux jours 5 à 15, des cellules plus nombreuses sont marquées, selon une distribution dispersée dans toute la zone touchée par une brûlure profonde. Cette dispersion suggère l'implication de fibroblastes. L'éventualité d'une co-localisation collagénase-1 / TIMP-1 au niveau cellulaire n'a pas pu être déterminée (Stricklin, et al., 1993).

Ces résultats diffèrent des observations effectuées par hybridation *in situ* dans des **blessures chroniques** comme les granulomes pyogéniques. Dans cette pathologie, les transcrits collagénase-1 ne sont détectés que dans l'épithélium au bord des lésions et TIMP-1 uniquement dans les cellules stromales et autour des vaisseaux. Il est possible de spéculer que cette distribution est anormale et qu'elle contribue à l'altération des mécanismes de remodelage et de reconstruction des tissus (Saarialho-Kere, et al., 1992).

### 1.6.3. Expression comparative des MMPs.

Une étude comparative entre des blessures aiguës en réparation et des ulcères chroniques de la peau a révélé une expression de la **collagénase-1**, des **stromélysines 1 et 2** et de l'**uPA** dans les deux cas. **TIMP-1** est exprimé à la bordure épithéliale des blessures aiguës mais n'a jamais été détecté dans les blessures chroniques (Vaalamo, et al., 1996).

D'autres études se sont intéressées aux **gélatinases A et B** dans la réparation des blessures. Une étude utilise l'hybridation *in situ* sur un modèle de blessure de la muqueuse orale chez l'homme. La gélatinase A est détectée au niveau des fibroblastes et des cellules endothéliales, pendant toute la durée de la réparation. La gélatinase B est détectée dans les cellules épithéliales en migration et dans les couches basales et supra-basales de l'épithélium non blessé. Après 7 jours, la gélatinase B est également exprimée dans le tissu de granulation en remodelage (Salo, et al., 1994).

Dans un modèle de réparation de blessures de la peau chez le rat, les **stromélysines 1 et 3**, la **collagénase-3**, les **gélatinases A et B** et la **MT-MMP-1** sont fortement exprimées. Les transcrits de la gélatinase A et de la MT-MMP-1 ont des distributions semblables dans le stroma. L'activation de la gélatinase A est corrélée à la détection de la MT-MMP-1 à la surface des fibroblastes. Ces observations suggèrent que la MT-MMP-1 est l'activateur physiologique de la gélatinase A dans la réparation du derme après une blessure de la peau (Okada, et al., 1997).

#### **1.6.4. Le bFGF et la réparation des blessures.**

Des facteurs de croissance semblent intervenir dans la réparation des blessures. Des facteurs stockés dans la MEC pourraient être libérés et activés à la suite de la dégradation de la MEC par des protéases. Il semblerait que le bFGF soit un médiateur pré-synthétisé, stocké dans les cellules ou dans la MEC et libéré localement au site de la blessure au début du processus de réparation (niveau maximum à partir du jour 4) (Gibran, et al., 1994).

Le bFGF est supposé favoriser l'angiogenèse. C'est en particulier l'un des médiateurs de l'angiogenèse précoce et rapide observée lors de la réparation des tissus après une intervention chirurgicale (Nissen, et al., 1996). Un rôle similaire pour le bFGF stocké dans la MEC est proposé dans le cadre de l'angiogenèse tumorale (§ 1.8.3).

#### **1.6.5. Conclusion.**

La réparation efficace des blessures nécessite un remodelage et une reconstruction du tissu conjonctif et une re-épithélialisation de la surface endommagée. La réparation s'accompagne d'une expression de plusieurs MMPs et de TIMP-1 dans plusieurs types cellulaires. Le plus souvent, l'expression des MMPs et de TIMP-1 est détectée dans les mêmes régions, sinon dans les mêmes cellules, à la fois dans l'épithélium et dans le tissu conjonctif. Les cas chroniques de réparation inefficace sont caractérisés par des distributions plus restreintes des MMPs et de TIMP-1, ou même par l'absence de TIMP-1. Ces observations suggèrent qu'une régulation fine des MMPs et de TIMP dans chaque compartiment de la blessure est nécessaire à la réparation.

Des similarités peuvent être notées au niveau moléculaire entre la réparation des blessures et la réaction stromale dans les cancers (Dvorak, 1986).

## **1.7. Implication des MMPs et des TIMPs dans l'invasion tumorale et la formation des métastases.**

### **1.7.1. Introduction : la progression tumorale.**

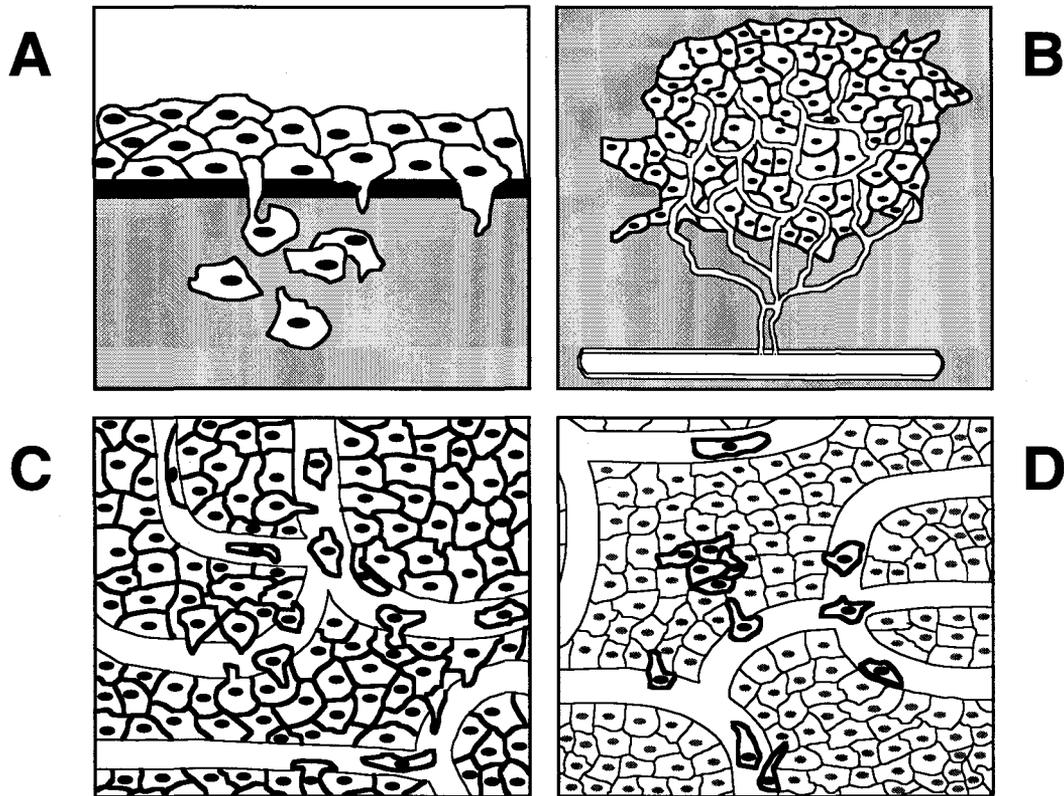
Le développement d'un cancer peut être représenté en plusieurs étapes (figure 7). Après la mutation de plusieurs proto-oncogènes, des cellules peuvent adopter un comportement anormal caractérisé par une prolifération excessive et une modification de leurs caractéristiques fonctionnelles. Une **tumeur** bénigne se forme. Les cellules néoplasiques induisent une réaction du tissu sain environnant. Les cellules stromales adjacentes au néoplasme modifient leur biochimie et leur morphologie. Elles vont constituer le **stroma tumoral** qui est une barrière mécanique opposée à l'expansion de la tumeur. Les cellules stromales ne sont pas uniquement localisées à la périphérie de la masse tumorale. La tumeur est constituée d'îlots de cellules néoplasiques et de cellules stromales.

Des événements ultérieurs permettront d'induire la **dégradation des composants extracellulaires** (membrane basale et matrice des tissus conjonctifs) et la migration des cellules néoplasiques grâce à des molécules d'adhésion spécifiques (Jouanneau, et al., 1995). La tumeur est alors **invasive** et présente un danger pour l'organisme. La prolifération continue et la tumeur a besoin d'apports nutritifs et respiratoires directs. Les cellules néoplasiques émettent des signaux qui vont induire la néo-formation de **capillaires sanguins** à partir de vaisseaux préexistants (angiogenèse). Une nouvelle étape dans la cancérisation est alors possible : la membrane basale entourant les capillaires est dégradée et des cellules peuvent passer dans la circulation sanguine (intravasation). Elles sont emmenées à travers l'organisme et pourront éventuellement sortir de la circulation (extravasation) et former des colonies (**métastases**) dans des tissus distants, ce qui rend plus difficile le traitement de la maladie.

Le concept de tumorigenèse multi-étape est largement documenté et accepté. Historiquement, on a d'abord pensé que la tumorigenèse résultait uniquement de l'acquisition de mutations successives qui conduisent directement à la surexpression de protéines normales, à l'expression de protéines activées, ou au contraire à la perte de suppresseurs de tumeur. Les produits de ces oncogènes ou de ces anti-oncogènes contrôlent la prolifération, les propriétés invasives et la sensibilité des cellules à leur environnement. Cependant, l'expression de protéases extracellulaires et d'inhibiteurs de protéases par les cellules stromales joue également un rôle important dans la progression tumorale. Ce sont des facteurs extrinsèques, par opposition aux facteurs intrinsèques, à savoir les oncogènes activés et les gènes dont la transcription est induite par les oncoprotéines dans les cellules néoplasiques.

Le sarcome de Kaposi est un exemple extrême de participation du tissu hôte à une pathologie tumorale. Ce sarcome est observé principalement en association avec le SIDA. Le bFGF et la protéine Tat du virus VIH-1 coopèrent à l'induction chez la souris de lésions semblables au sarcome de Kaposi. Tat est un facteur de croissance angiogénique liant

l'héparine. Il augmente la croissance des cellules endothéliales et l'expression de la gélatinase A en réponse au bFGF. Les cellules endothéliales sont les progéniteurs potentiels de cette tumeur. Le sarcome de Kaposi pourrait être une réponse de l'hôte à Tat, et non pas un véritable néoplasme (Ensoli, et al., 1994, Schwartz, 1996).



**Figure 7.** Histologie de la progression tumorale.

A) Invasion. Des cellules épithéliales néoplasiques franchissent la membrane basale et envahissent le tissu voisin.

B) Angiogenèse. Des cellules endothéliales migrent et forment de nouveaux capillaires dans la tumeur primaire.

C) Intravasation. Des cellules néoplasiques s'infiltrent dans les capillaires.

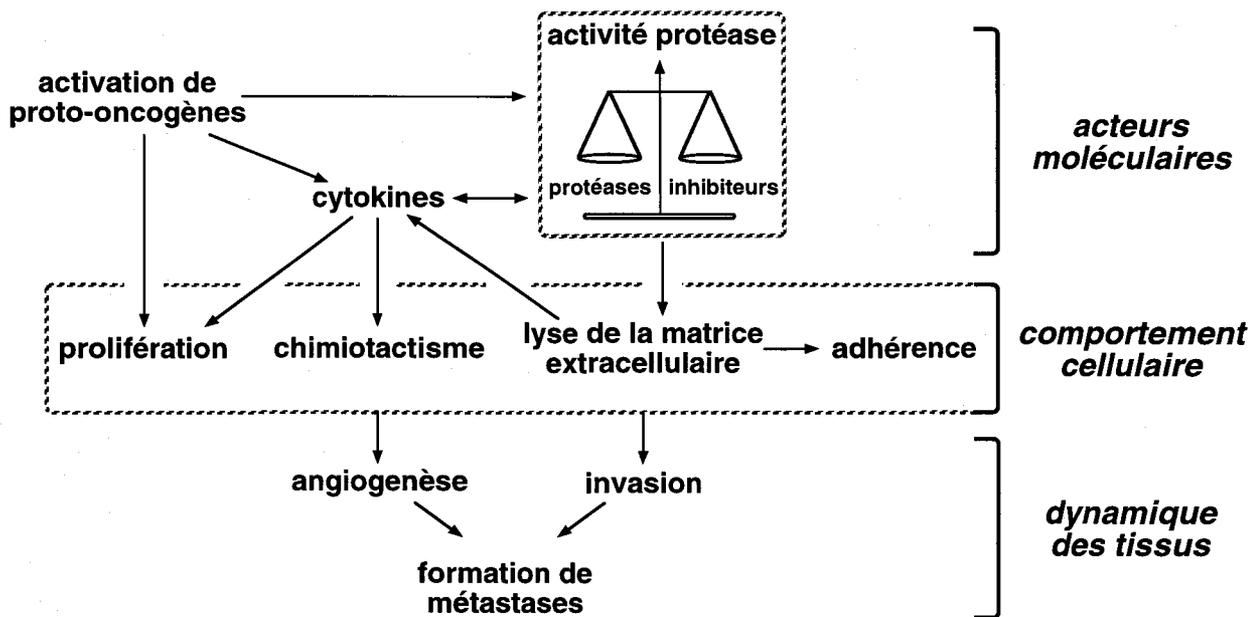
D) Extravasation et formation de métastases. Des cellules néoplasiques sortent de la circulation et s'implantent dans un tissu distant de la tumeur primaire.

Plusieurs étapes de la progression tumorale ont en commun la dégradation de composants extracellulaires par des protéases spécifiques. Cette dégradation est nécessaire aux déplacements des cellules néoplasiques ou des cellules endothéliales. Les protéases dégradant la matrice extracellulaire produites par des cellules invasives ou par des cellules du stroma tumoral se répartissent entre les **MMPs**, les **sérine protéases** (activateurs du plasminogène, plasmine, élastase des leucocytes, cathepsine G) et les **cystéine protéases** (d'origine

lysosomale et parfois exportées dans l'espace extracellulaire, comme la cathepsine B) (Mignatti et Rifkin, 1993, Coussens et Werb, 1996, Powell et Matrisian, 1996).

Expérimentalement, il est possible d'induire un processus cancéreux en traitant la peau d'une souris par un *initiateur* comme le DMBA (7, 12-diméthylbenz(a)anthracène) puis d'une manière répétée par un *promoteur* comme le TPA (12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate). Des papillomes bénins apparaissent après 15 semaines. 6% d'entre eux expriment la stromélysine-1, à un niveau faible. Après 25 à 30 semaines, 5 à 7% des animaux développent des carcinomes. La stromélysine-1 est détectée dans 73% d'entre eux (McDonnell et Matrisian, 1990).

Une meilleure compréhension des propriétés cellulaires nécessaires à l'invasion (**dégradation** de la MEC, **adhérence**, **migration**) devra prendre en compte leur interdépendance (figure 8). Les interactions cellule / matrice influencent l'expression des protéases (§ 1.9.2.4-5). Réciproquement, l'équilibre entre l'expression des protéases et des inhibiteurs peut fortement influencer les interactions cellule / matrice (Stetler-Stevenson, et al., 1993).



**Figure 8.** La régulation de l'activité protéolytique extracellulaire fait partie d'un réseau d'événements interdépendants qui concourent à la progression tumorale.

L'activation de proto-oncogènes participe à la prolifération et à l'expression de gènes codant des protéases ou leurs inhibiteurs. Les cytokines influencent la prolifération cellulaire ainsi que l'expression des protéases et de leurs inhibiteurs. L'activité protéolytique permet la lyse de la matrice extracellulaire (MEC), la libération des cytokines latentes de la MEC et leur activation. L'activité protéolytique modifie aussi les propriétés d'adhérence des cellules sur la MEC, propriétés importantes pour la migration. Les propriétés invasives concernent les cellules néoplasiques (invasion tumorale, dissémination métastatique) et les cellules endothéliales (angiogénèse). Le comportement des différents types cellulaires (cellules néoplasiques, fibroblastes du stroma, cellules endothéliales) est à l'origine de la dynamique des tissus dans la progression tumorale (croissance tumorale, invasion, angiogénèse tumorale, formation de métastases). Les relations indiquées sont justifiées au long des sections § 1.7 et 1.8.

## 1.7.2. Expression des MMPs dans les tumeurs.

### 1.7.2.1. Introduction.

L'implication des MMPs dans les processus invasifs et métastatiques a été révélée par plusieurs approches : des corrélations entre l'expression ou l'activité des MMPs et le stade des tumeurs humaines (dosage d'ARNm, hybridation *in situ*, immunohistochimie, tests de zymographie), des modèles d'invasion *in vitro* dans une matrice extracellulaire artificielle, des modèles animaux d'invasion tumorale et de métastase et l'utilisation des TIMPs pour inhiber toutes les MMPs (Powell et Matrisian, 1996).

### 1.7.2.2. Diversité de l'expression des MMPs.

Des études d'hybridation *in situ* ont montré que la plupart des MMPs sont produites par des **cellules stromales** proches des **cellules néoplasiques** (table 2) (Wolf, et al., 1994). L'expression stromale des MMPs suggère une induction *via* des facteurs produits par les cellules néoplasiques.

L'étude des cancers souligne la nécessité d'étudier la régulation et les fonctions spécifiques des différentes MMPs. L'expression et la localisation de toutes les MMPs connues ont été étudiées dans une série de biopsies de tumeurs du sein. Les MMPs sont exprimées dans le stroma, sauf la matrilysine et la collagénase-3. L'expression des MMPs représente donc principalement une réponse de l'hôte au néoplasme. Dans la plupart des cas, TIMP-1 est exprimé dans des cellules néoplasiques et stromales. La stromélysine-2 et la collagénase des neutrophiles ne sont pas détectées. Toutes les MMPs détectées ont des distributions très distinctes (Heppner, et al., 1996).

### 1.7.2.3. Expression précoce de la matrilysine.

La **matrilysine** est généralement exprimée dans les **cellules néoplasiques** des carcinomes, contrairement aux autres MMPs qui sont souvent détectées dans le stroma. C'est surtout au début de la progression tumorale que l'expression de la matrilysine et des autres MMPs manifeste cette distribution (Wilson et Matrisian, 1996). Par exemple, la matrilysine s'exprime dans les cellules d'un adénome du colon. Au stade carcinome, les cellules néoplasiques expriment encore la matrilysine et les cellules du tissu conjonctif environnant expriment la stromélysine-1, la stromélysine-3 et la gélatinase A (Newell, et al., 1994). Une expérimentation chez la souris montre que la collagénase-1 et la stromélysine-1 sont exprimées dans des cellules néoplasiques à un stade tardif de la progression tumorale (Wright, et al., 1994). La suppression de l'expression de la matrilysine dans des cellules néoplasiques du colon supprime leur capacité invasive *in vitro* (Yamamoto, et al., 1995). La modulation de l'expression de la matrilysine affecte la tumorigénicité *in vivo* des cellules (Witty, et al., 1994).

Enzyme	Tumeurs	Localisation
<b>Matrilysine</b>	Prostate Colon Sein Estomac Carcinomes cutanés	<b>Néoplasme</b> <b>Néoplasme</b> Néoplasme ; conduits épithéliaux <b>Néoplasme</b> <b>Néoplasme</b>
<b>Collagénase-1</b>	Estomac / intestin Tête et cou Sein	Néoplasme Stroma / Néoplasme Stroma
<b>Collagénase-3</b>	Sein	Stroma / Néoplasme
<b>Stromélysine-1</b>	Colon Oesophage Carcinomes cutanés Sein	Stroma Néoplasme Stroma Stroma
<b>Stromélysine-2</b>	Tête et cou	Stroma / Néoplasme
<b>Stromélysine-3</b>	Sein Carcinomes cutanés Tête et cou Colon Poumon	<b>Stroma</b> <b>Stroma</b> <b>Stroma</b> <b>Stroma</b> <b>Stroma</b>
<b>Gélatinase A</b>	Col de l'utérus Colon Oesophage Poumon Thyroïde Sein	Stroma / Néoplasme Stroma Néoplasme Stroma / Néoplasme Néoplasme Stroma / Néoplasme
<b>Gélatinase B</b>	Col de l'utérus Lymphome Sein Poumon	Stroma / Néoplasme Néoplasme / Macrophages Néoplasme / cellules endothéliales Stroma / Néoplasme
<b>MT-MMP-1</b>	Sein Colon Tête et cou Poumon	Stroma Stroma Stroma Néoplasme

**Table 2.** Expression des métalloprotéases de la matrice dans les tumeurs humaines.

La table est adaptée de celle présentée dans la publication (Powell et Matrisian, 1996).

#### 1.7.2.4. *Gélatinase A, MT-MMP-1 et invasion tumorale.*

Les cellules stromales et néoplasiques semblent coopérer au processus de dégradation de la MEC au voisinage des cellules invasives (Noel, et al., 1994). En particulier, la **gélatinase A** peut être exprimée par des cellules stromales ou par des cellules néoplasiques. Dans certains cas, elle serait spécifiquement recrutée à la surface des cellules néoplasiques invasives et y serait activée par la **MT-MMP-1**.

La MT-MMP-1 a été isolée et caractérisée comme une MMP membranaire dont l'expression à la surface cellulaire induit l'activation de la pro-gélatinase A et une augmentation des propriétés invasives *in vitro* des cellules. *In vivo*, les cellules d'un carcinome invasif du poumon, dans lequel des formes actives de la gélatinase A sont détectées, expriment des transcrits de la MT-MMP-1 (Sato, et al., 1994). L'expression de la MT-MMP-1 dans les cellules néoplasiques de tumeurs de l'estomac et de gliomes est corrélée à l'expression et à l'activation de la gélatinase A (Nomura, et al., 1995, Yamamoto, et al., 1996). Dans d'autres cancers (colon, sein, tête et cou), c'est dans les fibroblastes du stroma que les transcrits MT-MMP-1 sont détectés, en relation plus étroite avec les transcrits gélatinase A que ceux d'autres MMPs (Okada, et al., 1995).

La gélatinase A peut présenter une localisation membranaire, mais pas exclusivement en relation avec une MT-MMP. La localisation de la gélatinase A sur la surface de cellules invasives peut aussi être expliquée par sa liaison à l'**intégrine  $\alpha$ V $\beta$ 3** (Brooks, et al., 1996). Une autre étude montre que la pro-gélatinase A se fixe à la surface d'extensions membranaires spécialisées appelées **invadopodia**, perd son pro-peptide et que la forme active s'immobilise sur la MEC (Monsky, et al., 1993). Les invadopodia sont les sites de l'invasion des cellules néoplasiques dans la matrice.

Il est également remarquable que l'intégrine  $\alpha$ V $\beta$ 3 puisse induire l'expression de la gélatinase A dans des cellules de mélanome (table 5, page 72). Les intégrines sont aussi impliquées dans l'adhérence, une propriété cellulaire importante pour l'invasion. En particulier, l'expression de l'intégrine  $\alpha$ V $\beta$ 3 par des cellules CS-1 (lignée de mélanome) leur permet de lier la gélatinase A. La gélatinase A inhibe l'adhérence de ces cellules sur la vitronectine, mais pas leur adhérence et leur migration sur le collagène IV. L'intégrine  $\alpha$ V $\beta$ 3 pourrait donc lier à la fois la gélatinase A et des fragments de collagène dégradé (Brooks, et al., 1996).

#### 1.7.2.5. *Expression des MMPs et pronostic clinique.*

##### 1.7.2.5.1. La collagénase-1 et le cancer du colon.

L'expression de la collagénase-1 a été étudiée par immunohistochimie dans des tumeurs du colon. Elle est corrélée à un mauvais pronostic. Un inhibiteur de la collagénase-1 inhibe la croissance de tumeurs humaines du colon greffées chez la souris. Ces résultats révèlent que la

collagénase-1 est un nouveau facteur pronostique et une cible thérapeutique potentielle dans le cancer du colon (Murray, et al., 1996).

#### 1.7.2.5.2. La stromélysine-3.

La stromélysine-3 a été isolée par criblage différentiel d'une banque d'ADNc d'une tumeur du **sein** versus un tissu non malin (Basset, et al., 1990). Elle est exprimée dans le stroma de la majorité des carcinomes invasifs du sein, mais rarement dans les carcinomes *in situ*. La stromélysine-3 permet également d'identifier des sous-populations de cellules agressives et d'apprécier le risque d'une évolution vers un cancer invasif. Son expression dans la tumeur primaire est corrélée à la formation des métastases et à l'issue de la maladie. Elle est indépendante des autres facteurs pronostiques étudiés (Hahnel, et al., 1993, Basset, et al., 1994, Engel, et al., 1994, Chenard, et al., 1996).

La stromélysine-3 est également exprimée dans la plupart des carcinomes invasifs humains, mais rarement dans des tumeurs non épithéliales. Dans tous les cas, son expression est stromale. Comme dans les tumeurs du sein, son expression dans des carcinomes non invasifs du **col de l'utérus** ou de la **vessie** est corrélée au risque d'évolution vers un cancer invasif (Rouyer, et al., 1994).

La stromélysine-3 est relativement peu active sur les composants de la MEC (table 1, page 26). Elle pourrait participer au phénotype invasif en activant d'autres protéases ou en inactivant des inhibiteurs de protéases, comme l' $\alpha$ 1-antiprotéase (§ 1.3.3.5.3).

#### 1.7.2.6. Conclusion.

Les MMPs sont nécessaires à la dégradation de composants spécifiques de la MEC. Elles participent à la progression tumorale en s'exprimant à des temps différents et à des localisations histologiques variées. La matrilysine serait l'acteur le plus précoce. Pour certaines tumeurs primaires, l'expression d'une MMP est un facteur prédictif de l'évolution ultérieure de la maladie, ce qui est potentiellement intéressant dans le choix du traitement post-opératoire.

### 1.7.3. Expression des TIMPs dans les tumeurs.

#### 1.7.3.1. Introduction.

Le rôle des MMPs dans les cancers n'est conçu que dans le sens de l'aggravation de la pathologie. Il est donc tentant de postuler que les TIMPs puissent être, en raison de leur activité anti-métalloprotéase, des inhibiteurs de la progression tumorale. Par ailleurs, l'étude de l'implantation du blastocyste montre la capacité de TIMP à limiter *in vivo* un processus invasif induit par des MMPs (§ 1.5.1).

Plusieurs résultats confirment le pouvoir inhibiteur de TIMP dans la progression tumorale (Khokha et Denhardt, 1989). Cependant, dans d'autres cas, une expression élevée de TIMP est corrélée à la progression tumorale. La suppression de TIMP-1 dans une lignée de

cellules transformées s'accompagne de la réduction de l'activité métastatique. TIMP-1 est fortement exprimé par des métastases d'hépatocarcinome dans le poumon. Dans le cancer du sein, une expression stromale élevée de TIMP-2 est corrélée à une activité invasive élevée.

#### 1.7.3.2. *TIMP peut inhiber la progression tumorale.*

TIMP-1 peut inhiber la capacité invasive *in vitro* de cellules transformées, ainsi que leur tumorigénicité et leur potentiel métastatique. Un apport de TIMP-1 exogène augmente l'adhérence des cellules B16-F10 de mélanome de souris sur une membrane amniotique humaine et réduit l'invasion à travers cette membrane. L'activité anti-MMP de TIMP peut expliquer ces observations par la préservation des composants de la membrane. Injectées dans une souris, ces cellules ont un pouvoir métastatique inhibé par TIMP-1, mais la croissance des métastases formées est inchangée. Dans ce modèle, l'extravasation et/ou l'invasion semblent inhibées par TIMP-1 (Schultz, et al., 1988). Une autre étude montre que des cellules B16-F10 surexprimant un TIMP-1 exogène ont une tumorigénicité et un potentiel métastatique inhibés (Khokha, 1994).

*In vivo*, des cas de corrélation entre l'activité métalloprotéase (qui dépend de la quantité des MMPs et des TIMPs) et la progression tumorale sont connus. Dans les **cancers du sein**, le niveau de TIMP-1 est plus bas dans les carcinomes que dans les adénomes, alors que les quantités de la collagénase-1, des gélatinases A et B et de TIMP-2 sont semblables. La quantité des gélatinases est nettement plus élevée dans les cas métastatiques (Iwata, et al., 1996). De même, dans le **cancer du col de l'utérus**, le rapport entre le nombre de cellules exprimant les gélatinases et celles exprimant les TIMPs 1 et 2 semble un facteur essentiel de l'agressivité de la tumeur. Une réduction nette des TIMPs est observée dans les cancers à mauvais pronostic (Nuovo, et al., 1995).

Un cas est rapporté dans lequel l'activité métalloprotéase dans la circulation sanguine est significative. Chez des patients en rémission après un **cancer de l'uretère** (conduit reliant le rein à la vessie) la récurrence des cancers est élevée et la survie est plus courte lorsque le rapport TIMP-2 sur gélatinase A dans la circulation sanguine est faible. Ce paramètre est un nouvel indicateur pronostique indépendant dans le cancer de l'uretère (Gohji, et al., 1996).

Des études par immunohistochimie de la **tumeur de l'os à cellules géantes** ont montré que l'expression des gélatinases A et B et des TIMPs 1 et 2 est différente entre les tumeurs non-récurrentes et les tumeurs récurrentes. Ces dernières présentent un large déséquilibre d'expression des MMPs et des TIMPs en faveur des MMPs. L'évolution de la pathologie n'est pas prévisible selon d'autres critères (Schoedel, et al., 1996).

### 1.7.3.3. *TIMP* pourrait promouvoir la progression tumorale.

#### 1.7.3.3.1. Les TIMPs et le cancer du sein.

Une étude immunohistochimique des gélatinases A et B et de **TIMP-2** dans le cancer du sein a révélé leur expression dans la majorité des cas. Les gélatinases sont détectées à la surface des cellules néoplasiques et TIMP-2 dans le stroma. Le niveau d'expression des gélatinases n'est corrélé ni à la présence de métastases au moment de l'intervention, ni à l'issue de la maladie. Par contre, l'expression de TIMP-2 est plus élevée dans les cas de récurrence (Visscher, et al., 1994). Une autre étude immunohistochimique de tumeurs du sein rapporte que, dans plus de la moitié des cas, la collagénase-1, les gélatinases A et B et les TIMPs 1 et 2 sont localisés au niveau des cellules néoplasiques et, en ce qui concerne la gélatinase A, plus particulièrement à la surface cellulaire. Le taux d'activation de la **gélatinase A** est plus élevé dans les cas métastatiques que dans les tumeurs non métastatiques et les adénomes (Iwata, et al., 1996). Les ARNm **TIMP-1** sont plus abondants dans des tumeurs malignes du sein que dans des tumeurs bénignes (Yoshiji, et al., 1996).

*In vitro*, TIMP-2 est impliqué dans le recrutement membranaire de la gélatinase A et dans son activation par une MT-MMP (§ 1.4.4.2). Ce mécanisme pourrait expliquer la corrélation entre un niveau élevé d'expression de TIMP-2 et une récurrence élevée des cancers du sein (Visscher, et al., 1994). L'activation de la pro-gélatinase A pourrait être une étape plus limitante pour l'activité protéolytique extracellulaire que la seule synthèse de pro-gélatinase A. En effet, le niveau global des gélatinases et pro-gélatinases dans les tumeurs est peu corrélé à la récurrence du cancer (Visscher, et al., 1994) et, d'autre part, le taux d'activation de la pro-gélatinase A est corrélé à la progression tumorale (Iwata, et al., 1996). Une autre étude a montré que les potentiels tumorigènes et métastatiques de lignées cellulaires de carcinome du sein sont corrélés à l'activation de la gélatinase A, événement localisé sur la membrane, mais pas à son taux d'expression (Azzam, et al., 1993).

Il faut aussi rappeler que **TIMP-1** induit la croissance de kératinocytes en culture, indépendamment de sa capacité à réguler la composition de la MEC. La déplétion de TIMP-1 dans le sérum utilisé en culture cellulaire supprime l'induction par le sérum de la prolifération des cellules MCF7 (lignée de carcinome du sein) (§ 1.4.5.1). Il n'est donc pas exclu que un ou des TIMPs puissent dans certains cas contribuer directement à la croissance tumorale, en particulier dans le cancer du sein.

Il est également remarquable que **TIMP-3** ait été isolé dans une banque d'ADNc préparée à partir d'une tumeur du sein, criblée par une sonde TIMP dégénérée. TIMP-3 est exprimé dans toutes les tumeurs du sein étudiées (Uria, et al., 1994). La synthèse de ChIMP-3, l'homologue potentiel de TIMP-3 chez le poulet, est stimulée dans les stades précoces de la transformation de fibroblastes de poulet. De plus, l'addition dans une culture de protéine ChIMP-3 purifiée induit certains caractères phénotypiques de cellules transformées (Yang et

Hawkes, 1992). Ces observations suggèrent que TIMP-3 pourrait contribuer à la transformation cellulaire et à la progression tumorale.

#### 1.7.3.3.2. Les TIMPs et la formation des métastases.

Dans le cas des **hépatocarcinomes**, l'expression des **TIMPs 1 et 2** est plus élevée dans la tumeur primaire que dans le tissu sain. TIMP-2 est exprimé plus faiblement que TIMP-1. L'expression des TIMPs dans les tumeurs est le plus souvent homogène. Le niveau d'expression des TIMPs n'est pas corrélé au stade de progression de la tumeur primaire, mais l'expression de TIMP-1 dans les métastases pulmonaires est toujours élevée (Nakatsukasa, et al., 1996).

Une étude *in vivo* a montré que la formation de métastases dans le poumon par des cellules du derme transformées est identique chez des souris déficientes en TIMP-1 et chez des souris de type sauvage dont les poumons produisent naturellement TIMP-1. Au contraire, la mutation du gène de **TIMP-1** dans les cellules injectées, par insertion d'un codon stop dans le 3<sup>e</sup> exon, augmente le pouvoir métastatique de deux lignées cellulaires mais, d'une manière inattendue, inhibe 37 fois celui d'une troisième lignée (Soloway, et al., 1996). Ces résultats suggèrent que TIMP-1 peut, selon la tumeur, inhiber ou favoriser la formation de métastases.

#### 1.7.3.3.3. Autres cancers.

D'autres études indiquent que l'activation de la gélatinase A par la MT-MMP-1 est une étape clé de l'acquisition du phénotype invasif dans des cancers du poumon (Tokuraku, et al., 1995), de l'ovaire (Fishman, et al., 1996) et de l'estomac (Nomura, et al., 1996). Les observations effectuées suggèrent que l'activation de la gélatinase A est médiée par TIMP-2.

#### 1.7.3.4. Conclusion.

Les observations contrastées sur l'expression et les fonctions potentielles des TIMPs dans des tumeurs ou dans des cultures de cellules transformées semblent refléter les différentes propriétés des TIMPs mises en évidence *in vitro* (activité anti-métalloprotéase, médiation de l'activation de la gélatinase A par la MT-MMP-1, activité anti-angiogénique, stimulation de la prolifération). L'activité anti-métalloprotéase de TIMP limite l'invasion cellulaire en inhibant la dégradation de la MEC ou pourrait hypothétiquement la favoriser par une augmentation de l'adhérence. La préservation des composants extracellulaires prévient aussi la stimulation de la prolifération et/ou de l'expression de protéases par des facteurs de croissance (§ 1.9.2.2) immobilisés dans la MEC ou par des produits de dégradation de la MEC (régulation *via* les intégrines, § 1.9.2.4.1).

Dans plusieurs cancers, et en particulier dans le cancer du sein, une coopération entre TIMPs et MMPs à la progression tumorale est envisageable sur la base d'analyses biochimiques, histologiques et cliniques. Il est nécessaire de préciser les propriétés des TIMPs

par des études complémentaires et d'être très prudent dans l'évaluation de leur rôle dans les cancers.

#### **1.7.4. Utilisation thérapeutique des inhibiteurs de protéases.**

Des inhibiteurs de MMPs synthétiques (MMPIs), ou des inhibiteurs d'autres protéases, ont été utilisés dans le traitement de tumeurs. Ils sont capables d'inhiber la croissance tumorale (en préservant l'encapsulation stromale et en inhibant l'angiogenèse tumorale) ou d'inhiber la formation des métastases (DeClerck et Imren, 1994).

En raison de leur mode d'action, il est anticipé les MMPIs auront un profil de toxicité très différent des drogues cytotoxiques. Ils pourraient interagir avec d'autres protéases dépendantes du zinc ou pourraient interférer avec la maturation des cytokines. La seconde génération de MMPIs est susceptible d'être administrée par voie orale, plutôt qu'en application locale, ce qui est très important en raison de la nécessité de traitements à long terme (Talbot et Brown, 1996).

Les TIMPs ne semblent pas avoir été testé cliniquement comme agents anti-tumoraux.

#### **1.7.5. Interactions cellules néoplasiques / fibroblastes**

##### ***1.7.5.1. Modélisation des interactions néoplasme / stroma.***

La réponse du tissu hôte au néoplasme freine la croissance de la tumeur mais peut aussi contribuer à la progression tumorale. L'expression de MMPs par des fibroblastes du stroma est un élément de cette réponse.

La coculture de cellules néoplasiques d'origine épithéliale et de fibroblastes permet de modéliser *in vitro* l'interaction néoplasme / stroma. L'addition dans une culture cellulaire d'un milieu conditionné ou de cellules tuées par congélation permet de déterminer si une modification de l'expression des MMPs ou des TIMPs est médiée par un facteur soluble (stimulation paracrine) ou si elle dépend de contacts cellulaires directs.

##### ***1.7.5.2. Expression des MMPs et de TIMP-1.***

La coculture de 5 lignées néoplasiques avec des fibroblastes normaux induit l'expression de la **collagénase-1**, de la **stromélysine-1** et de **TIMP-1** dans les fibroblastes. L'observation d'une induction dépend du rapport entre les deux populations. Lorsque le nombre de fibroblastes est 10 fois plus élevé que le nombre de cellules néoplasiques, c'est l'expression des MMPs qui est induite ; lorsque ces nombres sont égaux, c'est l'expression de TIMP qui est induite. Ces résultats indiquent que les interactions cellulaires modifient l'activité protéolytique extracellulaire (Nabeshima, et al., 1994).

Une étude a montré que l'activité collagénolytique exprimée par des fibroblastes est induite (x 15 à 50) par un facteur soluble produit par des cellules de carcinome du poumon

(Biswas, 1984). Ce facteur pourrait être le TCSF, un facteur tumoral stimulant l'expression de la collagénase-1, de la stromélysine-1 et de la gélatinase A (§ 1.9.2.6).

La **MT-MMP-1** est exprimée dans des cellules stromales proches des sites d'invasion dans des tumeurs du sein. Un milieu conditionné par les cellules MDA-MB-231 (lignée invasive de cancer du sein) induit l'expression d'ARMm MT-MMP-1 et l'**activation de la gélatinase A** dans une culture de fibroblastes humains. Cette induction n'est pas obtenue avec un milieu conditionné par les cellules MCF-7 (lignée non invasive de cancer du sein) (Polette, et al., 1997b). Ces observations suggèrent qu'un facteur soluble produit par les cellules néoplasiques pourrait induire l'expression de la MT-MMP-1 dans le stroma et l'activation de la gélatinase A. La corrélation avec la capacité invasive des cellules néoplasiques suggère que ce mécanisme est fonctionnel dans l'invasion.

L'expression de la **matrilysine** est induite dans une culture de kératinocytes tumoraux par un facteur soluble produit par des fibroblastes. La **gélatinase B** est induite dans une coculture de ces cellules, mais pas lors de tests utilisant un milieu conditionné ou des cellules tuées. L'induction pourrait être médiée par un facteur membranaire détruit ou perdu pendant la congélation / décongélation, ou par la coopération de contacts cellulaires directs et d'un facteur cellulaire soluble (Borchers, et al., 1994).

Des fibroblastes induisent l'expression de la **gélatinase B** dans des cellules néoplasiques du sein *via* un facteur soluble. Ce résultat pourrait expliquer que *in vivo* la quantité des transcrits de la gélatinase B observés au niveau des cellules néoplasiques est plus élevée à l'interface néoplasme / stroma (Lengyel, et al., 1995, Himmelstein et Muschel, 1996).

L'expression de la gélatinase B est également induite dans des fibroblastes d'origines différentes par des contacts directs avec des cellules néoplasiques de tumeurs colorectales primaires, mais pas en présence de cellules de métastases hépatiques ou lymphatiques. Cette induction est bloquée complètement par un anticorps anti-intégrine  $\beta 1$  et partiellement par des anticorps anti- $\alpha 5$  ou anti- $\alpha V$  (Segain, et al., 1996). Cette observation rappelle l'expression de la collagénase-1, de la stromélysine-1 et de la gélatinase B induite dans des fibroblastes par l'activation de l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$ , un récepteur de la fibronectine (§ 1.9.2.4.1).

Ces résultats montrent que des stimulations paracrines et des contacts cellulaires directs entre des cellules épithéliales néoplasiques et des fibroblastes influencent l'expression de plusieurs gènes par ces cellules. La progression tumorale peut être expliquée non seulement par l'activation de proto-oncogènes dans les cellules néoplasiques, mais aussi par l'induction de MMPs et de TIMPs dans des cellules néoplasiques ou stromales sous l'influence d'autres cellules.

### 1.7.5.3. Implication du facteur de transcription *Ets1*.

Le gène *ets1* est un bon candidat à l'induction dans le stroma de gènes contrôlant l'activité protéolytique extracellulaire, sous l'influence des cellules néoplasiques. Il est régulé par des cytokines et des facteurs de croissance. Nous notons que les facteurs Fos-Jun sont

également inductibles par de nombreux stimuli extracellulaires (§ 2.1, 2.10) et induisent plusieurs MMPs, TIMP-1 (§ 1.9.1.2) et l'uPA (§ 3.7.2.2.3) en coopération avec des facteurs Ets.

Des milieux de culture conditionnés par des lignées néoplasiques induisent l'expression de *ets1* par des fibroblastes. Le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 induisent une élévation des ARNm *ets1* observée entre 1 h et 19 h après le traitement. L'induction par le bFGF, l'EGF et le PDGF se manifeste seulement après 19 h. Cependant, ces trois facteurs augmentent l'induction par le TNF- $\alpha$  à partir de 4 h. L'association de l'IL-1 au TNF- $\alpha$  est sans effet supplémentaire. Ces résultats indiquent que *ets1* est induit par plusieurs facteurs et qu'il est en particulier un gène de réponse précoce au TNF- $\alpha$  (Gilles, et al., 1996).

Il est remarquable que dans les tumeurs invasives l'expression du facteur de transcription *c-ets1* soit localisée dans les cellules endothéliales et les fibroblastes du stroma et soit corrélée à l'expression dans les fibroblastes de la **collagénase-1** et de la **stromélysine-1**. *c-ets1* n'est pas exprimé dans les tumeurs bénignes (Vandenbunder, et al., 1994b, Calmels, et al., 1995).

Une autre étude montre que les ARNm *ets1* et **collagénase-1** sont coexprimés dans les mêmes régions du stroma, dans 11 tumeurs du poumon sur 34 étudiées. De plus, leurs niveaux d'expression sont corrélés. Ces résultats suggèrent que le facteur de transcription Ets1 pourrait contribuer à l'induction de la collagénase-1 dans le stroma et participer à l'invasion tumorale (Bolon, et al., 1995).

Dans un système de coculture, l'uPA et le facteur de transcription *ets1* sont induits dans des fibroblastes par un facteur soluble produit par des kératinocytes tumoraux. Des contacts cellulaires directs contribuent également à l'expression de *ets1* (Borchers, et al., 1994).

## **1.8. Implication des MMPs et TIMPs dans l'angiogenèse tumorale.**

### **1.8.1. Introduction.**

La formation de nouveaux vaisseaux sanguins dans l'embryon ou chez l'adulte (dans l'inflammation, la réparation de blessures, le cycle menstruel, la formation d'os, la croissance tumorale) est appelée **angiogenèse**. Elle nécessite la prolifération et la migration des **cellules endothéliales**. Lors de la formation d'un nouveau vaisseau chez l'adulte, les cellules endothéliales d'un capillaire préexistant doivent d'abord dégrader la membrane basale qui l'entoure. Les cellules migrent ensuite de la paroi du vaisseau vers la source du stimulus angiogénique. Ces étapes nécessitent la dégradation de la MEC par des protéases.

## 1.8.2. Cultures de cellules endothéliales.

### 1.8.2.1. Expression des MMPs et des TIMPs.

C'est *in vitro* que l'expression des MMPs et des TIMPs par des cellules endothéliales a d'abord été observée. Des cellules endothéliales en culture expriment constitutivement la **collagénase-1**, la **gélatinase A** et les **TIMPs 1 et 2**. Le traitement des cellules par le TNF- $\alpha$  induit l'expression de la **stromélysine-1**. Le PMA (phorbol 12-myristate 13-acétate) induit également TIMP-1 et la **gélatinase B**, l'expression de cette dernière pouvant être ensuite augmentée par le TNF- $\alpha$  ou l'IL-1 $\alpha$  (Hanemaaijer, et al., 1993).

Des cellules endothéliales humaines de cordon ombilical ou de vaisseaux de la peau stimulées par le PMA envahissent un gel de collagène et y forment des tubules semblables à des vaisseaux. La production de **collagénase-1** active est fortement stimulée et, dans une moindre mesure, la production de gélatinase A active. L'addition de TIMP bloque l'invasion dans le gel et la formation des tubules. Ces résultats montrent que la collagénase-1 est nécessaire à l'angiogenèse *in vitro* (Fisher, et al., 1994).

La pro-gélatinase A et la **gélatinase A** ont été détectées dans une fraction membranaire de cellules endothéliales humaines. Les membranes induisent l'activation d'une pro-gélatinase A exogène. Le traitement préalable des cellules par le TPA augmente cette capacité d'activation, ainsi que l'expression de la **MT-MMP-1**. La gélatinase A pourrait être activée par la MT-MMP-1 à la surface des cellules endothéliales et être impliquée dans la dégradation de la membrane basale lors de l'angiogenèse (Lewalle, et al., 1995).

### 1.8.2.2. Facteurs de transcription liés à l'angiogenèse.

La régulation de deux facteurs de transcription, Ets1 et ARNT, a été observée en relation avec l'angiogenèse. Les ARNm *ets1* sont induits par les facteurs angiogéniques aFGF, bFGF, VEGF et EGF, dans plusieurs lignées de cellules endothéliales humaines. Un oligonucléotide *ets1* antisens bloque la synthèse des protéines Ets1, **uPA** et **collagénase-1** induite par les facteurs angiogéniques et bloque la migration des cellules et la formation de tubes (Iwasaka, et al., 1996).

**ARNT** (« *arylhydrocarbon-receptor nuclear translocator* ») est membre d'une famille de facteurs de transcription à domaines basiques et hélice-boucle-hélice qui forment des hétérodimères. Il est induit en réponse à l'hypoxie ou à l'hypoglycémie. Des embryons de souris déficients en ARNT meurent au jour E 10.5. Ils présentent un défaut de vascularisation semblable à celui observé chez des souris déficientes en VEGF. ARNT pourrait réguler l'expression de facteurs angiogéniques (Maltepe, et al., 1997).

## 1.8.3. Un modèle de l'angiogenèse tumorale.

Le modèle suivant a été proposé pour décrire l'angiogenèse tumorale (Mignatti et Rifkin, 1996). Les activateurs du plasminogène déclenchent une cascade de clivages qui conduisent à

l'apparition de concentrations localement élevées de **plasmine** et de **MMPs** actives. Cette activité protéolytique permet la dégradation de la membrane basale et la migration des cellules endothéliales.

Les activités protéolytiques permettent aussi de libérer et d'activer des facteurs de croissance immobilisés dans la MEC. La plasmine libère le **bFGF** et le **VEGF** à partir de la surface cellulaire et de la MEC (Saksela et Rifkin, 1990, Houck, et al., 1992). *In vitro*, ces deux facteurs de croissance stimulent l'expression par les cellules endothéliales de l'uPA, du tPA, de l'uPA-R et de la collagénase-1. La plasmine induit également l'activation du **TGF- $\beta$**  latent (Sato et Rifkin, 1989). *In vitro*, le TGF- $\beta$  actif réduit les effets du bFGF sur les cellules endothéliales, en inhibant l'expression de l'uPA et en stimulant celle du PAI (Saksela, et al., 1987, Flaumenhaft, et al., 1992).

L'expression de protéases dans le stroma n'explique pas la localisation du processus invasif à l'extrémité d'un capillaire en extension. Les cellules endothéliales à l'extrémité migrent, alors qu'il est important que toutes les autres restent stationnaires pour préserver la structure du capillaire. Le TGF- $\beta$  pourrait contribuer à une réversion de la capacité invasive des cellules endothéliales et à la stabilité des capillaires formés (Mignatti et Rifkin, 1996).

#### 1.8.4. Observations *in vivo*.

Plusieurs études ont indiqué que l'expression *in vivo* de certaines protéases n'est pas détectée dans les cellules endothéliales, mais au contraire dans les fibroblastes du stroma (hybridation *in situ* ou immunohistochimie) (Vandenbunder, et al., 1994a). Il est possible que les cellules endothéliales recrutent à leur surface l'**uPA** (Pepper, et al., 1993) ou la **gélatinase A** (Brooks, et al., 1996), sans les exprimer elles-mêmes. Inversement, il n'est pas exclu qu'une expression transitoire de protéases par les cellules endothéliales ait échappée à la détection. L'expression de protéases par les cellules endothéliales (comme observé *in vitro*) pourrait contribuer à initier le processus invasif, en particulier la dégradation de la membrane basale entourant le vaisseau préexistant.

Dans le cas du **sarcome de Kaposi** (présenté en § 1.7.1), l'implication d'une MMP semble nécessaire à l'angiogenèse tumorale. L'inhibition de la **gélatinase A** par l'apport de son pro-peptide ou de TIMP-2 bloque l'angiogenèse induite par un facteur soluble produit par les cellules du sarcome de Kaposi. Ce résultat est obtenu *in vitro* (culture de cellules endothéliales sur matrigel, en milieu conditionné par des cellules néoplasiques) et *in vivo* (injection de matrigel et de milieu conditionné dans la souris) (Albini, et al., 1994, Benelli, et al., 1994).

Un antagoniste de l'uPA-R, construit à partir du domaine de l'uPA semblable à l'EGF, inhibe la vascularisation et la croissance d'un mélanome développé après l'injection de cellules B16-BL6 chez la souris. L'uPA et son récepteur sont des éléments clé d'une cascade protéolytique et sont des cibles potentielles en vue d'inhiber la progression tumorale (Min, et al., 1996a).

### 1.8.5. L'activité anti-angiogénique des TIMPs 1 et 2.

La densité des micro-vaisseaux dans le cancer du sein est considérée comme un facteur pronostique. Etant donné l'implication des MMPs dans l'angiogenèse, cette observation a motivé l'étude de l'action d'un TIMP-1 exogène sur l'angiogenèse *in vitro*. Sous forme d'une molécule de 29 kDa, TIMP-1 inhibe l'activité MMP et l'angiogenèse. Sous forme d'agrégats de 66 kDa, il n'inhibe plus l'activité MMP mais inhibe encore l'angiogenèse comme la forme de 29 kDa. Ces résultats révèlent un pouvoir anti-angiogénique de TIMP-1 indépendant de son activité anti-MMP (Thorgeirsson, et al., 1996).

Une revue antérieure à ces travaux a au contraire suggéré que TIMP-1 inhibait l'angiogenèse tumorale en partie *via* l'inhibition des protéases. Le pouvoir inhibiteur de TIMP-1 sur la capacité invasive des cellules endothéliales est fortement diminué en présence d'anticorps neutralisant la gélatinase A. Cette observation suggère que l'activité anti-angiogénique de TIMP-1 serait une conséquence de son activité anti-MMP. Cette publication rapporte cependant que l'inhibition par TIMP-2 de la réponse angiogénique au bFGF serait indépendante de l'activité anti-MMP (Ray et Stetler, 1994).

Nous avons vu également que des résultats contrastés ont été rapportés sur l'influence des TIMPs 1 et 2 sur la prolifération des cellules endothéliales en culture (§ 1.4.5.2).

### 1.8.6. Conclusion.

Il semble difficile d'établir clairement un modèle de l'angiogenèse tumorale et d'évaluer en détail sa pertinence *in vivo*. Les intervenants sont très complexes (protéases s'activant en cascade, inhibiteurs de protéases et facteurs anti-angiogéniques, facteurs de croissance latents dans la MEC). A notre connaissance, Ets1 est le seul facteur de transcription régulant des gènes de protéases pour lequel une implication lors de l'angiogenèse soit suggérée.

Il est difficile d'exploiter les observations *in vitro*, car elles correspondent peut-être *in vivo* à des événements très localisés dans l'espace et le temps, dans le contexte de structures extracellulaires de composition variée et soumises à l'activité dynamique de plusieurs types cellulaires. Les recherches *in vitro* sont néanmoins indispensables à l'identification des acteurs potentiels de l'angiogenèse.

## 1.9. La régulation transcriptionnelle des MMPs et des TIMPs.

### 1.9.1. Eléments régulateurs et facteurs de transcription.

#### 1.9.1.1. Présentation d'ensemble.

La synthèse des MMPs est suivie rapidement par leur sécrétion. Les signaux qui régulent l'expression des MMPs agissent presque exclusivement au niveau de la transcription (Woessner, 1991), ce qui confère une importance toute particulière à l'étude de la régulation de l'activité des promoteurs des MMPs. La figure 9 présente des sites de fixation de facteurs de transcription dans les promoteurs de plusieurs MMPs et TIMPs humains. Certains sites sont *fonctionnels* (ils sont nécessaires à la régulation de la transcription par des facteurs spécifiques qui reconnaissent ces sites), d'autres sont *potentiels* (ils ont été identifiés par homologie de séquence avec des sites fonctionnels connus dans d'autres promoteurs).

#### 1.9.1.2. Les sites EBS et AP-1. Le site TTCA.

Les sites **EBS** sont les cibles des facteurs de transcription de la famille Ets. Les promoteurs de la matrilysine, de la collagénase-1, de la stromélysine-1 et de la gélatinase B contiennent des sites EBS fonctionnels.

Dans le cas de la **stromélysine-1**, nous rapportons que **Ets2**, mais pas **Erg** (« gène se rapprochant de *ets* »), induit la transcription *via* un tandem inversé de sites EBS (-216 CAGGAAGC ACTTCCTG). De plus, Erg inhibe la transcription induite par Ets2 (§ 4.1). La stromélysine-1 a également été identifiée comme un gène cible de **EWS-Fli1** (Braun, et al., 1995). EWS-Fli1 est un facteur impliqué dans la majorité des sarcomes d'Ewing. Il résulte de la fusion par translocation chromosomique de la région N-terminale de EWS avec le DBD de Fli1, un membre de la famille Ets (May, et al., 1993).

Dans le cas de la **collagénase-1** humaine, le site EBS (-89 GAGGATGT) est voisin d'un site **AP-1** (-72 TGAGTCA). Les sites AP-1 sont les cibles des facteurs de la famille AP-1, comme par exemple le complexe **c-Fos / c-Jun**, également appelé complexe AP-1. L'expression de *c-fos* est nécessaire à la transcription de la collagénase-1, basale ou induite par d'autres oncogènes (*v-src*, *c-Ha-ras*, *v-mos*) ou par les esters de phorbol, dans les cellules NIH 3T3 (fibroblastes de souris immortalisés) (Schönthal, et al., 1988). Ces résultats suggèrent que la famille AP-1 joue un rôle essentiel dans l'induction du promoteur de la collagénase-1.

Une étude par mutation montre que le site AP-1 est nécessaire à l'activité induite par le TPA ou par des oncogènes. Le site EBS adjacent n'est pas nécessaire à l'inductibilité mais permet d'obtenir un niveau plus élevé. Cette paire de sites EBS-AP-1 constitue un site **TORU** (unité de réponse au TPA et à des oncogènes) (Gutman et Wasylyk, 1990).

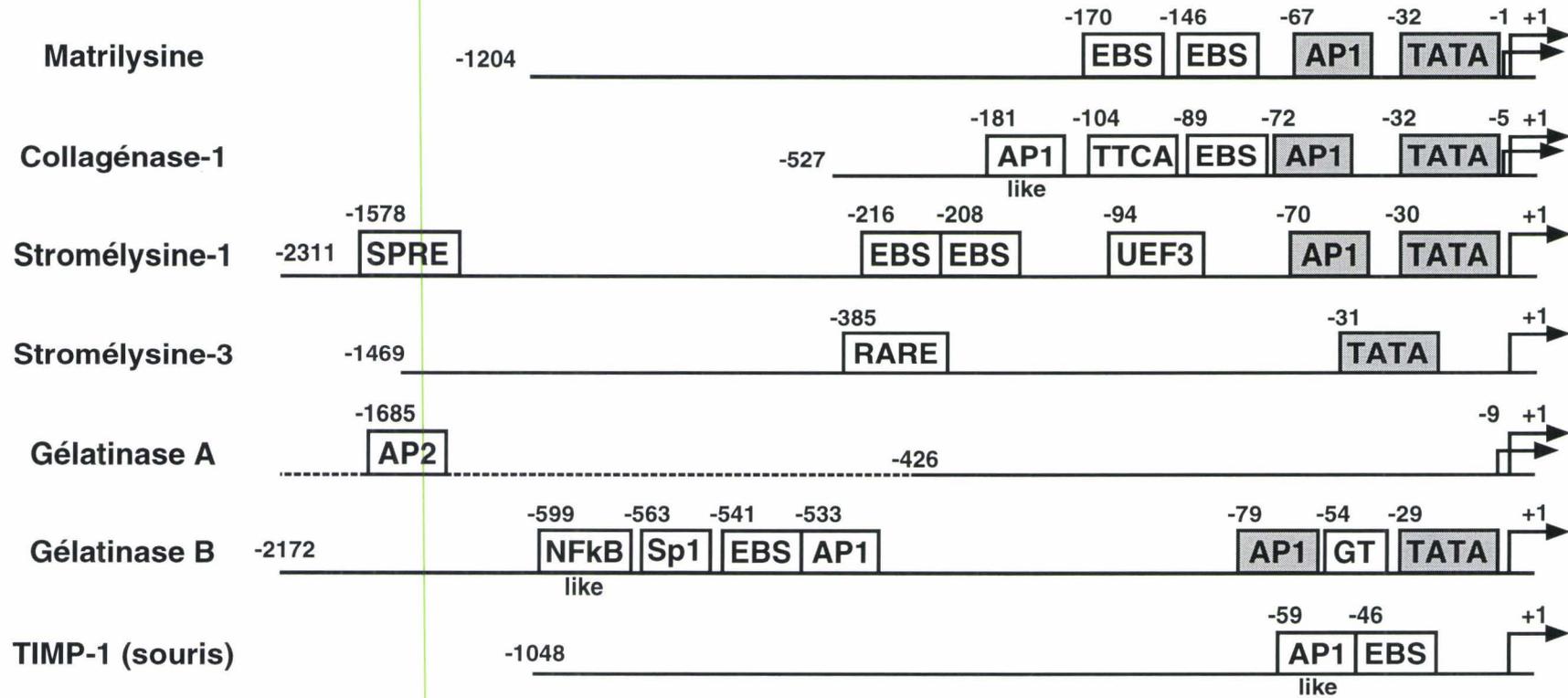


Figure 9A. Sites fonctionnels des promoteurs de quelques MMPs humains et de TIMP-1 murin.

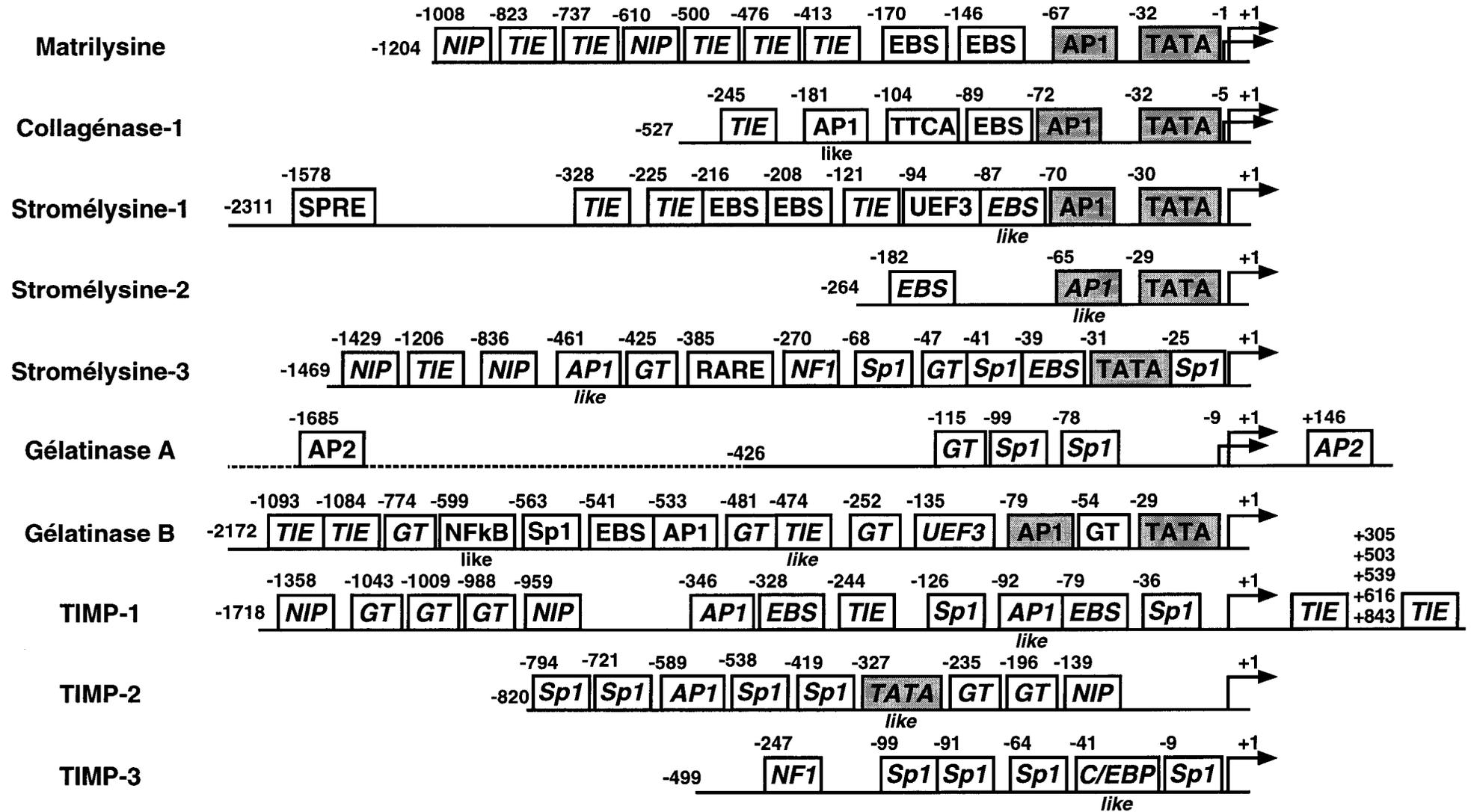


Figure 9B. Sites fonctionnels ou potentiels des promoteurs de quelques MMPs et TIMPs humains.

## Légende.

Les promoteurs sont représentés avec des sites cibles de facteurs de transcription, potentiels (en italique) ou fonctionnels (typographie normale). Les sites ont été mentionnés ou caractérisés dans des publications (références ci-dessous), ou ont été identifiés par recherche systématique. Les consensus utilisés dans cette recherche sont également indiqués. Ces consensus ont été définis dans des publications ou ont été déduits, avec un souci de simplicité mais pas d'exhaustivité, à partir de séquences fonctionnelles publiées. Certaines séquences sont particulièrement fréquentes et tous les sites potentiels correspondants ne peuvent pas être représentés. Les sites EBS, EBS like, AP-1 like, TIE like et UEF3/NIP, fonctionnels ou potentiels, ne sont indiqués que s'ils sont mentionnés dans une publication. Tous les sites AP-1, TIE, NIP, les cœurs Sp1 GGGCGG et les boîtes GT sont indiqués. Dans le promoteur de TIMP-2, des sites Sp1 ne contenant pas le cœur GGGCGG sont signalés par les auteurs de la séquence. Contrairement aux autres promoteurs, un EBS potentiel du promoteur de TIMP-1, identifié par recherche systématique, est indiqué. Les promoteurs des TIMPs 2 et 3 ne contiennent aucun EBS. Les promoteurs des TIMPs humains ne contiennent apparemment pas de boîte TATA vers (-30), mais TIMP-2 présente une boîte TATA like (-327).

## Définitions des séquences cibles.

AP-1 :	TGAGTCA (Angel, et al., 1987, Deutsch, et al., 1988, Ryseck et Bravo, 1991)
EBS :	(G/C)AGGA(A/T)(GT/GC/AT) ; n(G/C)GGG(A/T)(GT/GC/AT) (Wasylyk, et al., 1993)
SPRE :	ACTAGT (Sanz, et al., 1994)
TIE :	(G/A)nnTTGG(T/A)(G/A) (Kerr, et al., 1990, Gaire, et al., 1994, Matrisian, 1994)
Sp1 :	GGGCGG (ne recouvre pas toutes les séquences Sp1 potentielles) (Dyan et Tjian, 1983, Thiesen et Bach, 1990)
boîte GT :	GGGGTGGGG (Sato, et al., 1993)
UEF3/NIP :	TG(A/G)CAG (Berthelsen, et al., 1996)
NIP :	CTCACnTnC (Engeland, et al., 1995)
NKκB :	GGG(A/G)nnT(T/A/C)CC (Muller, et al., 1993)
site « like » :	site consensus avec modification(s) ponctuelle(s)

## Identification de sites dans les promoteurs.

Matrilysine :	TIE, EBS, AP-1 (Gaire, et al., 1994)
Collagénase-1 :	EBS, AP-1 (Angel, et al., 1987, Gutman et Wasylyk, 1990) AP-1 like (étudié dans le promoteur de lapin) (White et Brinckerhoff, 1995) TTCA (lapin) (Auble et Brinckerhoff, 1991, Pan, et al., 1992, White et Brinckerhoff, 1995) inhibition par le TGF-β (Edwards, et al., 1987)
Stromélysine-1 :	AP-1 (Butticè, et al., 1991) EBS (Butticè et Kurkinen, 1993) SPRE (Kirstein, et al., 1996) UEF3/NIP, EBS like (Sirum-Connolly et Brinckerhoff, 1991) NF-IL6, HMG (non représentés, voir § 4.1.2)
Stromélysine-2 :	AP-1 like (Sirum et Brinckerhoff, 1989)
Stromélysine-3 :	tous les sites sauf TIE et NIP (Anglard, et al., 1995)
Gélatinase A :	Sp1 (Matrisian, 1994) AP-2 (-1685) (Frisch et Morisaki, 1990) AP-2 (+146) (Huhtala, et al., 1990, Somasundaram, et al., 1996) (NB : la séquence en amont de -426 n'est pas publiée)
Gélatinase B :	paire EBS-AP-1 (Gum, et al., 1996) NKκB like, Sp1, AP-1, TIE like (Sato et Seiki, 1993) boîte GT (Sato, et al., 1993)
TIMP-1 :	AP-1 like-EBS (souris) (Edwards, et al., 1992, Logan, et al., 1996)
TIMP-2 :	AP-1, Sp1, AP-2, TATA like (DeClerck, et al., 1994)
TIMP-3 :	Sp1, NF1, C/EBP like (Wick, et al., 1995)

### Abréviations.

- AP-1 : protéine activatrice 1  
SPRE : élément de réponse au PDGF de la stromélysine-1  
TIE : élément d'inhibition TGF- $\beta$   
UEF : facteur de l'élément activateur de l'uPA (« *uPA enhancer factor* »)  
NIP : protéine nucléaire d'inhibition  
RARE : élément de réponse à l'acide rétinoïque

Les sites EBS et AP-1 du promoteur de la collagénase-1 sont nécessaires à l'induction par le facteur Erg qui interagit physiquement avec le complexe c-Fos / c-Jun (§ 4.1). Inversement, des promoteurs délétés de la collagénase-1 et de la stromélysine-1 contenant leur site AP-1 (-72 et -70) mais pas le site EBS (coll.-1, -89) ou le tandem EBS inversé (str.-1) ne sont pas induits par le complexe c-Fos / c-Jun. En présence des sites EBS et AP-1, une induction par c-Fos / c-Jun est observée (Butticè et Kurkinen, 1994).

Des membres spécifiques de la famille Ets régulent la collagénase-1 en coopération avec AP-1. Nous avons montré que **Erg** induit (x 20) le promoteur de la collagénase-1 (-610/+61) en cellules HepG2, ainsi que **Ets2** dans une moindre mesure (x 3.5). Erg est recruté sur le promoteur au niveau du site EBS (-89) par une interaction protéique avec le complexe **c-Fos / c-Jun** lié sur le site AP-1 voisin (-72) (§ 4.1). Un autre groupe a ensuite montré que **Ets1** induit (x 10) le promoteur de la collagénase-1 (3.8 kb) et stimule l'induction par le TPA (x 2.2), par **c-Jun** (x 2.3) ou par **JunB** (x 4), dans les fibroblastes NIH 3T3. **Fli1** et **PU.1**, deux membres de la famille Ets, n'ont pas d'effet significatif seuls. Fli1 augmente cependant l'induction par le TPA (x 2.2), par c-Jun (x 1.4), mais pas par JunB. Au contraire, PU.1 inhibe l'induction par le TPA (: 2.5, retour au niveau basal), par c-Jun ou JunB (: 2.3). Dans des cellules exprimant stablement PU.1, le promoteur de la collagénase-1 est moins actif et la liaison des facteurs c-Jun et JunB est plus faible (Westermarck, et al., 1997). Ces études montrent que 5 facteurs de la famille Ets régulent différemment le promoteur de la collagénase-1, selon une coopération ou un antagonisme avec AP-1.

Une étude par délétion montre que le site AP-1 (-77) du promoteur de la collagénase-1 de lapin est nécessaire au niveau basal, mais qu'il ne permet pas l'induction par le PMA dans une culture primaire de fibroblastes de lapin. Au contraire, un site EBS (-94), un site contenant la séquence **TTCA** (-109) et la région (-182/-149) participent efficacement à l'induction (Auble et Brinckerhoff, 1991, Pan, et al., 1992). Cette région contient un site **AP-1 like** (-186 TTAATCA) responsable de son activité (White et Brinckerhoff, 1995). Une étude moléculaire détaillée montre que **c-Fos** et **JunD** participent aux complexes qui lient les sites AP-1 et AP-1 like. **Fra-2**, un membre de la famille Fos, est détecté au niveau du site AP-1, mais pas sur le site AP-1 like. Nous notons que les sites AP-1 like et TTCA sont conservés identiquement chez l'homme (-181, -104), où leur fonctionnalité n'a pas été étudiée à notre connaissance. Au contraire, le promoteur de la collagénase-1 de souris (-660/+32) ne contient

pas de site TTCA vers -100 et aucun site AP-1 like semblable (recherche des séquences T(G/T)A(G/A/T)TCA).

Des résultats comparables ont été obtenus avec la **stromélysine-1**, en ce qui concerne l'expression basale et l'induction par les esters de phorbol. Deux études du promoteur humain par délétion et par mutation montrent que le tandem inversé de sites EBS (-216, -208), mais pas le site AP-1 (-70), est nécessaire à l'induction par le TPA dans une culture primaire de fibroblastes humains. Le tandem EBS est également la cible de l'induction par Ets2 (Butticè, et al., 1991, Butticè et Kurkinen, 1993). Le tandem EBS inversé et le site AP-1 sont conservés chez le rat (-205, -197, -71) et le lapin (-206, -198, -64), ce qui pourrait traduire leur importance fonctionnelle. La régulation des **stromélysines 1 et 2** par le TPA est spécifique des types cellulaires. Le TPA induit exclusivement les ARNm de la stromélysine-1 dans des fibroblastes humains gingivaux et la stromélysine-2 dans des kératinocytes de la peau (Windsor, et al., 1993). Cette spécificité pourrait s'expliquer par la différence de nombre et de position des sites EBS, ainsi que par la différence entre les sites AP-1 (str.-1, -70 TGAGTCA) et AP-1 like (str.-2, -65 TGAATCA).

Le promoteur de la **gélatinase B** contient également une paire EBS-AP-1 (-541, -533) qui participe à l'induction par *ras*, ainsi que le site NFκB like (-599) et une boîte GT (-54) (site susceptible d'être liée par des protéines Sp1) (Gum, et al., 1996). Le TPA et le TNF-α induisent le promoteur *via* un site AP-1 (-79) qui coopère avec le site NKκB like (-599) ou avec un site Sp1 (-563) (Sato et Seiki, 1993). Au contraire, le promoteur de la **gélatinase A** ne contient pas de site AP-1 et n'est pas inductible par le TPA (Frisch et Morisaki, 1990).

Chez la souris, le promoteur de **TIMP-1** présente une paire de sites fonctionnels AP-1 like (-59 TGAGTAA) et EBS (-46). Le site AP-1 like lie le complexe c-Fos / c-Jun ainsi que d'autres facteurs qui ne s'associent pas au site AP-1 de la collagénase-1 (Edwards, et al., 1992). Cette paire de sites permet une induction de la transcription par la coopération des facteurs AP-1 et Ets1 (Logan, et al., 1996). Nous remarquons que la région (-69/-31) est conservée chez l'homme en position (-102/-64), avec 38 bases identiques sur 39. L'activité de la paire homologue AP-1 like-EBS (-92, -79) du promoteur humain n'a pas été étudiée à notre connaissance.

Le promoteur de la **matrilysine** contient également un site AP-1 (-67). Ces 5 promoteurs contenant un site AP-1 ou AP-1 like en position (-72±7) ont également en commun avec la stromélysine-3 une boîte TATA, absente des autres promoteurs MMPs ou TIMPs présentés ici. Ces similitudes pourraient expliquer l'expression de plusieurs MMPs dans des situations semblables, par exemple en réponse à E1A-F (§ 1.9.1.3) ou à l'IL-1β (§ 1.9.2.2.2).

Ces résultats mettent en évidence des mécanismes de complémentarité ou d'interdépendance entre les sites AP-1 et EBS et entre des membres spécifiques des familles de facteurs de transcription AP-1 et Ets, dans l'induction de la transcription de plusieurs MMPs et de TIMP-1. D'autres exemples spécifiques d'interaction entre les familles AP-1 et Ets sont

connus au niveau transcriptionnel (§ 3.7.2.2). Dans deux cas des interactions protéiques ont été caractérisées, entre Elf1 et c-Jun (§ 3.7.3.5) et entre Erg et c-Fos / c-Jun (§ 4.2).

#### *1.9.1.3. Induction par E1A-F.*

La protéine E1A-F a été caractérisée à partir d'extraits nucléaires de cellules HeLa (lignée de carcinome du col de l'utérus) comme une activité se liant à l'élément activateur du gène E1A de l'adénovirus de type 5. E1A-F pourrait être l'homologue humain du facteur PEA3 de souris. Des tests de transactivation en culture cellulaire montrent que E1A-F induit les promoteurs de la **collagénase-1**, de la **stromélysine-1** et de la **gélatinase B**, dans les cellules MG63 (lignée d'ostéosarcome humain). C'est la première fois qu'une induction transcriptionnelle de ces 3 MMPs par un même membre de la famille Ets est rapportée. La délétion du site EBS de la collagénase-1 abolit l'activation par E1A-F. PEA3 et E1A-F induisent la collagénase-1 en coopération avec le complexe AP-1 (Higashino, et al., 1995).

La transfection de cellules MCF-7 (lignée non invasive de carcinome du sein), par E1A-F confère les propriétés d'invasion et de motilité et augmente l'expression de la gélatinase B. Par ailleurs, l'expression de E1A-F et de la gélatinase B est élevée dans plusieurs lignées tumorales (Kaya, et al., 1996).

Ces études indiquent que E1A-F est un facteur capable d'induire plusieurs MMPs et que cette induction semble importante en terme d'invasion tumorale.

#### *1.9.1.4. Le site SPRE.*

Le promoteur de la stromélysine-1 est à l'origine de la découverte du site **SPRE** (palindrome ACTAGT), un élément de réponse au PDGF (Sanz, et al., 1994). Des facteurs de croissance participent à l'activation mitogène des cellules dans le cancer et le PDGF contribue également à la transformation du phénotype en induisant l'expression de la stromélysine-1. Cette induction met en jeu une voie de signalisation originale, passant par la  $\zeta$ PKC (une PKC insensible au PMA), dont le site SPRE est la cible finale. Le site SPRE est la cible d'un nouveau facteur de transcription, la **SPBP** (« protéine liant le SPRE ») (Sanz, et al., 1995). La SPBP induit un promoteur minimal TK contrôlé par un site SPRE. Elle présente un domaine basique semblable au domaine liant l'ADN de Fos et Jun et un domaine potentiel de type leucine zipper. Le site SPRE (-1578) coopère avec le site AP-1 (-70) et la SPBP interagit physiquement avec **c-Jun**, mais pas avec c-Fos (Kirstein, et al., 1996).

Le site SPRE a été caractérisé en position (-1218) sur un promoteur stromélysine-1 (-1308/+66) (Quinones, et al., 1989) dans lequel l'inversion (-2311/-1482, Xba I / Sst I) et la délétion (-1482/-479, Sst I / Xba I) de deux fragments du promoteur sauvage (-2311/+66) ont été plus tard mises en évidence (Kirstein, et al., 1996). La position originelle du site SPRE est en réalité (-1578), dans la région inversée du promoteur utilisé pour caractériser ce site.

### 1.9.1.5. Le site TIE et l'inhibition par le TGF- $\beta$ .

Dans les cellules Rat-1 (fibroblastes embryonnaires de rat), le TGF- $\beta$  inhibe la transcription de la stromélysine-1 induite par l'EGF ou par les oncogènes *v-src* ou *Ki-ras* (Kerr, et al., 1988). Le promoteur de la **stromélysine-1 de rat** contient un site TIE (-709) nécessaire à l'inhibition par le TGF- $\beta$ . Ce site est spécifiquement lié par un complexe protéique contenant la protéine **c-Fos** (Kerr, et al., 1990).

Dans des cultures de fibroblastes humains, le TGF- $\beta$  induit l'expression de TIMP-1 en coopération avec des facteurs de croissance et réprime l'induction de la collagénase-1 (Edwards, et al., 1987). Dans des fibroblastes, le PMA induit l'expression des transcrits de la **collagénase-1**, de la **stromélysine-1**, de la **gélatinase B**, des **TIMPs 1 et 3**. Le TGF- $\beta$  réduit l'expression de ces MMPs et augmente celle des TIMPs (Edwards, et al., 1996).

Nous notons que les promoteurs de la collagénase-1 et de la gélatinase B contiennent également un ou plusieurs sites TIE potentiels, qui n'ont pas été étudiés fonctionnellement à notre connaissance. Le promoteur de la **matrilysine** contient également 5 sites TIE, positionnés entre (-823) et (-413).

*In vivo*, la matrilysine et les stromélysines sont impliquées dans la menstruation et sont exprimées respectivement dans les cellules épithéliales et stromales de l'endomètre. Durant la phase du cycle où la sécrétion de la progestérone domine, l'expression des MMPs est supprimée (§ 1.9.2.3.6). Le TGF- $\beta$  est sécrété par les cellules stromales en réponse à la **progestérone**. C'est le médiateur de l'inhibition de l'expression de la matrilysine dans les cellules épithéliales voisines (Osteen, et al., 1994, Bruner, et al., 1995). Les mécanismes transcriptionnels impliqués dans cette inhibition n'ont pas été étudiés à notre connaissance.

Une recherche systématique de paires de sites dans 23 promoteurs de MMPs, de TIMPs et de gènes du système du plasminogène nous a révélé que les paires EBS-TIE ou EBS-TIE like sont aussi fréquentes que les paires EBS-AP-1. Cette fréquence remarquable nous interroge sur la possibilité d'interactions entre ces sites et leur éventuelle signification dans la régulation de la transcription. Des facteurs Ets pourraient interagir physiquement au niveau de ces paires avec les facteurs liant le TIE, comme en particulier c-Fos dont nous savons qu'il est impliqué dans l'interaction de Erg avec le complexe c-Fos / c-Jun (§ 4.2). Cette question n'a pas été étudiée à notre connaissance. Les séquences que nous avons remarquées sont indiquées ci-dessous. Les cœurs des EBS sont en gras et les TIE sont soulignés.

Gélatinase A	rat		<u>GCATCCCTCCAAAGA</u> (répété 2 fois à 16 pb d'intervalle)
Gélatinase B	homme	-474	<u>GGTTTGGGGAGGATAT</u>
Stromélysine-1	homme	-225	<u>CTACCAAGACAGGAAGCACTTCCTG</u>
Stromélysine-1	rat	-109	<u>GAGTTGGTGAGTGGGAGAGCATCCTC</u>
uPA	homme	-2003	<u>TCTCCAAACCTCTTTGTCCAGGAGGAAAT</u>
uPA-R	homme	-1081	<u>GCTTCCCAAGCATTGGTGT</u>

#### *1.9.1.6. Les sites NIP et UEF3/NIP.*

La région NIP (« protéine nucléaire d'inhibition ») a d'abord été définie comme une région inhibitrice dans le promoteur de l'IL-3 (Mathey-Prevot, et al., 1990). Au moins 3 complexes protéiques différents lient cette région, mais seul l'un d'entre eux est corrélé à la répression. La mutagenèse du promoteur de l'IL-3 a permis de définir un site consensus **NIP** (CTCACnTnC) impliqué dans l'inhibition de ce promoteur (Engeland, et al., 1995).

Dans le cas de l'**uPA**, un site UEF3 fait partie d'une région COM nécessaire à la coopération d'un site AP-1 et d'une paire EBS-AP-1 dans l'induction du promoteur. Cette région contient des sites UEF1 à 4 qui sont tous nécessaires à la coopération. Une séquence TG(A/G)CAG présente dans les régions COM de l'uPA et NIP de l'IL-3 est reconnue par un complexe protéique UEF3 (Berthelsen, et al., 1996). Cette séquence est rapportée dans plusieurs publications sous les noms UEF3, NIP ou NIP like et nous la nommerons **UEF3/NIP**. Selon cette convention de langage, le promoteur de l'IL-3 contient un site NIP (-266) et un site UEF3/NIP (-258) qui se chevauchent (-266 **CTCACCTGC TGCCAT** -252).

Dans le cas de la **stromélysine-1**, un site UEF3/NIP (-94) coopère avec le site AP-1 (-70) dans l'induction par l'IL-1 ou le PMA (Sirum-Connolly et Brinckerhoff, 1991). Au total, 11 bases sont conservées entre la stromélysine-1 (-98 **CCTGC TGCCAT** -88) et la région NIP de l'IL-3. Nous notons également que les promoteurs de l'IL-3, de la stromélysine-1 et de l'uPA contiennent un site UEF3/NIP proche d'un site AP-1 et d'un site EBS ou EBS like, ce qui suggère des mécanismes régulateurs similaires.

#### *1.9.1.7. Boîte TATA versus sites Sp1.*

Contrairement aux autres promoteurs présentés ici, les promoteurs de la stromélysine-3, de la gélatinase A et des TIMPs 1, 2 et 3 ne présentent pas de boîte TATA vers (-30) et présentent plusieurs sites consensus Sp1, ce qui suggère un mécanisme régulateur qui leur serait commun. TIMP-3 a la particularité d'être régulé au cours du cycle cellulaire et atteint son maximum d'expression pendant la phase G1 (Wick, et al., 1994).

### **1.9.2. Autres mécanismes régulateurs.**

#### *1.9.2.1. Induction de la stromélysine-1 par la cycloheximide.*

Des inhibiteurs de la synthèse protéique (cycloheximide et anisomycine) induisent l'accumulation d'ARNm de la stromélysine-1 selon un facteur 20 dans 3 lignées cellulaires humaines, des fibroblastes et des cellules d'ostéosarcome. Cet effet n'est pas observé avec la collagénase-1. Une stabilisation des ARMm est observée selon un facteur 1.6. L'observation d'une stabilisation des ARMm selon un facteur nettement inférieur à leur taux d'accumulation permet de déduire que la transcription a été induite. Les auteurs proposent qu'un répresseur

protéique de demi-vie courte serait impliqué dans la régulation de la transcription de la stromélysine-1 humaine. Cette induction de la stromélysine-1 endogène n'est pas observée dans des cellules de rat ou de lapin (Otani, et al., 1990).

Il serait intéressant de déterminer si le site UEF3/NIP du promoteur de la stromélysine-1 peut être impliqué dans l'induction par la cycloheximide. Cette région est homologue d'une région inhibitrice du promoteur de l'IL-3 qui lie plusieurs complexes protéiques. Nous remarquons de plus que ce site UEF3/NIP (-94 CTGCCA) n'est conservé ni chez le rat (-91 - - - CA), ni chez le lapin (-85 GTGTCG) (nous nous référons à la publication (Quinones, et al., 1989) qui présente un alignement des promoteurs de l'homme, du rat et du lapin). Le promoteur de lapin (-702/+12) ne présente aucun site UEF3/NIP potentiel mais nous notons que le promoteur de rat (-1106/+1) en présente 5.

### ***1.9.2.2. Facteurs de croissance et cytokines.***

#### **1.9.2.2.1. Généralités.**

Les facteurs de croissance et les cytokines sont des molécules solubles qui permettent la communication entre cellules. Les facteurs de croissance induisent la prolifération cellulaire (facteurs mitogéniques), la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (facteurs angiogéniques), la migration et l'invasion (facteurs de motilité et de dispersion). Les cytokines interviennent dans les réponses inflammatoires et immunes. Des cytokines et des facteurs de croissance régulent plusieurs MMPs et TIMPs au niveau transcriptionnel (table 3).

#### **1.9.2.2.2. Régulation par l'IL-1 et le TNF- $\alpha$ .**

L'IL-1 $\alpha$  ou  $\beta$  et le TNF- $\alpha$  induisent le remaniement de la MEC en augmentant l'expression de plusieurs protéases (collagénase-1, stromélysine-1, gélatinases A et B, uPA). Ils inhibent également la synthèse de plusieurs composants de la MEC (collagènes I, II, III, XI, fibronectine) par des fibroblastes de la peau ou par des chondrocytes (Heino et Heinonen, 1990, Lefebvre, et al., 1990). Dans une autre étude sur des fibroblastes de la peau, les IL-1 $\alpha$  et  $\beta$  et les TNF- $\alpha$  et  $\beta$  inhibent la production de fibronectine, mais induisent le collagène et des glycosaminoglycanes ainsi que, dans un rapport 10 fois supérieur, la collagénase-1. Il en résulte une inhibition de production ou une dégradation de ces composants de la MEC (Duncan et Berman, 1989). Dans une autre étude, le TNF- $\alpha$  induit en 24 h l'accumulation d'ARMm codant la collagénase-1 (x 10) et TIMP-1 (x 3) dans des fibroblastes de la peau (Chua et Chua, 1990).

L'IL-1 $\beta$  induit la transcription de la stromélysine-1 dans des fibroblastes synoviaux de lapin (Frisch et Ruley, 1987). L'IL-1 $\beta$  induit la stromélysine-1, mais pas la collagénase-1, dans des fibroblastes de poumon humains (Yang et Kurkinen, 1994). L'IL-1 $\beta$  induit *in vitro* les ARMm de la stromélysine-1 et de la collagénase des neutrophiles dans des cartilages humains et provoque une dégradation semblable à celle observée dans l'arthrite. Fonctionnellement,

l'expression de la collagénase des neutrophiles et la dégradation de l'aggreccan dans les cartilages sont corrélées à la progression de l'arthrite (Chubinskaya, et al., 1996). L'IL-1 $\beta$  humaine induit les ARNm collagénase-3 dans des chondrocytes de cheval (Caron, et al., 1996).

	IL-1	TNF- $\alpha$	TGF- $\beta$	autres facteurs
<b>Matrilysine</b>	0	0	-/+	IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$ (-)
<b>Collagénase-1</b>	+	+	-/+	PDGF, bFGF, EGF, LR, LT (+) IFN- $\gamma$ , IL-6 (-/+), IL-4, IGF-I et II (-)
<b>Collagénase des neutrophiles</b>	+			
<b>Collagénase-3</b>	+	+	-/+	
<b>Stromélysine-1</b>	+	+	-	PDGF, EGF, LR (+), IFN- $\gamma$ (-)
<b>Gélatinase A</b>	0/+	0/+	0/+	
<b>Gélatinase B</b>	0/+	0/+	0/+	LT (+), IL-4, IFN- $\gamma$ (-)
<b>MT-MMP-1</b>	0	0/+	0	EGF, bFGF (0)
<b>TIMP-1</b>	-/0/+	-/0/+	+	IL-6 (+)
<b>TIMP-2</b>	0	0		
<b>TIMP-3</b>			+	

**Table 3.** Régulation des MMPs et des TIMPs par des facteurs de croissance et des cytokines.

Cette table rassemble les résultats présentés dans les publications (Mackay, et al., 1992, Mauviel, 1993) et les travaux cités dans les sections § 1.9.2.2.2-4. Les résultats obtenus dépendent des types cellulaires étudiés.

- : inhibition ; 0 : pas d'effet ; + : induction ; LR : leukoréguline ; LT : lymphotoxine ; IFN : interféron ; EGF : facteur de croissance de l'épiderme ; PDGF : facteur de croissance dérivé des plaquettes ; IGF : facteur de croissance semblable à l'insuline.

L'IL-1 $\beta$ , ainsi que le PMA, active la PKC cytoplasmique et induit le facteur AP-1, ce qui pourrait expliquer l'induction concomitante des promoteurs de la collagénase-1, de la stromélysine-1 et de TIMP-1 dans des fibroblastes synoviaux (DiBattista, et al., 1995). Dans une autre étude sur des fibroblastes synoviaux, les IL-1 $\alpha$  et  $\beta$  et le TNF- $\alpha$  induisent la stromélysine-1, mais pas TIMP-1 (MacNaul, et al., 1990). Dans une troisième étude, l'IL-1 $\beta$  inhibe la production de TIMP-1 par des cellules endothéliales mais l'augmente chez des

fibroblastes synoviaux et des chondrocytes. Le TNF- $\alpha$  l'inhibe et l'IL-6 l'augmente dans ces 3 types cellulaires (Shingu, et al., 1993).

En ce qui concerne la matrilysine, une régulation par plusieurs cytokines a été mise en évidence dans une culture de phagocytes mononucléaires humains (Busiek, et al., 1995) (table 3).

Le TNF- $\alpha$  induit l'expression de la MT-MMP-1 dans une culture de fibroblastes synoviaux. La MT-MMP-1 participe à l'activation de la pro-gélatinase A (constitutivement exprimée par ces cellules) induite par le TNF- $\alpha$  (Migita, et al., 1996). Une autre étude rapporte une induction des ARNm MT-MMP-1 par le TNF- $\alpha$  dans les cellules HT1080 (lignée de fibrosarcome humain), mais pas dans des fibroblastes embryonnaires de poumon (Lohi, et al., 1996).

En conclusion, l'IL-1 et le TNF- $\alpha$  régulent les MMPs et les TIMPs d'une manière diversifiée. Le plus souvent, cette régulation induit la dégradation de la MEC.

#### 1.9.2.2.3. Induction de la stromélysine-1 par l'IL-1.

Les éléments du promoteur de la stromélysine-1 humaine impliqués dans l'induction par l'IL-1 ont été étudiés dans les cellules HepG2 (lignée d'hépatocarcinome humain) et dans une culture primaire de fibroblastes de la peau humains. Dans les cellules HepG2, la mutation du site **AP-1** (-70) diminue le niveau basal et supprime l'effet inducteur de l'IL-1. Dans les fibroblastes, au contraire, le niveau basal diminue mais l'effet inducteur (x 4-5) est conservé.

Dans les fibroblastes, la région (-86/-54) suffit pour obtenir l'induction par l'IL-1. Un test de protection à la DNase montre que cette région lie des protéines nucléaires au niveau des domaines (-73/-62, site AP-1) et (-85/-75) (Quinones, et al., 1994). La séquence (-83 ATGAAAGCAAG -73) est homologue à l'**élément A** du promoteur de l'haptoglobine (ATGAA - GCAAG). Il est remarquable que l'élément A ait été identifié comme un élément de réponse à l'IL-1 (Baumann, et al., 1990).

L'activité différente du site AP-1 dans l'induction de la stromélysine-1 par l'IL-1, dans les cellules HepG2 et dans des fibroblastes, suggère l'implication de facteurs spécifiques dans ces types cellulaires.

#### 1.9.2.2.4. Régulation par le TGF- $\beta$ .

Le TGF- $\beta$  induit la transcription de la collagénase-1 dans des kératinocytes de la peau mais l'inhibe dans des fibroblastes de la peau. Cet effet différentiel s'expliquerait par l'induction de **c-jun** (induction) ou de **junB** (inhibition) (Mauviel, et al., 1996). Le TGF- $\beta$  induit la transcription de la collagénase-3 dans les kératinocytes HaCaT, mais l'inhibe dans des ostéoblastes et réduit la stabilité de ses ARMm (Johansson, et al., 1997, Rydziel, et al., 1997). Des sites TIE (§ 1.9.1.5) dans les promoteurs de la matrilysine et de la stromélysine-1 seraient la cible de l'inhibition par le TGF- $\beta$ . Le TGF- $\beta$  supprime l'expression de la matrilysine dans des

cellules épithéliales de l'endomètre, mais la stimule dans 2 lignées (sur 5 étudiées) de cellules de gliome humain (tumeur du système nerveux central) (Nakano, et al., 1993).

Dans des fibroblastes gingivaux, le TGF- $\beta$  induit la transcription de la gélatinase A et stabilise ses transcrits. Il inhibe la transcription de la collagénase-1 et induit celle de TIMP-1 (Overall, et al., 1991). Un autre groupe a montré que le TGF- $\beta$  induit la transcription des gélatinases A et B dans des kératinocytes humains, mais pas dans des kératinocytes de rat ni dans des fibroblastes gingivaux humains (Salo, et al., 1991). Le TGF- $\beta$  induit la sécrétion de TIMP-1 par des fibroblastes humains de la peau ou synoviaux (Wright, et al., 1991). Il induit la transcription de TIMP-3 dans des chondrocytes bovins et humains (Su, et al., 1996).

Le TGF- $\beta$  induit l'expression des gélatinases A et B et de TIMP-1 dans les cellules HT1080. L'**activité collagénolytique** dans le milieu de culture s'en trouve globalement **réduite** ainsi que la capacité invasive de ces cellules. Ces résultats suggèrent que le TGF- $\beta$  pourrait jouer un rôle inhibiteur dans l'invasion tumorale en induisant l'expression de TIMP (Kubota, et al., 1991).

Le TGF- $\beta$  inhibe également l'expression de l'**uPA** et induit le **PAI** (inhibiteur des activateurs du plasminogène) dans les trophoblastes lors de l'implantation du blastocyste (Graham, 1997). Il induit l'expression de composants de la MEC (**collagènes I, III, fibronectine**) par des fibroblastes de la peau ou gingivaux (Heino et Heinonen, 1990, Overall, et al., 1991). Ces processus concourent à la construction de la MEC.

Cependant, l'action du TGF- $\beta$  sur le système du plasminogène dépend du type cellulaire. Le TGF- $\beta$  stimule l'expression de l'uPA dans des fibroblastes synoviaux (Hamilton, et al., 1991).

En conclusion, la régulation des protéases extracellulaires et de leurs inhibiteurs par le TGF- $\beta$  dépend largement des types cellulaires.

### *1.9.2.3. Régulation par les récepteurs nucléaires.*

#### *1.9.2.3.1. La super-famille des récepteurs nucléaires.*

Les hormones lipophiles (stéroïdes, rétinoïdes, hormones thyroïdiennes et vitamine D<sub>3</sub>) sont des régulateurs du développement, de la différenciation cellulaire et du métabolisme. Elles sont les ligands de la super-famille des récepteurs nucléaires. Les récepteurs nucléaires sont caractérisés par un domaine central liant l'ADN (DBD) composé de deux doigts de zinc et par un domaine C-terminal de liaison du ligand (LBD). Une fois lié au ligand, le LBD place le récepteur dans un état transcriptionnellement actif. Les récepteurs nucléaires peuvent alors reconnaître des sites spécifiques de l'ADN et induire la transcription. Ils sont également impliqués dans la répression de la transcription induite par le complexe AP-1 ou par d'autres facteurs de transcription. Contrairement à la transactivation, les mécanismes connus de transrépression ne mettent pas en jeu de sites propres aux récepteurs nucléaires.

La super-famille est constituée de 4 classes. La classe I regroupe les récepteurs des stéroïdes, c'est-à-dire le récepteur de la cortisone et des glucocorticoïdes (GR), le récepteur des œstrogènes (ER), le récepteur de la progestérone (PR), le récepteur des androgènes (AR) et le récepteur minéralocorticoïde de l'aldostérone (MR). Les récepteurs de la classe I lient l'ADN en homodimères. La classe II regroupe les récepteurs qui s'hétérodimérisent avec les RXRs, comme par exemple les RARs ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) qui lient l'acide rétinoïque (RA) tout-trans ou les récepteurs des hormones thyroïdiennes ( $T_3R$ ). La classe III regroupe des récepteurs qui s'homodimérisent, comme les RXRs ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) qui lient le RA 9-cis. Les récepteurs de la classe IV lient l'ADN en monomères. Des récepteurs nucléaires orphelins, principalement dans les classes III et IV, n'ont pas de ligands connus (Mangelsdorf, et al., 1995).

Alors que les facteurs AP-1 sont impliqués dans la prolifération cellulaire, les récepteurs nucléaires sont au contraire des régulateurs de programmes de différenciation. Ces deux familles interagissent au niveau transcriptionnel, principalement par des interactions protéiques directes qui sont le plus souvent inhibitrices (Pfahl, 1993). Nous allons voir que plusieurs MMPs et TIMPs sont régulés par les récepteurs nucléaires, selon différents mécanismes impliquant AP-1.

#### 1.9.2.3.2. Inhibition par les glucocorticoïdes et le GR.

Plusieurs études montrent que la dexaméthasone inhibe l'expression, basale ou induite, de la **collagénase-1** (Jonat, et al., 1992, König, et al., 1992), de la **stromélysine-1** (Frisch et Ruley, 1987, Offringa, et al., 1988), des **gélatinases A et B** et des **TIMPs 1, 2 et 3** (Shapiro, et al., 1991, Kylmaniemi, et al., 1996, Su, et al., 1996), dans différents types cellulaires. Nous ne connaissons pas d'étude qui examine directement la régulation de l'activité protéolytique extracellulaire résultant de l'inhibition simultanée de MMPs et de TIMPs par les glucocorticoïdes. Les propriétés anti-inflammatoires et anti-promoteur tumoral de la dexaméthasone suggèrent néanmoins une réduction de l'activité protéolytique. La dexaméthasone contrôle également le système du plasminogène en inhibant l'expression de l'**uPA** et du **tPA** et en induisant le **PAI-1**.

Nous notons également que l'hydrocortisone inhibe chez le poulet la formation des plumes et induit une accumulation de collagène. *In vivo*, le traitement par l'hydrocortisone s'accompagne d'une baisse des ARMm codant la **p68<sup>c-ets1</sup>** et la **gélatinase A** et d'une élévation des ARMm **p54<sup>c-ets1</sup>** et **c-jun**. Il n'a pas été déterminé si le promoteur de la gélatinase A du poulet présente des sites EBS et s'il serait inductible par la **p54<sup>c-ets1</sup>** (Turque, et al., 1997).

#### 1.9.2.3.3. Régulation par les rétinoïdes, les RARs et RXRs.

Le promoteur de la **stromélysine-1** est inhibé par les rétinoïdes *via* le site AP-1 (-70) (Nicholson, et al., 1990). Il n'a pas été mis en évidence de liaison d'un RAR à ce site, ce qui suggère une interaction physique avec un complexe AP-1 (interaction directe) ou avec un cofacteur de AP-1 (interaction indirecte).

Les rétinoïdes inhibent la transcription de la **collagénase-1** dans les cellules HIG82 (lignée de fibroblastes synoviaux de lapin). Il semble que **AP-1** soit la cible de cette inhibition (§ 1.9.2.3.4). Toutefois, un site **TTCA** (-106, chez le lapin) est nécessaire à l'inhibition par l'acide rétinoïque. Il est également l'un des éléments impliqués dans l'induction par le PMA (§ 1.9.1.2). Lorsqu'il est muté, on observe d'une manière inattendue une synergie en présence de RA et de PMA (Pan, et al., 1992). Au contraire, dans le cas particulier d'une culture primaire d'ostéoblastes de rat foetal ou d'une culture d'ostéoblastes d'ostéosarcome de rat, les RAs tout-trans, 9-cis et 13-cis induisent la transcription de la collagénase-1 (x 13-20) et la stabilisation de ses ARMm (Connolly, et al., 1994, Varghese, et al., 1994, Overall, 1995).

Le promoteur de la **stromélysine-3** présente un site RARE du type DR1 (« répétition directe 1 », -385 AGGTCA G AGGTCA). Ce site permet l'induction du promoteur dans des fibroblastes par les RARs et RXRs en présence de RA 9-cis ou tout-trans. Des rétinoïdes spécifiques permettent d'inhiber le promoteur de la collagénase-1 sans induire la stromélysine-3. De tels produits sont des agents thérapeutiques potentiels dans le traitement des cancers (Anglard, et al., 1995, Guerin, et al., 1997).

Le RA tout-trans induit l'expression d'ARNm et de protéines **TIMP-1** dans des fibroblastes humains de la peau ou synoviaux (Overall, 1995, Bigg et Cawston, 1996). Au contraire, il inhibe la transcription de TIMP-1 dans des ostéoblastes, sans affecter la stabilité des ARNm (Overall, 1995).

L'action de l'acide rétinoïque sur le système du plasminogène semble fonctionnellement différente. Dans des cellules d'origine épithéliale, fibroblastique ou promyélocytaire, l'acide rétinoïque induit l'expression de l'**uPA** ou du **tPA**. Il augmente l'activation du plasminogène à la surface cellulaire.

L'acide rétinoïque a donc la propriété d'induire selon une spécificité de type cellulaire des activités susceptibles de concourir à la génération ou au contraire, dans le cas des ostéoblastes, à la résorption de la MEC. Il est par ailleurs connu que les rétinoïdes induisent des lésions des ligaments et de l'os (Zelger, et al., 1990).

#### 1.9.2.3.4. GR, RARs, RXRs : des antagonistes de AP-1.

Les propriétés anti-inflammatoires des glucocorticoïdes mettent en jeu à la fois la transactivation et la transrépression de différents gènes cibles codant des cytokines, des molécules d'adhésion et des protéases (Cato et Wade, 1996). La fixation d'un ligand sur le **GR** est nécessaire à sa nucléarisation, un prérequis pour la transactivation et la transrépression. Selon les cofacteurs impliqués, la transrépression procède par une liaison compétitive du GR sur un site cis-activateur ou par la liaison du GR à un facteur de transcription qui se trouve inhibé (AP-1, NFκB). Dans le cas de la transcription induite par AP-1, une liaison directe du GR avec **c-Fos** ou avec **c-Jun** a été observée par coimmunoprécipitation. L'interaction entre le GR et AP-1 inhibe mutuellement leur liaison à l'ADN (Yang-Yen, et al., 1990). Le GR peut au contraire coopérer spécifiquement avec l'homodimère c-Jun / c-Jun dans l'induction de gènes

contrôlés par AP-1 (Teurich et Angel, 1995). Par ailleurs, le GR inhibe ( : 3-4) la transcription du gène *c-fos* induite par le sérum en liant deux sites dans le SRE, compétitivement aux facteurs inducteurs SRF et Elk1 (§ 2.10.5.1.1). Leurs séquences, (-302 TGTCCT -307) et (-323 ACAGGATGTCCA), sont semblables au consensus de l'élément de réponse aux glucocorticoïdes (GRE : GTACAnnnTGT(T/C)CT) (Karagianni et Tsawdaroglou, 1994). Ce mécanisme pourrait également contribuer à l'inhibition de l'expression de plusieurs MMPs.

Les récepteurs **RARs et RXRs** induisent la transcription en réponse à leur ligands en se liant à un site appelé RARE. Ils peuvent aussi inhiber la transcription induite par le complexe AP-1. Les RARs ne lient pas le site AP-1 *in vitro* (Nicholson, et al., 1990). Le RA tout-trans inhibe en 2 h *via* le site SRE la transcription du gène *c-fos* induite par le sérum ou le PMA et inhibe en 16 h l'expression induite de *c-jun*, dans des cellules de mélanome (Busam, et al., 1992). D'autres études ont également montré que les rétinoïdes induisent une baisse des ARNm *c-fos* et *c-jun*, une augmentation des ARNm **RAR** et la liaison des dimères RAR / RXR au complexe AP-1 par une interaction directe avec **c-Jun**. Ces mécanismes pourraient concourir à l'inhibition de la transcription de la collagénase-1 (Wolf, 1992, Schroen et Brinckerhoff, 1996, Vincenti, et al., 1996).

L'acide rétinoïque induit la liaison de protéines nucléaires sur des oligonucléotides contenant un site AP-1 ou correspondant à la région (-182/-141) du promoteur de la collagénase-1 de lapin (Pan, et al., 1992, Pan, et al., 1995). Nous remarquons que cette région (-182/-141) chevauche un site AP-1 like (-186 TTAATCA) fonctionnel (§ 1.9.1.2), ce qui suggère à nouveau la possibilité d'interactions avec un facteur AP-1.

Ces études montrent que les récepteurs nucléaires GR, RARs et RXRs sont des antagonistes de AP-1. Ils inhibent l'activité des facteurs de transcription c-Fos et c-Jun déjà présents dans le noyau et peuvent également inhiber l'expression des gènes *c-fos* et *c-jun*. Ces mécanismes pourraient concourir à l'inhibition de l'expression des MMPs inductibles *via* AP-1.

#### 1.9.2.3.5.Des récepteurs nucléaires ciblent un cofacteur d'AP-1.

Un autre mécanisme d'inhibition de l'activité AP-1, qui serait commun à plusieurs récepteurs nucléaires, a été mis en évidence. L'inhibition par les récepteurs nucléaires d'un promoteur contrôlé par un site AP-1 est apparemment le résultat d'une compétition pour une quantité limitée de **CBP** (protéine liant CREB, 265 kDa, § 5.2.2) ou de son homologue **p300**. CBP et p300 interagissent directement *in vitro* et *in vivo* avec le LBD de plusieurs récepteurs nucléaires (**ER**, **T<sub>3</sub>R**, **RAR**, **RXR**), par les régions CBP(1-101) et p300(1-117), et avec les coactivateurs p160 des récepteurs nucléaires, par les régions CBP(2058-2163) et p300(2042-2157). L'inhibition de l'activité AP-1 par les récepteurs **RAR** et **GR** est abolie par la surexpression de CBP (Kamei, et al., 1996).

#### 1.9.2.3.6. Les œstrogènes, la progestérone, l'ER et le PR.

Les MMPs et TIMPs participent au cycle menstruel et à son arrêt, ainsi qu'au contrôle de la dilatation du col. Une étude par hybridation *in situ* montre que la matrilysine est exprimée dans les cellules épithéliales. Les autres MMPs sont exprimées dans les cellules stromales. La matrilysine et la stromélysine-3 sont exprimées pendant la phase proliférative du cycle, caractérisée par un taux d'œstradiol croissant et l'absence de progestérone (jours 1-14). Pendant la période d'implantation, les taux d'œstradiol et de progestérone sont élevés et l'expression des MMPs est inhibée. La chute des taux d'œstradiol et de progestérone pendant la phase menstruelle s'accompagne d'une expression de la matrilysine et des stromélysines 1, 2 et 3 à un niveau maximal (jours 27-28) (Osteen, et al., 1994, Rodgers, et al., 1994).

Des études *in vitro* montrent que la progestérone et les œstrogènes régulent l'expression des MMPs et des TIMPs dans des cellules de l'endomètre et du col. Dans la plupart des cas, la progestérone inhibe l'expression de la **collagénase-1** et de la **stromélysine-1** et induit celle des **TIMPs 1 et 2** (table 4).

La régulation des MMPs par les stéroïdes est parfois indirecte, par l'induction d'un facteur de croissance. La progestérone inhibe l'expression de la **matrilysine** dans les fibroblastes et dans les cellules épithéliales de l'endomètre. L'inhibition dans les cellules épithéliales est médiée par une sécrétion de **TGF- $\beta$**  par les fibroblastes (Nakano, et al., 1993). L'inhibition de l'expression des MMPs par les stéroïdes dans les fibroblastes pourrait procéder par le ciblage de **CBP**, un coactivateur de **AP-1** (§ 1.9.2.3.5).

Il est également remarquable que la stimulation de la production de **collagénase-1** dans une culture primaire de cellules cervicales par le 17  $\beta$ -œstradiol soit bloquée par un inhibiteur de la **PKC** (« protéine kinase C », figure 10, page 86) (Rajabi, et al., 1992).

Le traitement de femelles de rats par l'œstradiol augmente le niveau des ARNm de **c-jun**, **junB** et **junD**, avec un maximum après 3 h. Cet effet est spécifique des stéroïdes œstrogéniques.

Ces études montrent que l'induction de membres de la famille AP-1, ou leur inhibition par ciblage du coactivateur CBP, pourrait participer à la réponse de l'utérus aux hormones stéroïdes.

#### 1.9.2.3.7. Inhibition par les androgènes et l'AR. Facteurs Ets.

Les androgènes inhibent l'expression de la **matrilysine**, de la **collagénase-1** et de la **stromélysine-1** dans les cellules LNCaP (lignée d'un carcinome de la prostate humain). Une analyse par délétion montre que la région (-73/+63) du promoteur de la collagénase-1, contenant le site AP-1 (-72) mais pas le site EBS (-89), ne peut pas médier l'inhibition par l'AR dans les cellules de singe CV-1. Au contraire, des constructions contenant à la fois les sites EBS et AP-1 sont inhibées par l'AR.

Cellules (c) ou tissu (t)	Œstrogènes				Progestérone					Références
	Coll.-1	Str.-1	TIMP-1	TIMP-2	Matr.	Coll.-1	Str.-1	TIMP-1	TIMP-2	
col (c)	+					+				Rajabi, et al., 1991
col (c)	+									Rajabi, et al., 1992
col (c)	-	-	+			-	-	+		Sato, et al., 1991
col (c)								+	+	Imada, et al., 1994
endomètre (c)							-			Schatz, et al., 1994
endomètre (c,t)					-		-			Osteen, et al., 1994
endomètre (c)					-					Bruner, et al., 1995
endomètre (t)	-					-				Marbaix, et al., 1995
endomètre (t)			-	-				-	+	Hampton, et al., 1995
myomètre (c)						-				Jeffrey, et al., 1990

**Table 4.** La progestérone et les œstrogènes régulent l'expression de plusieurs MMPs et TIMPs dans l'utérus (endomètre, myomètre, col).

La régulation de l'expression des ARMs ou des protéines a été étudiée en culture cellulaire, en culture de tissu ou par analyse de tissus d'animaux traités par une hormone. Les cellules en culture de l'endomètre et du col sont des fibroblastes.

- : inhibition ; + : induction.

L'induction du promoteur par la surexpression de facteurs de la famille Ets (**Ets1**, **PEA3**, **ERM**) est inhibée par la surexpression de l'AR, dans les cellules DU145 (lignée d'un carcinome de la prostate humaine). *In vitro*, ERM est lié par la moitié C-terminale de l'AR qui contient le DBD et le LBD. L'inhibition nécessite cependant la moitié N-terminale de l'AR.

Cette étude ne permet pas de distinguer directement si l'inhibition par l'AR cible uniquement un facteur Ets ou une association Ets / AP-1. Elle montre néanmoins que la répression de l'activité induite par ERM est spécifique de l'AR et n'est pas obtenue avec deux autres récepteurs d'hormones stéroïdes, le GR et le MR (Schneikert, et al., 1996). L'inhibition de la transcription de plusieurs MMPs par le GR procéderait au contraire par le ciblage d'AP-1 (§ 1.9.2.3.2-4-5)

#### 1.9.2.4. Régulation des MMPs par les intégrines et la MEC.

##### 1.9.2.4.1. Régulation des MMPs via les intégrines.

Les intégrines constituent l'une des familles de molécules d'adhésion. Cette famille semble particulièrement importante dans la migration des cellules et dans la signalisation intracellulaire dépendante de l'adhérence (Garratt et Humphries, 1995). L'hétérodimérisation d'une des 16 sous-unités  $\alpha$  avec l'une des 8 sous-unités  $\beta$  permet la composition d'au moins 22 récepteurs fonctionnels qui reconnaissent des composants de la MEC. La sous-unité  $\beta 1$  est la plus fréquente et participe à la formation de 10 récepteurs différents. Les intégrines  $\alpha 1\beta 1$  et  $\alpha 2\beta 1$  sont les principaux récepteurs du collagène. Les intégrines semblent contribuer à

**l'invasion tumorale** en agissant à la fois sur la **migration** et sur l'expression de plusieurs MMPs (Heino, 1996) (table 5).

Cellules	Intégrine	Inducteur	Coll.-1	Str.-1	Gél. A	Gél. B	Références
sarcome ostéogénique humain	$\alpha 2\beta 1$	collagène I	+				Riikonen, et al., 1995
kératinocytes humains	$\alpha 3\beta 1$	anti- $\alpha 3$ ; anti- $\beta 1$			0	+	Larjava, et al., 1993
fibroblastes synoviaux de lapin	$\alpha 4\beta 1$	région CS-1 de la fibronectine	-	-		-	Huhtala, et al., 1995
fibroblastes synoviaux de lapin	$\alpha 5\beta 1$	anti- $\alpha 5\beta 1$ ; région RGD de la fibronectine	+	+		+	Werb, et al., 1989 Damsky, et al., 1992 Huhtala, et al., 1995
mélanome humain	$\alpha V\beta 3$	vitronectine ; anti- $\alpha V\beta 3$			+		Seftor, et al., 1992
fibroblastes synoviaux de lapin	?	collagène II	+	0			Yang, et al., 1994
fibroblastes synoviaux de lapin	?	ténascine associée à la fibronectine	+	+		+	Tremble, et al., 1994

**Table 5.** L'activation des intégrines régule l'expression de la collagénase-1, de la stromélysine-1 et des gélatinases A et B.

Des études en culture cellulaire montrent que l'exposition de cellules à des composants de la MEC, ou à des anticorps monoclonaux dirigés contre des intégrines, induit ou inhibe l'expression de plusieurs MMPs (observation des ARNm et/ou des protéines). Ces résultats mettent en évidence des voies de signalisation qui passent par les intégrines et qui participent à la régulation de l'activité protéolytique extracellulaire.

- : inhibition ; 0 : pas d'effet ; + : induction.

La culture de cellules dans un gel de collagène induit l'expression de la collagénase-1 dans la plupart des types cellulaires (Grinnell, 1994). Dans des cellules de sarcome ostéogénique humain, cette induction est médiée par l'intégrine  $\alpha 2\beta 1$ . Lors de la **réparation des blessures**, les kératinocytes expriment la collagénase-1 lorsqu'ils sont en contact avec le collagène I, mais pas en présence d'une membrane basale intacte (Saarialho-Kere, et al., 1993).

Dans des fibroblastes synoviaux de lapin, l'intégrine  $\alpha 4\beta 1$  activée inhibe l'expression de la collagénase-1, de la stromélysine-1 et de la gélatinase B, alors que l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  activée les stimule. Ces intégrines reconnaissent deux régions différentes de la fibronectine. L'induction de ces MMPs est obtenue en présence d'un fragment de fibronectine, mais pas en présence de la fibronectine native. En principe, ce mécanisme inducteur de MMPs pourrait contribuer à accélérer une dégradation de la MEC déjà initiée.

Le traitement de kératynocytes humains par des anticorps anti- $\alpha 3$  ou anti- $\beta 1$  induit l'expression de la gélatinase B, contrairement à des anticorps dirigés contre d'autres intégrines. Ces observations suggèrent une induction via l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$ .

Dans des cellules de mélanome humain, la gélatinase A est induite *via* l'intégrine  $\alpha V\beta 3$ .

Dans une culture de fibroblastes de poumon humains à faible concentration en sérum, le collagène II induit les ARNm de la collagénase-1, mais pas ceux de la stromélysine-1. C'est un nouvel exemple de régulation différentielle de ces deux MMPs.

Le dépôt de fibroblastes synoviaux de lapin sur une matrice constituée d'un mélange de fibronectine et de ténascine induit l'expression de la collagénase-1, de la stromélysine-1 et de la gélatinase B. L'ajout de ténascine dans le milieu de culture de cellules déposées sur une matrice de fibronectine est sans effet. L'activité de la ténascine et de la fibronectine nécessite donc leur association directe. De plus, l'induction est supprimée par un anticorps dirigé contre le domaine de la ténascine qui interagit avec la fibronectine et avec la cellule.

#### 1.9.2.4.2. Induction de la collagénase-1 *via* la paire EBS-AP-1.

Une étude par délétion du promoteur de la collagénase-1 humaine (-1200/-42) fusionné à un promoteur minimal TK montre que la région (-139/-67), qui contient la paire de sites EBS-AP-1, est la cible de l'induction par un **fragment RGD de la fibronectine** (contenant la séquence RGD, arginine-glycine-acide aspartique), dans une culture de fibroblastes synoviaux de lapin. La mutation du site EBS ou du site AP-1 supprime l'induction. La protéine **c-Fos** s'accumule dans les noyaux 1 h après le dépôt des cellules sur une matrice de fragments de fibronectine (Tremble, et al., 1995). Ces observations suggèrent que l'induction de la collagénase-1 par le récepteur  $\alpha 5\beta 1$  de la fibronectine utilise une voie de transduction qui met en jeu des facteurs de transcription des familles Ets et AP-1, en particulier c-Fos.

La protéine c-Fos s'accumule également 1 h après le dépôt des fibroblastes sur une matrice constituée d'une association **ténascine / fibronectine** (Tremble, et al., 1994).

#### 1.9.2.5. Induction de MMPs par SPARC.

SPARC (« protéine sécrétée acide et riche en cystéine ») est une glycoprotéine associée à la MEC, exprimée dans plusieurs tissus lors du **développement**. Elle contient des domaines qui lient d'une manière indépendante les composants de la MEC et les cellules. Elle peut rompre les contacts cellule-matrice et est appelée **anti-adhésine**. De plus, elle lie la chaîne B du PDGF et affecte la réponse cellulaire à plusieurs cytokines (Lane et Sage, 1994). Elle est impliquée dans l'**angiogenèse**, en conjonction avec des facteurs angiogéniques (Jendraschak et Sage, 1996). Elle intervient également dans la **réparation des blessures** et le **cancer** (Reed et Sage, 1996). Une étude par dosage d'ARNm et par hybridation *in situ* montre que la stromélysine-3 et SPARC sont surexprimés dans des tumeurs colorectales et dans leurs métastases hépatiques. Les transcrits sont détectés dans les cellules stromales adjacentes aux cellules néoplasiques (Porte, et al., 1995).

SPARC induit la sécrétion de **collagénase-1**, de **stromélysine-1** et de la **gélatinase B**, dans une culture de fibroblastes synoviaux de lapin. L'expression des ARNm collagénase-1 est induite par SPARC quand les cellules sont cultivées sur les collagènes I, II, III et V, sur la vitronectine ou sur une MEC de cellules de muscle lisse, mais pas sur le collagène III ou sur un matrigel. Le matrigel est un extrait de membrane basale du sarcome de Engelbreth-Holm-Swarm (EHS). L'induction par SPARC est observée après 8 h, à la différence d'une induction par le PMA en 4 h. Elle nécessite un facteur intermédiaire sécrété (Tremble, et al., 1993).

En conclusion, SPARC est impliqué dans la modification de la structure des tissus dans des contextes physiologiques variés. Il agit directement au niveau des interactions cellule-matrice et concourt à la dégradation de la MEC par l'induction de plusieurs MMPs, *via* un facteur intermédiaire sécrété.

#### *1.9.2.6. Le facteur tumoral stimulant la collagénase.*

Le TCSF (« facteur stimulant la collagénase dérivé de cellules tumorales ») a été purifié à partir de cellules néoplasiques d'un carcinome du poumon. Il est exprimé à la surface de cellules tumorales *in vitro* et *in vivo*. Il stimule l'expression des transcrits de la **collagénase-1**, de la **stromélysine-1** et de la **gélatinase A**, dans une culture de fibroblastes humains (Kataoka, et al., 1993). Le TCSF est fortement exprimé dans des **tumeurs de la vessie**, même dans des tumeurs de grade précoce (Muraoka, et al., 1993). C'est un membre de la super-famille des immunoglobulines (Biswas, et al., 1995). Il est détecté par hybridation *in situ* dans 40 tumeurs pré-invasives ou invasives **du poumon et du sein**, sur 44 étudiées. Les transcrits TCSF et gélatinase A sont détectés dans les mêmes régions des tumeurs du sein, à la fois dans les cellules néoplasiques et les fibroblastes. Son expression est plus élevée dans les tumeurs malignes que dans les tumeurs bénignes et le tissu sain (Polette, et al., 1997a).

Ces études indiquent que le TCSF est un facteur extracellulaire capable d'induire l'expression de plusieurs MMPs et suggèrent qu'il est impliqué dans la progression tumorale.

#### *1.9.2.7. Inhibition par la protéine E1A de l'adénovirus.*

##### *1.9.2.7.1. Les adénovirus et les protéines E1A.*

La région précoce 1 (E1) de l'ADN de l'adénovirus humain de type 5 (Ad5) est capable de transformer une variété de cellules de mammifères. Elle est constituée de deux unités transcriptionnelles E1A et E1B. La comparaison des protéines E1A de différents adénovirus révèle 3 régions peptidiques conservées (CR1, 2 et 3). La région E1A de l'Ad5 est transcrite en 4 ARMm, 10S, 11S, 12S et 13S, traduits en des protéines de mêmes noms (Stephens et Harlow, 1987). La **région CR1** des protéines Ad5 E1A, constituée par les résidus **(41-80)**, va nous intéresser plus particulièrement. La région E1A de l'adénovirus de type 2 (Ad2) code

également deux protéines 12S et 13S. La région E1A de l'adénovirus de type 12 (Ad12) est transcrite en 6 ARNm alternatifs qui codent pour les 5 protéines 266R, 235R, 106R, 52R et 53R dont les régions C-terminales diffèrent. La protéine 52R est nécessaire à l'activité transformante de l'Ad12.

Parmi les protéines E1, les protéines E1A jouent un rôle clé dans la transformation cellulaire. Des études suggèrent que la région CR1 et la région N-terminale de E1A jouent un rôle important dans la transformation des cellules NRK (lignée de rein de rat). Pour davantage de références sur les protéines E1A, on pourra se rapporter aux publications (Brockmann, et al., 1995, Dorsman, et al., 1995).

#### 1.9.2.7.2. Ad5 E1A inhibe l'expression de la collagénase-1.

La protéine Ad5 E1A inhibe la transcription de la collagénase-1 induite par le TPA dans plusieurs types cellulaires. Cette propriété inhibitrice nécessite la région CR1 (Offringa, et al., 1990). Une autre étude montre d'une manière semblable qu'elle inhibe, *via* sa région N-terminale, la transcription de la collagénase-1 induite par c-Jun dans les cellules HeLa (Dorsman, et al., 1995).

La répression du promoteur de la collagénase-1 par Ad5 E1A a également été observée dans un système de transcription *in vitro*, ce qui implique une interaction directe avec un facteur cellulaire. Il est remarquable qu'un **polypeptide Ad5 E1A** constitué des résidus **(1-80)** est suffisant pour obtenir l'inhibition. Deux domaines d'Ad5 E1A, **(1-25)** et **(48-60)**, sont nécessaires à l'inhibition, mais pas les régions voisines (30-49) et (70-80) (Song, et al., 1995).

#### 1.9.2.7.3. Ad5 E1A est un antagoniste de c-Jun.

La protéine Ad5 E1A inhibe l'induction par le TPA d'un promoteur minimal TK contrôlé par un triplet de sites AP-1 (Frisch, et al., 1990). Elle réprime l'activité du TRE du promoteur de la collagénase-1 (-72 TGAGTCA, site AP-1) induite par le TPA, mais pas celle du TRE proximal de *c-jun* (-71 TGACATCA). Néanmoins, elle réprime l'activité du TRE du promoteur de *c-jun* induite par c-Jun. Les auteurs supposent que le TPA induit un facteur autre que c-Fos ou c-Jun qui cible le TRE de *c-jun* et qui, contrairement à c-Jun, ne pourrait pas être inhibé par E1A. La mutation de la **région CR1** de E1A supprime l'activité inhibitrice (van Dam, et al., 1990). L'étude de protéines chimères fusionnant les DBD et les domaines transactivateurs de c-Jun et d'un facteur de transcription hétérologue (GHF1) montre que le **DBD de c-Jun** est la cible de E1A dans l'inhibition du TRE de la collagénase-1. *In vivo*, E1A supprime la liaison des complexes c-Jun / c-Jun et c-Fos / c-Jun au TRE de la collagénase-1, mais pas celle de c-Jun / ATF-2 aux TREs de *c-jun* (*c-jun1*-TRE, -71 TGACATCA ; *c-jun2*-TRE, -189 TTACCTCA) (Hagmeyer, et al., 1993).

Ces résultats indiquent globalement que la région N-terminale (1-80) de la protéine Ad5 E1A inhibe la transcription médiée par le site AP-1 en ciblant le DBD de c-Jun, spécifiquement dans les complexes c-Fos / c-Jun et c-Jun / c-Jun dont la liaison à l'ADN est

inhibée. Un autre mécanisme moléculaire d'antagonisme entre E1A et c-Jun ou JunB fait intervenir le cofacteur CBP ou son homologue p300. Il sera présenté plus loin (§ 5.2.3.2).

#### 1.9.2.7.4. Ad5/12 E1A inhibe l'expression de la stromélysine-1.

Dans les cellules NRK, des facteurs de croissance, le PMA ou la transformation par l'oncogène *Ha-ras* EJ induisent les ARNm de la stromélysine-1. La transformation par Ad5 E1A ou par Ad12 E1A inhibe ces ARNm d'une manière additive, c'est-à-dire sans supprimer le phénomène d'induction. La dexaméthasone produit les mêmes effets, ce qui suggère un mécanisme commun (Offringa, et al., 1988). Ce mécanisme pourrait cibler AP-1, comme nous l'avons vu avec l'inhibition par les glucocorticoïdes (§ 1.9.2.3.2, 4) ou ci-dessus avec l'inhibition de la collagénase-1 par Ad5 E1A (§ 1.9.2.7.2-3). Cette hypothèse est confortée par l'implication de la région CR1 de Ad5 E1A dans l'inhibition de l'expression des ARNm de la stromélysine-1 (van Dam, et al., 1989), région qui permet l'inhibition d'AP-1 (§ 1.9.2.7.3, § 5.2.3).

#### 1.9.2.7.5. Ad2/5 E1A inhibe la gélatinase A *via* le site AP-2.

L'expression de Ad5 E1A dans 3 lignées cellulaires tumorales inhibe l'expression de la collagénase-1 ou celle de l'uPA, et simultanément celle de la gélatinase A (Frisch, et al., 1990). La répression du promoteur de la gélatinase A par Ad5 E1A dans les cellules HT1080 (lignée de fibrosarcome humain) est médiée par une région contenant à la fois le principal domaine activateur du promoteur (-1685 GCCTGAACT) lié par le facteur AP-2 et un domaine inhibiteur de 40 nucléotides (Frisch et Morisaki, 1990). Une construction fusionnant le site AP-2 au promoteur minimal de la gélatinase A montre qu'il est la cible de la protéine Ad2 E1A. Une protéine Ad2 E1A délétée au niveau des résidus (36-67) inhibe le promoteur de la gélatinase A, aussi bien que la protéine E1A complète (Somasundaram, et al., 1996).

Ces résultats montrent que Ad2/5 E1A inhibe l'activité du promoteur de la gélatinase A induite *via* le site AP-2 (-1685). Cette inhibition met en jeu une région de E1A distincte de celle impliquée dans l'inhibition du promoteur de la collagénase-1 par le ciblage du facteur c-Jun.

### 1.9.3. Conclusion.

Physiologiquement, les MMPs et les TIMPs sont régulés dans les processus inflammatoires, dans le cancer, lors de l'angiogenèse, dans l'utérus, dans le développement. Ces mécanismes qui régulent leur expression sont induits par des facteurs extracellulaires ou membranaires (cytokines, facteurs de croissance, composants de la MEC, molécules d'adhésion, hormones lipophiles) qui sont le point de départ de cascades de signalisation. Les signaux aboutissent dans le noyau et induisent l'activation ou l'inhibition de facteurs de transcription. L'expression des MMPs et des TIMPs *in vivo* dépend largement des types cellulaires (cellules épithéliales, cellules endothéliales, fibroblastes, chondrocytes, ostéoblastes). Cette spécificité est retrouvée dans les tests de transactivation en culture cellulaire. Dans certains

cas, des facteurs de transcription spécifiques d'un type cellulaire ont été identifiés (famille AP-1).

La multiplicité des sites régulateurs et la variabilité de leurs combinaisons dans les promoteurs des MMPs et des TIMPs semblent responsables de la spécificité d'expression de ces gènes. Les sites AP-1 ou AP-1 like ont un rôle central dans la régulation des promoteurs de la matrilysine, de la collagénase-1, de la stromélysine-1, de la gélatinase B et de TIMP-1. Néanmoins, le site AP-1 semble ne jamais agir seul dans le contexte des promoteurs naturels. C'est souvent avec les sites EBS qu'interagissent les sites AP-1. Dans certains cas, des interactions protéiques directes ont été mises en évidence entre des facteurs des familles AP-1 et Ets.

AP-1 est également la cible de mécanismes inhibiteurs, comme ceux induits par des hormones glucocorticoïdes, rétinoïdes et stéroïdes, ou par la protéine E1A de l'adénovirus. L'inhibition par les hormones androgènes cible un facteur Ets. Les sites SPRE et TIE sont impliqués dans la régulation par des facteurs de croissance spécifiques, le PDGF et le TGF- $\beta$  respectivement. Ces deux sites sont les cibles de facteurs de transcription qui interagissent physiquement avec Fos ou avec Jun, ce qui souligne à nouveau l'importance des facteurs de la famille AP-1 dans la régulation de plusieurs MMPs, selon des mécanismes variés.

Le plus souvent les signaux extracellulaires et les facteurs de transcription qui régulent l'expression des MMPs régulent également les TIMPs, parfois en sens opposé, ce qui renforce fonctionnellement leur action sur les MMPs, ou parfois dans le même sens. Ces facteurs régulent également le système du plasminogène, un système d'activité protéolytique physiologiquement apparenté à celui des MMPs et des TIMPs.

## 2. Les facteurs de transcription Fos et Jun.

### 2.1. Les familles Fos et Jun.

Les familles de facteurs de transcription Fos et Jun constituent la famille AP-1. Ces facteurs contiennent un domaine basique de liaison à l'ADN et un domaine « leucine zipper » (une hélice  $\alpha$  présentant une répétition périodique de résidus leucine). Ils font donc partie du groupe des protéines bZip (Busch et Sassone-Corsi, 1990a). Ces dimères ont été originellement définis sous le nom d'AP-1 (« protéine activatrice 1 »). Ce terme désigne un facteur qui reconnaît le site AP-1/TRE (§ 1.9.1.2, § 2.3.1) et qui est responsable de l'induction de la transcription de différents gènes par le TPA. Des signaux initiés par des messagers extracellulaires (facteurs de croissance, cytokines, activateurs des lymphocytes T, hormones, neurotransmetteurs) induisent une cascade de signalisation intracellulaire qui aboutit à l'activation d'AP-1 (figure 10, page 86). L'induction de l'activité AP-1 procède par la phosphorylation des facteurs Fos-Jun déjà présents dans le noyau et également par l'induction de la transcription des gènes *fos-jun*.

Chez les mammifères, la famille *fos* est constituée de 4 membres homologues de l'oncogène *v-fos* : *c-fos*, *fosB*, *fra1* et *fra2* (« antigène se rapprochant de Fos »). La famille *jun* comporte 3 membres homologues de l'oncogène *v-jun* : *c-jun*, *junB* et *junD*. *c-jun*, *junB* et les gènes de la famille *fos* sont des gènes dits « de réponse précoce immédiate », c'est-à-dire des gènes dont la transcription est induite rapidement après une stimulation de la cellule. Au contraire, *junD* peut avoir une expression élevée dans des cellules non stimulées et il est relativement réfractaire à une stimulation par des agents mitogènes (Herschman, 1991).

### 2.2. La dimérisation des facteurs Fos et Jun.

#### 2.2.1. La dimérisation des facteurs Fos et Jun entre eux.

La dimérisation des facteurs de la famille AP-1 a lieu au niveau du domaine Zip. Elle permet le rapprochement des domaines de liaison à l'ADN des deux partenaires et elle est nécessaire à la liaison à l'ADN (Gentz, et al., 1989). Les protéines de la famille Jun forment des dimères entre elles et avec les protéines Fos. Les protéines Fos ne forment pas de dimères entre elles (Ryseck et Bravo, 1991). Les dimères Fos / Jun sont plus stables que les dimères Jun / Jun et les protéines c-Fos et c-Jun coopèrent pour la liaison à l'ADN (Rauscher, et al., 1988, Smeal, et al., 1989). JunB lie l'ADN 10 fois plus faiblement que c-Jun. Quatre résidus dans les domaines de dimérisation et de liaison à l'ADN sont responsables de cette différence d'activité (Deng et Karin, 1993).

La structure cristallographique du dimère c-Fos / c-Jun lié à l'ADN révèle que la reconnaissance du site asymétrique AP-1 est possible dans les deux orientations. Le dimère se présente sous la forme d'un X souple dont une extrémité vient pincer le grand sillon de l'ADN.

Cette structure favoriserait les interactions physiques avec des facteurs de transcription liés sur des sites adjacents (Glover et Harrison, 1995).

### 2.2.2. La dimérisation avec ATF-CREB.

Les protéines Fos et Jun sont également capables de former des dimères avec les facteurs de la famille ATF-CREB (« facteur activant la transcription » et « protéine liant le CRE »). Le site CRE est un élément activateur régulé par l'AMPc. La famille ATF-CREB regroupe les protéines **CREB-1**, **ATF-1**, **CREB-2 = ATF-2 = CRE-BP1**, **ATF-3**, **ATF-4**, **ATF-a** et **CREM**. La formation d'hétérodimères n'a lieu qu'entre des membres spécifiques (table 6).

	CREB-1	ATF-1	ATF-2	ATF-3	ATF-4	ATF-a
c-Fos	0	0	0	0	+	+
Fra1	?	0	0	0	+	?
c-Jun	0	0	+	+	+	+
JunB	0	?	0	?	?	?

**Table 6.** Des facteurs spécifiques des familles Fos-Jun et ATF-CREB forment des hétérodimères.

La table rassemble les résultats présentés dans les publications (Benbrook et Jones, 1990, Hai et Curran, 1991, Chatton, et al., 1994). Les dimères ont été observés *in vitro* (test de retard sur gel) ou *in vivo* (coimmunoprécipitation).

0 : pas de dimérisation ; + : dimérisation observée ; ? : dimérisation non testée.

### 2.2.3. La dimérisation avec Maf.

La famille *maf* est une autre famille codant des facteurs de transcription à domaine bZip. Elle est constituée par *maf* (homologue cellulaire de *v-maf*), *nrl*, *mafB*, *mafF*, *mafG* et *mafK*. Maf forme des homodimères qui lient les sites MAREs (« éléments de réponse à Maf »). Le MARE de type TRE (TGC TGAGTCA GCA) et le MARE de type CRE (TGC TGACGTCA GCA) incluent respectivement des consensus AP-1 (§ 2.3.1) et CRE (§ 2.3.2).

Maf forme des hétérodimères avec c-Fos et c-Jun dont les sites préférentiels de liaison sont constitués d'une moitié MARE et d'une moitié AP-1. Nrl s'hétérodimérise également avec c-Fos et c-Jun. MafB, MafF, MafG et MafK s'hétérodimérisent avec c-Fos, mais pas avec c-Jun. MafF, MafG et MafK sont de petites protéines homologues du tiers C-terminal de v-Maf. Elles forment des hétérodimères avec un facteur p45 spécifique de la lignée érythroïde.

La formation d'hétérodimères entre les facteurs de transcription des familles Maf et Fos-Jun est susceptible de générer un répertoire de complexes régulateurs se liant à des sites semblables mais spécifiques.

#### 2.2.4. La dimérisation avec NF-IL6.

NF-IL6 (« facteur nucléaire pour l'expression de l'IL-6 ») est un membre de la famille C/EBP (« protéine liant l'élément activateur CCAAT »), une famille de facteurs de transcription à domaine bZip. NF-IL6 lie spécifiquement un élément de réponse à l'IL-1 dans le promoteur de l'IL-6. La transcription du gène NF-IL6 est induite par l'IL-6 et d'autres cytokines (Akira, et al., 1990). NF-IL6 forme des dimères avec c-Fos et avec c-Jun. Les homodimères NF-IL6 reconnaissent à la fois des sites NF-IL6 (TTGTGCAAT, promoteur de l'IL-6, TTGAGAAAG, promoteur E2 de l'adénovirus) et un site ATF/NF-IL6 (TGACGTAGT, promoteur E2 de l'adénovirus). Les hétérodimères NF-IL6 / c-Fos et NF-IL6 / c-Jun reconnaissent les sites NF-IL6 avec une affinité réduite, mais ne reconnaissant plus le site ATF/NF-IL6. Au niveau transcriptionnel, l'induction par NF-IL6 d'un gène rapporteur contrôlé par un site NF-IL6 est inhibée par c-Fos et c-Jun.

Ces résultats montrent que l'hétérodimérisation de NF-IL6 avec c-Fos et c-Jun inhibe l'induction de la transcription *via* les sites NF-IL6 et pourrait contribuer à la spécificité de promoteur et de type cellulaire de la signalisation de l'IL-6 (Hsu, et al., 1994).

### 2.3. Liaison à l'ADN.

#### 2.3.1. Les sites AP-1 et TRE.

Les dimères Fos / Jun et Jun / Jun lient le site AP-1 de séquence **TGA(G/C)TCA**, avec des affinités différentes (Ryseck et Bravo, 1991). Le site AP-1 est un site **TRE** (inductible par le TPA) (Angel, et al., 1987). Il existe également des sites fonctionnels semblables à AP-1 dans des promoteurs naturels, comme **TAAATCA** dans le promoteur de la collagénase-1 de lapin et **TGAGTAA** dans le promoteur de TIMP-1 murin (§ 1.9.1.2), **TGTTTCA** dans le promoteur de l'IL-2 humaine (§ 2.4.1.2), **TGAGTAA** et **TGACTCT** dans le promoteur du TGF- $\beta$  murin (Owen et Ostrowski, 1990).

D'autres TREs sont connus, comme **TGACATCA** (*c-jun1*-TRE) et **TTACCTCA** (*c-jun2*-TRE) dans le promoteur de *c-jun* (§ 1.9.2.7.3) et **TGAAGTCA** dans le promoteur de l'uPA humain (§ 2.4.2.2). Ces TREs sont liés par le complexe c-Jun / ATF-2. Un site fonctionnel **TGAGCTCA** semblable à ces TREs est connu dans le promoteur de *junD* (§ 2.10.4) et dans le promoteur du TNF- $\alpha$  (§ 2.4.2.3, § 3.7.2.2.5).

**Un nouveau site AP-1** transcriptionnellement actif a été isolé par la technique de sélection de sites de liaison. Cette technique utilise des anticorps dirigés contre la famille Fos pour isoler des complexes ADN / protéines formés entre des oligonucléotides et des facteurs extraits de fibroblastes de rat, normaux (208F) ou transformés par *v-fos* (FBR). Cette étude a permis de définir la séquence « 208F » **ACCACATC** comme le site consensus de c-Fos, par opposition à *v-Fos* dont le consensus (A/G)TGA(G/C)T(C/A)A s'avère identique aux sites AP-1 et AP-1 like déjà connus. Le site 208F n'a pas d'activité transcriptionnelle dans les cellules transformées par *v-fos*.

Dans les cellules normales, l'EGF induit un gène rapporteur contrôlé par le site 208F mais inhibe l'activité d'un site ATGCGTAT. L'EGF n'affecte pas l'activité de la plupart des autres sites oligonucléotides testés. Les cellules normales ou transformées présentent des activités nucléaires de liaison aux oligonucléotides et d'induction de la transcription différentes (Hawker, et al., 1996).

### 2.3.2. Le site ATF/CRE.

Les facteurs de la famille ATF-CREB régulent la transcription en se liant au site **CRE** (inductible par l'AMPc). C'est un palindrome de séquence **TGACGTCA** qui ne diffère que par une base de l'AP-1/TRE et du *c-jun1*-TRE. La phosphorylation de CREB induit la transcription *via* le site CRE (§ 2.10.5.2).

## 2.4. Activité transcriptionnelle.

### 2.4.1. Activité des différents facteurs Fos et Jun.

#### 2.4.1.1. Généralités.

**c-Fos** et **c-Jun** induisent la transcription *via* le site AP-1 (Gutman et Wasylyk, 1991) (et § 1.9.1.2).

**FosB** a un pouvoir transformant beaucoup plus élevé que *c-fos* et comparable à celui de *v-fos*. FosB induit la transcription du promoteur de *c-jun* et d'un gène rapporteur contrôlé par des sites AP-1. La transformation par *v-fos*, mais pas celle par *fosB*, s'accompagne de l'induction des ARNm de l'uPA et du PAI, ce qui indique des propriétés de régulation de la transcription spécifiques (Schuermann, et al., 1991). Un ARMm alternatif de *fosB* est traduit en une protéine **FosB2** (= FosB/SF =  $\Delta$ FosB) de 237 acides aminés où manquent les 101 résidus C-terminaux de FosB. FosB2 forme avec c-Jun un dimère qui lie le site AP-1. Selon les études, FosB2 induit ou n'induit pas la transcription *via* AP-1. Dans une étude, FosB2 inhibe l'activité transcriptionnelle induite par c-Fos et c-Jun *via* un site AP-1 et les transformations induites par *c-fos* et *v-fos*. Deux études montrent que FosB2, contrairement à FosB, n'inhibe pas le promoteur de *c-fos* *via* le site SRE (§ 2.10.5.1.2). FosB2 serait donc un facteur transactivateur, transinhibiteur ou inactif selon les circonstances (Dobrazanski, et al., 1991, Mumberg, et al., 1991, Nakabeppu et Nathans, 1991, Yen, et al., 1991). Les 55 résidus C-terminaux de FosB définissent un motif TBM de liaison à la protéine TBP, absent dans FosB2 et Fra1 (§ 2.9.2).

**Fra1** et c-Jun coopèrent pour la liaison au site AP-1 (Cohen, et al., 1989). Dans des kératinocytes humains traités par le TPA, Fra1, junB et junD induisent le promoteur de l'involucrine humaine *via* 2 des 5 sites AP-1 potentiels (Welter, et al., 1995). (L'involucrine est un donneur du groupement glutamyl impliqué dans la construction de l'enveloppe insoluble des filaments de cytokératine de la couche suprabasale de l'épiderme).

c-Fos, Fra1 et **Fra2** forment des hétérodimères *in vitro* avec c-Jun, JunB et JunD. Dans les cellules F9 (lignée d'un carcinome embryonnaire de testicule de souris), Fra2 supprime l'activité d'un rapporteur AP-1 induit par c-Jun. Au contraire, Fra2 et c-Fos augmentent la transcription induite par JunD (Suzuki, et al., 1991).

Pendant la prolifération des ostéoblastes, toutes les protéines des familles Fos et Jun participent à la formation de complexes. Dans les ostéoblastes différenciés, Fra2 et JunD prédominent. Dans les cellules ROS 17/2.8 (lignée d'ostéosarcome de rat), la coexpression de Fra2 et JunD induit le promoteur de l'ostéocalcine. Ce promoteur est au contraire inhibé par la coexpression de c-Jun et de tout facteur de la famille Fos. Il n'est pas affecté par la coexpression de Fra1 et JunB. L'activité spécifique de facteurs des familles Fos et Jun pourrait donc être impliquée dans la prolifération et la différenciation des ostéoblastes (McCabe, et al., 1996).

L'induction du promoteur de la collagénase-1 par le PMA s'accompagne de la liaison de c-Fos, JunD et Fra2 aux sites AP-1 like (-181 TTAATCA) et AP-1 (-72 TGAGTCA) (§ 1.9.1.2).

Bien que **JunB** induise la transcription *via* le site AP-1, il est moins efficace que c-Jun et il réprime son activité transcriptionnelle en formant avec lui un complexe inactif (Deng et Karin, 1993). JunB présente un domaine activateur très conservé dans la famille Jun et un domaine inhibiteur très divergent. JunB réprime ou induit des promoteurs spécifiques, seul ou en coopération avec LRF-1 (« facteur de régénération du foie ») (Hsu, et al., 1993). *junB* peut transformer des cellules en coopération avec *ras*, mais moins efficacement que *c-jun*. *c-fos* coopère avec *c-jun* à la transformation cellulaire, alors que *junB* restreint la transformation par *c-jun* (Schutte, et al., 1989).

**JunD** inhibe la croissance de fibroblastes et supprime la transformation par *ras* (Pfarr, et al., 1994).

#### 2.4.1.2. Régulation du promoteur de l'IL-2.

La complexité du promoteur de l'IL-2 et la spécificité de type cellulaire, ou au contraire l'ubiquité, des facteurs de transcription qui le régulent en font un modèle très riche de l'étude de la régulation transcriptionnelle chez les eucaryotes.

Une région appelée NFAT-1 du promoteur de l'IL-2 humaine est reconnue par un complexe protéique du même nom, spécifiquement dans les lymphocytes T activés. Cette région contient un site EBS1 (-286 GAGGAAA) et un site AP-1 like (-276 TGTTTCA) séparés par 2 bases. **Elf1** a été isolé comme un membre de la famille Ets qui lie les sites EBS1 et EBS2 (-140 GAGGAAA), contrairement à Ets1 et Ets2. L'inductibilité du promoteur nécessite l'un ou l'autre de ces EBS (Thompson, et al., 1992) qui, par ailleurs, chevauchent des sites reconnus par la famille NFAT de facteurs de transcription apparentés à NFκB (§ 3.7.3.6). De plus, les ARNm *fra1* et *junB* sont induits lors de l'activation des lymphocytes T et le complexe NFAT-1 contient les protéines **Fra1** et **JunB**. La mutation du site AP-1 like

supprime la capacité de la région NFAT-1 à être reconnue par un complexe NFAT-1 et à induire un gène rapporteur dans des lymphocytes T activés (Boise, et al., 1993).

Ces résultats suggèrent que Elf1 (ou un facteur apparenté) et le dimère Fra1 / JunB coopèrent à l'induction de la région NFAT-1 du promoteur de l'IL-2, lors de l'activation des lymphocytes T.

Le site EBS2 (-140) est adjacent à une séquence (-132 ACAAAGGTAA) reconnue également par un facteur AP-1. Ces 2 éléments définissent la région NFIL-2B, fonctionnellement semblable à la région NFAT-1 (Rooney, et al., 1995).

D'une manière remarquable, la séquence AP-1 like (-276 TGTTTCA) est strictement identique au consensus de liaison du facteur ILF, déterminée par la technique de sélection de sites de liaison. Trois isoformes de ILF (« facteur liant l'élément activateur de l'IL-2 ») sont connues. ILF ne participe pas au complexe NFAT-1, mais pourrait maintenir le promoteur dans un état non actif et inductible (Nirula, et al., 1997). Ce facteur, isolé en 1991, a été très peu étudié (3 publications).

## 2.4.2. Activité des hétérodimères Fos-Jun / ATF-CREB.

### 2.4.2.1. Généralités.

Les hétérodimères formés entre les familles Fos-Jun et ATF-CREB (table 6, page 79) ont des activités spécifiques. La formation de ces dimères réalise un couplage des signaux activant ces deux familles. Les dimères c-Jun / ATF-2, 3, 4, c-Fos / ATF-4 et Fra1 / ATF-4 lient le site CRE, exclusivement ou préférentiellement au site TRE. Les protéines ATF-CREB peuvent donc réorienter l'activité des protéines Fos-Jun (Hai et Curran, 1991).

L'expression de c-Jun, JunB ou JunD, mais pas de c-Fos, stimule la capacité transactivatrice d'une construction GAL4-ATF-a. Le complexe **c-Jun / ATF-a** lie efficacement les sites CRE et AP-1, contrairement au complexe c-Fos / ATF-a (Chatton, et al., 1994).

### 2.4.2.2. Régulation de l'uPA.

Le dimère **c-Jun / ATF-2** est observé *in vivo*, mais il n'induit pas la transcription d'un gène rapporteur contrôlé par des sites CRE ou AP-1, en cellules F9 (Benbrook et Jones, 1990). Il induit cependant un gène rapporteur contrôlé par des copies du site **TRE** du promoteur de l'uPA humain (-1975 TGAAGTCA), dans les cellules HeLa. c-Jun induit l'activité de ce rapporteur et c-Fos l'inhibe, ce qui suggère un titrage de c-Jun par c-Fos à partir du complexe c-Jun / ATF-2 (de Cesare, et al., 1995).

### 2.4.2.3. Régulation du TNF- $\alpha$ .

Le dimère **c-Jun / ATF-2** et le facteur NFAT1 lient non coopérativement une paire de sites **TRE like - NF $\kappa$ B like** (-106 TGAGCTCA T GGGTTTCTCC) du promoteur du

TNF- $\alpha$  humain. Ils coopèrent cependant *in vivo* à l'induction de ce promoteur dans les lymphocytes T activés (Tsai, et al., 1996). D'autres travaux montrent que NFAT1 interagit physiquement avec des complexes AP-1 (§ 3.7.3.6). Par ailleurs, le site TRE like coopère avec un site EBS (-118) (§ 3.7.2.2.5).

### 2.4.3. Conclusion.

Les facteurs de transcription des familles Fos-Jun et ATF-CREB forment des dimères spécifiques qui régulent l'expression des MMPs et des TIMPs (§ 1.9.1.2), de l'uPA, ainsi que de l'IL-2 et du TNF- $\alpha$ . Des cytokines et des facteurs de croissance sont eux-mêmes impliqués dans la régulation de l'expression des MMPs et des TIMPs (§ 1.9.2.2), en particulier le TNF- $\alpha$ , mais pas l'IL-2 qui n'affecte pas leur expression à notre connaissance. Les facteurs Fos-Jun et ATF-CREB participent donc directement et indirectement au contrôle des gènes codant des protéases extracellulaires ou leurs inhibiteurs.

## 2.5. Régulation par phosphorylation.

### 2.5.1. c-Jun est activé par phosphorylation.

Dans les cellules quiescentes, c-Jun est phosphorylé en 5 sites, dont 3 sont proches du DBD et inhibent la liaison à l'ADN. En réponse à l'expression de l'oncogène *Ha-ras*, la phosphorylation de ces 3 sites inhibiteurs baisse. L'activité transcriptionnelle de c-Jun est induite par la phosphorylation des résidus Ser<sup>63</sup> et Ser<sup>73</sup>. Cette phosphorylation est également nécessaire à la coopération avec *ras* pour la transformation (Smeal, et al., 1991, Smeal, et al., 1992). Une étude *in vivo* des complexes protéiques sur le promoteur de *c-jun* montre que l'irradiation par des U.V. induit la phosphorylation de c-Jun sur les résidus Ser<sup>63</sup> et Ser<sup>73</sup> mais ne modifie pas significativement les interactions protéine / ADN, en particulier au niveau des TREs (-71, -189) qui répondent à cette irradiation.

Ces observations suggèrent qu'une phosphorylation du facteur c-Jun déjà lié à l'ADN, ou d'autres membres de la famille AP-1, permet la rapide induction du gène *c-jun* en réponse à des stimuli extracellulaires (Rozek et Pfeifer, 1993).

CBP est un cofacteur d'AP-1 qui lie spécifiquement la protéine c-Jun phosphorylée sur les résidus Ser<sup>63</sup> et Ser<sup>73</sup> (§ 5.2.3). CBP interagit avec la machinerie transcriptionnelle (§ 5.2.2) et semble donc être un effecteur de l'activation de c-Jun.

### 2.5.2. Plusieurs kinases phosphorylent les facteurs Fos-Jun.

La protéine JNK1/SAPK $\gamma$  (« kinase du domaine N-terminal de Jun / protéine kinase activée par le stress ») est une protéine kinase induite par *Ha-ras* et par les U.V. . Elle est activée par la phosphorylation de résidus Thr et Tyr. Elle phosphoryle c-Jun sur les résidus Ser<sup>63</sup> et Ser<sup>73</sup> (Derijard, et al., 1994). Une kinase homologue, JNK2/SAP $\kappa$ , a une activité catalytique semblable, mais lie beaucoup mieux c-Jun que JNK1 (Kallunki, et al., 1994). JunB

est reconnu par les JNKs mais n'est pas phosphorylé par elles, car les résidus homologues des Ser<sup>63</sup> et Ser<sup>73</sup> de c-Jun ne sont pas suivis par des prolines (Kallunki, et al., 1994). La phosphorylation par JNK nécessite non seulement un site phospho-accepteur, mais également un site d'ancrage. JunD ne contient pas de site d'ancrage, mais il est phosphorylé au sein d'un dimère dans lequel son partenaire recrute la JNK. c-Jun et JunB contiennent ce site d'ancrage (Kallunki, et al., 1996). SAPK $\beta$  est un 3<sup>e</sup> membre connu de la famille JNK/SAPK.

c-Fos et c-Jun sont phosphorylés dans leur région C-terminale par **ERK1** et **ERK2**, sur les résidus Ser<sup>362</sup>, Ser<sup>374</sup> (c-Fos) et Thr<sup>231</sup>, Ser<sup>243</sup>, Ser<sup>249</sup> (c-Jun). Cette phosphorylation stabilise la protéine c-Fos et augmente son pouvoir transformant en cellules NIH 3T3, à la différence de c-Jun qui est ciblé au niveau d'un domaine inhibiteur de la liaison à l'ADN proche du domaine bZip C-terminal (Minden, et al., 1994b, Okazaki et Sagata, 1995). c-Fos est également stabilisé par la **p90<sup>RSK</sup>** (« kinase ribosomale S6 ») selon une phosphorylation identique (Chen, et al., 1993b).

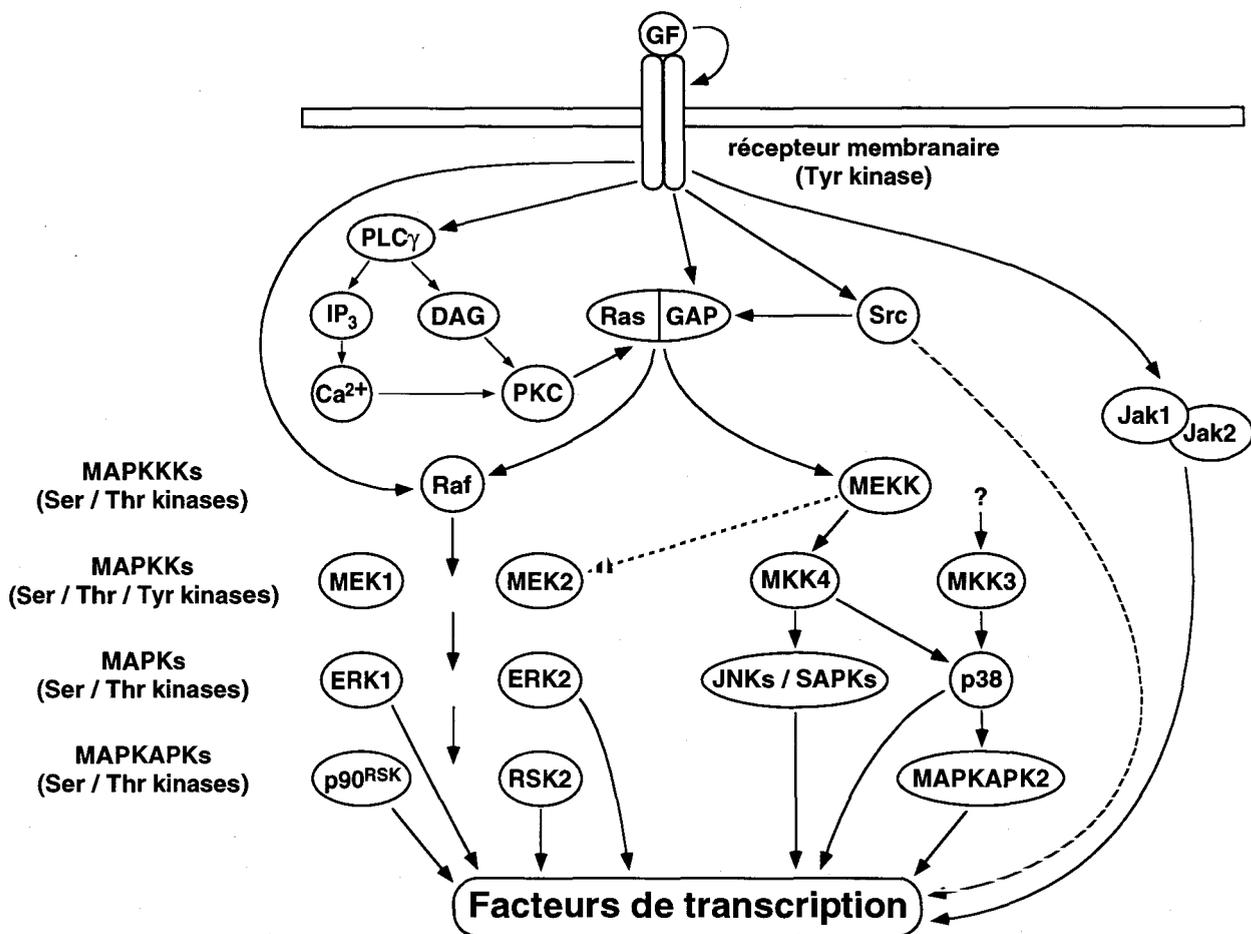
c-Fos n'est pas activé par les JNKs. Il est phosphorylé par **FRK** (« kinase se rapprochant de FYN ») sur le résidu Thr<sup>232</sup>, homologue du résidu Ser<sup>73</sup> de c-Jun (Deng et Karin, 1994).

Les kinases JNKs et FRK sont des **MAPKs**, ou kinases activées par les signaux mitogènes qui sont des messagers intracellulaires (figure 10). Une revue récente présente la régulation des facteurs de transcription par les MAPKs. Les facteurs de mammifères concernés qui étaient alors connus se répartissent entre les familles Ets (TCFs : Elk1, Sap1a et Sap2), bZip (Fos, Jun, ATF-2, CREB) et MADS box (SRF). Cette revue présente un schéma détaillé des sites de phosphorylation de ces facteurs et indique quelles fonctions sont régulées : liaison à l'ADN, capacité transactivatrice, interaction avec des coactivateurs (Treisman, 1996). Ets1 et Ets2 sont également activés par une MAPK (§ 3.4.1).

## **2.6. CREM est un antagoniste des facteurs Fos et Jun.**

Le gène CREM (« modulateur du CRE ») est le seul membre de la famille ATF-CREB qui soit inductible. C'est un gène de réponse immédiate induit par la voie de l'AMPc (Lamas, et al., 1996). Il est traduit en plusieurs protéines qui utilisent deux DBDs alternatifs et qui présentent la même spécificité de liaison à l'ADN que CREB (Foulkes, et al., 1991, Laoide, et al., 1993).

CREM inhibe l'activité transcriptionnelle de c-Jun, JunB, JunD et v-Jun. Cette activité ne dépend pas du domaine de phosphorylation de CREM, ne nécessite pas la formation d'un hétérodimère CREM / Jun et n'est pas affectée par c-Fos. Elle procéderait par une liaison compétitive de CREM sur des sites TREs (Masquilier et Sassone-Corsi, 1992).



**Figure 10.** Transduction des signaux mitogènes et de stress *via* des protéines kinases.

Les groupes des kinases MAPKs et SAPKs permettent la transduction intracellulaire de signaux mitogènes et activateurs (initiés par des facteurs de croissance et des cytokines) et de signaux initiés par un stress (irradiation, choc osmotique, stress mécanique). Le groupe des SAPKs peut également être considéré comme un sous-groupe de MAPKs.

Un facteur de croissance (GF), comme par exemple l'EGF ou le PDGF, induit l'activité Tyr kinase de son récepteur membranaire. L'activation du récepteur induit la phosphorylation de la protéine GAP, directement ou *via* Src (Park, et al., 1992). GAP est à la fois un inhibiteur de Ras (petite protéine G liant le GTP (forme active) et le GDP (forme inactive), dont l'activité GTPase intrinsèque est induite par GAP) et un effecteur nécessaire à la transduction du signal passant par Ras (Duchesne, et al., 1993). La protéine Ras active Raf, qui peut aussi être activée *via* la PKC ou directement par un récepteur membranaire (Pelech et Sanghera, 1992). Ras induit également l'activation de la MEKK (Minden, et al., 1994a). Raf et MEKK sont des kinases qui initient les voies des MAPKs et SAPKs, utilisées préférentiellement par les signaux mitogènes et le stress respectivement, mais pas exclusivement. La MEKK phosphoryle la MEK2. Cette phosphorylation pourrait être en principe une croisée entre les voies MAPKs et SAPKs, mais *in vivo* elle ne conduit pas à l'activation de ERK (Karin, 1995). Raf et MEKK sont appelées MAPKKKs car elles activent les MAPKKs (MEKs et MKKs) qui activent elles-mêmes les MAPKs (ERKs, JNKs/SAPKs, p38/RK). Les MAPKs régulent directement par phosphorylation plusieurs familles de facteurs de transcription, ou indirectement par l'intermédiaire d'effecteurs appelés MAPKAPKs (RSKs, MAPKAPK) (Raingeaud, et al., 1995, Treisman, 1996).

Raf a une localisation membranaire intracellulaire, ainsi que Ras, ou périnucléaire. Les kinases en aval de Raf et MEKK sont cytoplasmiques et/ou nucléaires.

Abréviations : PLC $\gamma$  : phospholipase C  $\gamma$  ; IP $_3$  : inositol triphosphate ; DAG : diacylglycérol ; PKC : protéine kinase C ; MAPK : protéine kinase activée par des agents mitogènes ; MEK : MAP ou ERK kinase ; MKK : MAP K K ; ERK : protéine kinase régulée par des signaux extracellulaires ; SAPK : protéine kinase activée par le stress ; MAPKAPK : protéine kinase activée par une MAPK ; RSK : kinase ribosomale S6 ; Src : « gène de sarcome » (voir aussi § 2.10.5.4) ; JAK : Janus kinase (voir § 2.10.3).

## **2.7. Autres modulateurs de Fos-Jun et de ATF-CREB.**

### **2.7.1. IP-1.**

L'activité de AP-1 est modulée par IP-1 (« protéine inhibitrice »), un facteur présent dans le cytoplasme et le noyau de plusieurs types cellulaires. IP-1 supprime la liaison à l'ADN du complexe c-Fos / c-Jun, *in vitro* et *in vivo*. C'est une protéine de 30-40 kDa dont seule la forme non phosphorylée est inhibitrice. IP-1 est phosphorylée par la **PKA**, ce qui suggère une croisée au niveau transcriptionnel entre la voie de l'AMPc et les voies de signalisation qui activent AP-1 *via* les MAPKs (Auwerx et Sassone-Corsi, 1991).

### **2.7.2. AF-1.**

AF-1 (« facteur associé à AP-1 ») est un facteur composé de peptides de 7 à 17 kDa qui forment en solution un complexe de 34 kDa. AF-1 augmente d'un facteur 100 la vitesse de liaison de JunD sur un site AP-1. Le complexe JunD / AF-1 lié à l'ADN s'étend sur 17 pb, au lieu de 8 pb pour JunD. AF-1 stabilise fortement la liaison à l'ADN des dimères JunD / JunD et c-Fos / JunD. Il n'est pas actif sur le dimère c-Fos / c-Jun et il réduit la liaison à l'ADN de c-Jun / c-Jun. Lors de l'**activation de lymphocytes T**, des complexes AF-1 / JunD se forment dans le noyau, ce qui pourrait indiquer une activité physiologique de AF-1 (Powers, et al., 1996).

### **2.7.3. ABP.**

ABP (« protéine auxiliaire de pontage ») désigne un facteur non isolé présent dans un **lysat de réticulocyte**. Il stabilise la liaison de complexes formés entre des facteurs nucléaires (de cellules HeLa) et des peptides basiques (semblables aux domaines basiques des facteurs bZip) sur des sites consensus AP-1 et CRE (Busch et Sassone-Corsi, 1990b).

## **2.8. Le complexe c-Fos / c-Jun courbe l'ADN.**

L'éventualité d'une courbure de l'ADN au niveau d'un site AP-1 par la liaison d'un complexe c-Fos / c-Jun a été étudiée par des expériences de retard sur gel. Cependant, des paramètres autres que la courbure de l'ADN peuvent modifier la vitesse de migration d'un complexe ADN / protéine. Cette difficulté est résolue en couplant la courbure induite avec une courbure intrinsèque dans la sonde d'ADN. Ce procédé permet également d'évaluer la direction de la courbure induite par rapport au grand et au petit sillon. La distance entre les deux points de courbure et la longueur des séquences flanquantes modifient la sensibilité de la détection de la courbure induite. Cette particularité explique les résultats apparemment contradictoires qui ont été publiés (Kerppola, 1996, Sitlani et Crothers, 1996).

La conclusion générale de ces travaux est que la liaison des facteurs Fos-Jun à l'ADN peut effectivement induire une courbure. Les complexes c-Fos / c-Jun, c-Jun / c-Jun et

Fra2 / ATF-2 induisent des courbures au niveau du site AP-1 évaluées à 23, 27 et 22 degrés respectivement, à la différence de Fra1 / c-Jun, Fra2 / c-Jun et ATF-2 / ATF-2 qui induisent des courbures de 8, 2 et 3 degrés (Kerppola et Curran, 1993).

L'induction de courbures dans l'ADN au niveau d'un promoteur pourrait théoriquement rapprocher des facteurs de transcription positionnés sur des sites éloignés et contribuer à la formation du complexe d'initiation de la transcription.

## **2.9. Interaction physique avec la machinerie transcriptionnelle.**

### **2.9.1. Le complexe d'initiation de la transcription.**

L'initiation de la transcription par l'ARN polymérase II nécessite la formation préalable d'un complexe multiple d'initiation. Ce complexe d'initiation comporte typiquement la **TBP** (« protéine liant la boîte TATA ») et les facteurs **TFIIB**, **TFIID**, **TFIIE**, **TFIIF** et **TFIIH**. Parmi ces facteurs, seuls la TBP et **TFIID** semblent lier l'ADN selon une spécificité de séquence (Roeder, 1996). **TFIIB** est un facteur qui lie la TBP et qui recrute le complexe préformé **TFIIF** / ARN polymérase II (Roeder, 1996).

La TBP et des facteurs **TFII** peuvent également lier des facteurs **TAFs** (« facteurs associés à la TBP »). Les **TAFs** sont des coactivateurs qui interagissent avec des domaines activateurs de facteurs de transcription. Ils intègrent les effets coopératifs entre plusieurs facteurs de transcription (Verrijzer et Tjian, 1996).

### **2.9.2. Interaction avec la machinerie transcriptionnelle.**

Les facteurs c-Fos et c-Jun lient spécifiquement et stablement la **TBP**, *in vitro* et *in vivo* (coimmunoprécipitation). Les domaines b et Zip sont tous deux nécessaires et la région bZip est suffisante pour l'interaction (Ransone, et al., 1993). FosB, mais pas FosB2 ou Fra1, interagit physiquement avec la TBP *via* un motif « TBM » (résidus 1-55 de FosB). La délétion du motif TBM réduit de 35% l'activité transcriptionnelle d'une construction GAL4-FosB. La TBP lève l'incapacité (« squelching ») de GAL4-FosB à induire la transcription à concentration élevée, mais pas celle d'une construction sans motif TBM (Metz, et al., 1994b).

c-Fos contient également un motif TBM fonctionnel pour la liaison à TBP *in vitro* et pour l'induction de la transcription. La délétion du motif TBM réduit de 75% l'activité d'une construction GAL4-c-Fos coexprimée avec TBP. c-Fos lie également le complexe **TFIID** (Metz, et al., 1994a).

Le dimère c-Fos / c-Jun interagit physiquement avec les protéines **TFIIE-34**, **TFIIF-30** et **TFIIF-74**. La dimérisation permet un changement de conformation du domaine b qui lui confère cette capacité d'interaction. Un seul domaine b au sein d'un dimère est suffisant. L'inhibition de la transcription *in vitro* par un excès de complexe c-Fos / c-Jun est levée par l'addition de **TFIIE**, ce qui montre que l'interaction est fonctionnelle pour l'initiation de la transcription (Martin, et al., 1996).

Une autre étude *in vitro* montre que les membres de la famille Jun interagissent physiquement avec la **TBP** et la protéine **TFIIB**. c-Jun lie TBP par son domaine bZip C-terminal indépendamment de son état de phosphorylation et par sa région N-terminale transactivatrice. Il lie TFIIB également par le domaine bZip. La mutation ponctuelle des résidus leucine du domaine Zip révèle que ces interactions nécessitent la dimérisation de c-Jun (Franklin, et al., 1995).

Un système de transcription *in vitro* n'a pas permis de mettre en évidence quel facteur permettrait d'obtenir une activité transcriptionnelle plus élevée quand c-Jun est phosphorylé (Baker, et al., 1992). Cependant, nous remarquons que d'une part les protéines **p300** et **CBP** font partie de complexes associés à la TBP *in vivo* (Abraham, et al., 1993, Dallas, et al., 1997) et que d'autre part CBP lie spécifiquement la protéine c-Jun phosphorylée et est un cofacteur de c-Jun dans l'induction de la transcription (§ 5.2.3).

### **2.9.3. Conclusion.**

Plusieurs études ont mis en évidence des interactions physiques de membres de la famille AP-1 avec TBP ou des facteurs TFII du complexe d'initiation de la transcription. Ces interactions ne nécessitent pas la présence de facteurs TAFs intermédiaires. Ces résultats nous suggèrent une implication des facteurs AP-1 dans l'initiation de la transcription à un niveau particulièrement fondamental. La capacité à lier TPB ou des facteurs TFII pourrait être un paramètre contribuant aux différences fonctionnelles observées entre les différents facteurs Fos-Jun.

De plus, les protéines CBP et p300 peuvent médier la transcription induite par AP-1. CBP et p300 prennent part à des complexes avec la TBP et CBP interagit spécifiquement avec la protéine c-Jun phosphorylée. CBP présente donc les propriétés fonctionnelles caractéristiques d'un TAF.

## **2.10. Régulation de l'expression des gènes fos et jun.**

### **2.10.1. Introduction.**

Nous présentons dans cette section des mécanismes de régulation de la transcription des gènes des familles *fos* et *jun*. Comme nous l'avons vu, les familles JNK et FRK de MAP kinases sont impliquées dans la régulation de l'activité transcriptionnelle des facteurs de la famille AP-1 (§ 2.5.2). Une autre famille de MAPKs, appelée ERK, et les tyrosine kinases JAKs sont impliquées dans l'induction de la transcription du gène *c-fos* via la phosphorylation de facteurs de transcription liant les sites SRE et SIE (Karin, 1995). L'autorégulation positive du gène *c-jun* met en jeu la famille JNKs.

### 2.10.2. Régulation de *c-jun* via les TREs.

Une étude par délétion montre que le promoteur de *c-jun* est induit par le TPA et par son propre produit *c-Jun*, *via* le site *c-jun1-TRE* (-71, TGACATCA) (Angel, et al., 1988). Par ailleurs, un complexe activateur *c-Jun / ATF-2* lie le site *c-jun2-TRE* (-189, TTACCTCA) (van Dam, et al., 1993). Ces deux TREs sont constitutivement occupés par des complexes protéiques contenant *c-Jun*, dont l'activité est induite par la phosphorylation de *c-Jun* (Hagmeyer, et al., 1993, Rozek et Pfeifer, 1993). Comme nous l'avons vu, *c-Jun* et *ATF-2* sont rapidement phosphorylés par les kinases JNKs en réponse à des stimuli extracellulaires (§ 2.5.2).

### 2.10.3. Régulation de *junB*.

Le promoteur de *junB* et une région en aval du gène présentent de nombreux éléments régulateurs que nous allons présenter brièvement. Les études portent sur le gène de souris, sauf mention contraire dans un seul cas (rat).

Le promoteur de *junB* est induit par le sérum, le TPA et la PKA activée. Cette induction nécessite une boîte **CAAT** (-66 GCCAAT), une **boîte GC** (-95/-80) et un site **IR** (-57 AGTGCACT). Le site IR (« répétition inversée ») est un nouvel élément capable d'induire un promoteur hétérologue en réponse au TPA et à la PKA (de Groot, et al., 1991a).

Ets1 et Ets2 induisent l'expression du gène *junB*. Ets1 lie *in vitro* 5 sites **EBS** du promoteur de *junB* (-827, -786, -602, -146, -115). L'oncogène *Ha-ras* ou une kinase ERK1 activée augmentent cette induction, ce qui suggère que la famille Ets joue un rôle dans l'induction de *junB* par une voie passant par *ras* et des MAPKs (Coffer, et al., 1994). Le gène *c-fos* est également régulé par ERK et des membres de la famille Ets appelés TCFs (§ 2.10.5.1.1).

Dans le promoteur de rat, 2 SREs (« élément de réponse au sérum », § 2.10.5.1.1) sont les cibles de 2 voies de signalisation différentes. Le TPA, le FGF, le PDGF induisent le **SRE1** (-1441 CCTAATATGG), site identique à celui de *c-fos* (-305/-314), mais pas le **SRE2** (situé entre -3100 et -2500). Ces SREs ne sont par contre pas suffisants pour médier l'induction du promoteur par l'EGF (Kitabayashi, et al., 1993).

Le site IR est également nécessaire à une induction optimale *via* un site **SRE** (+2088 CCATATATGG) et un site **CRE like** (+2113 TGACGCCA), lors de la réponse du gène *junB* (-91/+2176) au sérum, au PDGF, au FGF et au TPA. Ce site SRE semble redondant par rapport aux sites SRE1 et SRE2. Chez l'homme, un ADNc s'arrête en (+1806), ce qui suggère que ces sites sont dans une région non transcrite (Perez-Albuerne, et al., 1993).

L'IL-6 induit *junB* *via* un élément **JRE-IL6** qui contient un site **EBS** (-146 GCTTCCTG) et un site **CRE like** (-134 TGACGCGA) séparés par 4 bases. Le site EBS lie un facteur de la famille Ets et le site CRE like lie faiblement plusieurs membres de la famille ATF-CREB. Cette association semble former la base de la sélectivité et de l'efficacité de la réponse à l'IL-6 et de l'absence de réponse de ce site au TPA et aux signaux passant par

Ha-Ras, Raf1 ou la PKC. La voie de signalisation utilisée par l'IL-6 est sensible à H7, un inhibiteur des kinases PKA, PKC et PKG (Nakajima, et al., 1993).

Le site EBS (-146) chevauche largement un site **APRF** (-144 TTCCTGACA) de liaison des **facteurs Stat**. Ouvrons une parenthèse pour présenter ces facteurs. Stat1 $\alpha$  est le premier membre de la famille Stat (« transducteurs de signal et activateurs de la transcription »). Il serait phosphorylé par la kinase JAK1, elle-même activée par auto-phosphorylation au contact du récepteur de l'INF- $\alpha$  ou de celui de l'INF- $\gamma$ . Cette voie de signalisation spécifique est donc particulièrement courte. Il existe en fait une famille de voies de signalisation dites « **JAK/STAT** », induites par des ligands peptidiques et leurs récepteurs, comme par exemple l'IL-6, l'EGF ou le PDGF. Ces voies aboutissent au niveau de sites semblables aux sites **GAS** (« site activé par l'INF- $\gamma$  ») de consensus TTnCnnnAA (Darnell, et al., 1994). Ce consensus est également appelé site APRF. APRF (« *acute-phase response factor* ») est le facteur de transcription Stat3 qui lie des IREs (« élément de réponse à l'IL-6 ») dans plusieurs promoteurs (Akira, et al., 1994). Le nom des JAKs 1 et 2, découvertes simultanément, signifie « Janus kinase » (Wilks, et al., 1991). Janus est le dieu gardien des portes chez les romains, représenté avec deux têtes regardant dans des directions opposées. Il est aussi le 6<sup>e</sup> satellite de Saturne qui partage son orbite avec Epimetheus, à une distance de 50 km, inférieure à leur taille. La découverte de Janus est attribuée à l'astronome français Audouin DOLLFUS en 1966. L'existence de deux lunes n'a cependant été déterminée qu'en 1978 et c'est la sonde Voyager qui a permis à R. WALKER de découvrir Epimetheus en 1980.

La région (-196/-91) du promoteur de *junB* constitue un **IRE** reconnu par différents facteurs de transcription. Le complexe formé sur cette région contient le facteur **APRF/Stat3**. La liaison d'un complexe sur l'IRE nécessite une activité tyrosine kinase. L'induction transcriptionnelle met de plus en jeu une autre voie, sensible à l'inhibiteur H7 (Coffer, et al., 1995).

La région avale du gène *junB* présente également un site **APRF** (+2139 TTCCGGGAA) chevauchant un site **NF $\kappa$ B like** (+2143 GGAATCCCC). Cette région participe à l'expression basale et à l'induction par l'IL-6. Le facteur NF $\kappa$ B lie constitutivement ce site alors que la liaison du facteur APRF/Stat3 est inductible. (Brown, et al., 1995).

#### 2.10.4. Régulation de *junD*.

JunD est exprimé constitutivement dans de nombreuses cellules. Un site **Oct** (motif « octamère » reconnu par des facteurs à homéodomaine POU) (-97 ATGCAAAT) est le déterminant principal de l'activité transcriptionnelle basale du promoteur de souris. Le TPA ou c-Jun induisent une région contenant un site **TRE like** (-53 TGAGCTCA) et une **boîte GC** (-63 GCGGGGGCGG) quand cette région est placée en amont d'un promoteur minimal TK. Cependant, le site Oct est responsable de l'absence d'induction du promoteur de *junD* par le TPA (de Groot, et al., 1991b).

Dans le promoteur humain, la région activatrice a été localisée en (-194/-83). Elle contient également une boîte GC et un site Oct. Le site TRE like (-53 TGAGCTCA) est régulé préférentiellement par JunD, ce qui génère une boucle autorégulatrice qui pourrait contribuer à l'expression constitutive (Berger et Shaul, 1994).

### 2.10.5. Régulation de *c-fos*.

#### 2.10.5.1. Régulation via les sites adjacents SRE et FAP.

##### 2.10.5.1.1. Induction par le SRF et les TCFs.

Le promoteur de *c-fos* humain présente un élément **SRE** constitué d'un site EBS (-322 CAGGATGT) adjacent à un site (-314 CCATATTAGG) de liaison du SRF (« facteur de réponse au sérum ») qui est une boîte **CArG** de consensus CC(A/T)<sub>6</sub>GG. Le SRE est également appelé **DSE** (« *dyad symmetry element* »), en raison des séquences inversées (-319 GATGTCC) et (-306 GGACATC). Le site SRE est lié par le **SRF** et un partenaire **TCF** (« facteur de complexe ternaire ») qui est un membre de la famille Ets : **Elk1**, **Sap1a**, **Sap2/Net**, **Fli1** ou la protéine de fusion **EWS-Fli1** (Treisman, 1992, Treisman, 1994, Price, et al., 1995, Magnaghi, et al., 1996).

La liaison de p62<sup>TCF</sup>/Elk1 sur le SRE nécessite la présence du SRF (Shaw, et al., 1989b). Elk1 et SRF interagissent physiquement *in vitro* (Shore et Sharrocks, 1994). La formation *in vitro* d'un complexe ternaire avec Sap2 est inhibée par le domaine appelé NID et d'autres séquences C-terminales de Sap2 (Maira, et al., 1996). Elk1 et Sap1a, mais pas Sap2, lient efficacement le SRE *in vivo*. Le domaine transactivateur C-terminal des facteurs Elk1, Sap1a et Sap2 est activé par phosphorylation (§ 3.4.2.2). Cette phosphorylation favorise la formation du complexe ternaire.

La protéine **CBP** est un coactivateur de Sap1a (§ 5.2.4.2). La phosphorylation de Sap1a par une MAPK est nécessaire à la coopération avec CBP dans l'induction de la transcription, mais pas à l'interaction physique avec CBP. La protéine E1A de l'adénovirus (§ 1.9.2.7.1) inhibe à la fois la transcription induite par Sap1a et celle induite par le facteur CREB phosphorylé par la PKA (§ 2.10.5.2). Ces deux voies ne sont pas coopératives et semblent simplement intégrées par CBP (Janknecht et Nordheim, 1996).

##### 2.10.5.1.2. Inhibition par c-Fos.

Plusieurs études montrent que **c-Fos** inhibe la transcription du gène *c-fos* induite par le sérum. Cette propriété explique la cinétique de l'induction transitoire de *c-fos* par le sérum, sur une durée de 45 min, avec un maximum 15 min après la stimulation. Le SRE suffit à conférer cette caractéristique à un promoteur (Konig, et al., 1989, Shaw, et al., 1989a, Rivera, et al., 1990). La phosphorylation des résidus Ser<sup>243</sup> et Ser<sup>249</sup> de c-Fos est nécessaire à cette inhibition (Ofir, et al., 1990). **c-Fos** et **c-Jun** coopèrent à la répression du promoteur de *c-fos* (Konig, et al., 1989). La répression par c-Fos nécessite le domaine Zip (Lucibello, et al., 1989). **FosB**,

mais pas la forme courte FosB2 (§ 2.4.1.1), inhibe l'induction de *c-fos* (Dobrazanski, et al., 1991, Nakabeppu et Nathans, 1991).

c-Fos inhibe l'expression de son propre gène, mais aussi celle de *egr1* et *egr2* (« gène de réponse précoce de la croissance »). Les promoteurs de *c-fos* et *egr1* contiennent respectivement 1 et 6 boîtes CArG qui sont les cibles de cette inhibition. L'inhibition de *egr1* nécessite les 27 résidus C-terminaux de c-Fos, mais pas le domaine Zip de dimérisation (Gius, et al., 1990). Ouvrons une parenthèse pour présenter le facteur de transcription Egr1. Son DBD à doigt de zinc reconnaît un élément riche en GC appelé GCE. Egr1 induit généralement la transcription *via* cet élément mais peut aussi interagir avec des corépresseurs. Il est impliqué dans la croissance et la différenciation cellulaire, en particulier dans la réponse immune. Sa propriété de suppresseur de tumeur est inattendue pour un gène de réponse précoce. Elle s'explique par sa capacité à induire le gène du TGF- $\beta$ 1. Egr1 entre en compétition avec Sp1 lorsque leurs sites cibles se chevauchent dans des régions riches en GC. Egr1 inhibe la transcription induite par Sp1 et les facteurs Sp1 déplacés induisent le gène *egr1* (Liu, et al., 1996a, Liu, et al., 1996b).

#### 2.10.5.1.3. Induction par le site FAP.

Le promoteur humain de *c-fos* contient également un site AP-1 like/CRE like fonctionnel désigné **FAP** (« site de liaison de AP-1 de *c-fos* ») de séquence (-299 TGC GTCA) séparé par 5 bases du site SRE (-322/-305). L'induction par la PKC est supprimée par l'injection d'oligonucléotides SRE ou FAP. L'induction par le sérum est également inhibée par un oligonucléotide SRE, mais est retardée et prolongée par un oligonucléotide FAP (Gauthier-Rouviere, et al., 1992). Dans des cellules en croissance, le SRE et le FAP induisent additivement la transcription, mais ils coopèrent à la répression de la transcription dans des cellules quiescentes (Morgan et Birnie, 1992). Le FAP semble la cible de différents facteurs ayant des propriétés régulatrices différentes, selon une spécificité de type cellulaire (HeLa, PC12), et distincts des facteurs liant un site AP-1 ou un site CRE (Velcich et Ziff, 1990).

Selon les types cellulaires, le niveau basal d'expression de *c-fos* est faible ou élevé. Une faible activité s'explique par la liaison du SRF sur le SRE. La délétion ou la mutation du SRE induit la transcription. Cette induction est supprimée par la délétion supplémentaire du site FAP. *In vitro*, la liaison du SRF sur le SRE et l'occupation du FAP sont mutuellement exclusives (Shaw, et al., 1989a).

#### 2.10.5.1.4. Conclusion.

La région SRE-FAP du promoteur de *c-fos* présenterait donc les activités suivantes :

- inhibition en présence de SRF et en l'absence de TCF activé,
- induction transitoire en présence de SRF et d'un TCF activé par phosphorylation,

- inhibition par c-Fos, à laquelle c-Jun coopère, selon des modalités qui suggèrent une interaction physique de c-Fos avec le SRF,
- activité constitutive contrôlée par l'occupation du site FAP (à la fois de type AP-1 like et CRE like), exclusive de l'occupation du SRE par le SRF.

#### 2.10.5.2. Régulation via le CRE.

Les protéines de la famille **ATF-CREB** sont exprimées constitutivement, à l'exception de CREM. Elles sont activées par phosphorylation et induisent la transcription du promoteur du gène *c-fos* humain via un site CRE like (-64 TGACGTTT). CREB est activée par des processus physiologiques très variés utilisant plusieurs voies de signalisation. CREB est activée par phosphorylation de la Ser<sup>133</sup> par plusieurs kinases. En réponse aux facteurs de croissance ou au stress, CREB est phosphorylée par la **PKA** (« protéine kinase dépendante de l'AMPc ») ou par la **MAPKAP kinase-2** (« protéine kinase activée par une MAPK », en l'occurrence par la p38 MAPK) (Swope, et al., 1996, Tan, et al., 1996). Dans les cellules du système nerveux central, CREB est phosphorylée par la PKA, par la **RSK2** (une kinase de la famille de la p90<sup>RSK</sup>) et par la **CaM-KII** (« kinase dépendante du calcium et de la calmoduline » ; la calmoduline est le récepteur intracellulaire du calcium) (Greenberg, et al., 1992, Xing, et al., 1996).

**ATF-1** est phosphorylé sur la Ser<sup>63</sup> par la **MAPKAP kinase-2** (Tan, et al., 1996).

**ATF-2** est phosphorylé par **JNK** sur les Thr<sup>69</sup> et Thr<sup>71</sup>. L'expression d'un dominant négatif de JNK inhibe l'activité transcriptionnelle d'ATF-2 (Gupta, et al., 1995). ATF-2 est également phosphorylé directement par la **p38 MAPK** *in vitro* (Raingeaud, et al., 1995) et *in vivo* (communication personnelle de N. Jones à R. Treisman) (Treisman, 1996).

Le gène **CREM** (§ 2.6) est le seul membre inductible de la famille ATF-CREB. Il code des protéines appelées ICER (« répresseur inductible précoce de l'AMPc ») qui sont probablement impliquées dans le caractère transitoire de l'induction de gènes via l'AMPc (Lalli, et al., 1996). Alors que c-Fos inhibe la transcription de *c-fos* induite par le sérum (§ 2.10.5.1.2), mais pas l'induction par l'AMPc, CREM lie le CRE sous forme d'un hétérodimère avec CREB et inhibe l'induction de *c-fos* par l'AMPc (Foulkes, et al., 1991).

#### 2.10.5.3. Régulation par le GMPc.

Pour la première fois il a été montré que la voie de signalisation du GMP cyclique et de la PKG régule la transcription. L'expression de la PKG dans des cellules déficientes induit le promoteur de *c-fos* humain d'une manière dépendante du GMPc, via les sites **SRE**, **FAP** et **CRE**. En l'absence de PKG, l'AMPc, mais pas le GMPc, induit l'activité transcriptionnelle d'une protéine GAL4-CREB (Gudi, et al., 1996).

#### 2.10.5.4. Régulation via le SIE.

Le promoteur de *c-fos* humain présente un site SIE (-348 TTCCCGTCA), ou élément de réponse au SIF (« facteur inductible par *sis* »). *c-sis* est le gène cellulaire codant la chaîne B du PDGF. Le site SIE est un site du type APRF (§ 2.10.3), ciblé par les facteurs d'une voie JAK/STAT. Contrairement au site SRE inductible par le sérum, les esters de phorbol et le PDGF, le SIE est induit seulement par le **PDGF**. L'induction *via* le SIE nécessite également la région (-100/-57) (Wagner, et al., 1990).

Le SIE joue un rôle mineur dans l'induction par l'**EGF** (Leaman, et al., 1996). Les facteurs de transcription Stat1 et Stat3 sont activés en réponse à l'EGF dans des cellules transformées par *v-src*. La kinase Src s'associe à Stat3 *in vivo* et le phosphoryle *in vitro* (Cao, et al., 1996) (figure 10, page 86).

#### 2.10.5.5. Régulation post-transcriptionnelle.

La durée de vie de l'ARNm *c-fos* est de quelques minutes, l'une des plus courtes connues chez les eucaryotes. L'instabilité est conférée indépendamment par une région 3' qui présente deux séquences riches en nucléotides A/U et par des éléments de la région traduite. Des inhibiteurs de la synthèse protéique stabilisent les ARNm *c-fos*. L'instabilité médiée par la région codante nécessite l'assemblage d'un ribosome à l'extrémité 5' et probablement la traduction (Schiavi, et al., 1994).

L'observation des ARNm *c-fos* dans une cellule ne s'accompagne pas nécessairement d'une quantité détectable de protéine. Selon le contexte cellulaire, la région 3' peut également jouer un rôle inhibiteur de la traduction (Veyrone, et al., 1995).

*In vivo*, des tumeurs cartilagineuses ne sont observées chez des animaux transgéniques *c-fos* que si la partie 3' non codante est supprimée. L'accumulation d'une quantité suffisante de protéine c-Fos serait permise par la stabilisation des ARNm ou par la stimulation de la traduction (Blanchard, 1992).

#### 2.10.6. Régulation de *fosB*.

Le promoteur de *fosB* murin contient un site **CArG** de liaison du SRF (-427 CCTTATATGG) et un site **FAP** (-412 TGCGTCA) dont les positions relatives sont identiques à celles constatées dans le promoteur humain de *c-fos*. Il ne présente pas de site EBS adjacent, contrairement au cas du SRE de *c-fos*. Une étude par délétion suggère que l'induction par le sérum est médiée par un site **AP-1 like** (-911 TGAGTAC), un site **CRE like** (-477 TGACGTAA), le site CArG, mais pas le FAP. FosB et c-Fos inhibent l'activité du promoteur de *fosB* (Lazo, et al., 1992). Ces mécanismes régulateurs sont en partie semblables à ceux observés pour *c-fos*.

### 2.10.7. Régulation de *fra1* et de *fra2* via des sites AP-1.

L'expression constitutive de c-Fos, FosB, Fra1 ou c-Jun dans des fibroblastes de rat stimule l'expression du gène *fra1*. Une recherche informatique de sites dans le promoteur de *fra1* (-710/+1) a révélé uniquement la présence d'une boîte TATA et d'un site Sp1. L'expression basale de *fra1* et son expression induite par AP-1 sont supprimées par la délétion d'une région de 60 pb du premier intron, région qui contient deux sites AP-1 like (+1120 CGAGTCA, +1134 CGAGTCA) et un site AP-1 (+1148 TGAGTCA). Deux autres sites AP-1 (+198, +2429) n'interviennent pas (Bergers, et al., 1995).

L'induction de *fra2* par le sérum se prolonge plus longtemps que celle de *c-fos*. Elle ne nécessite par le site SRE, mais un site AP-1 et un site CRE like. En l'absence d'induction, le site AP-1 est lié par un dimère Fra2 / c-Jun. Après 60 à 120 min de traitement par le sérum, l'activité transcriptionnelle s'accompagne de la liaison d'un dimère c-Fos / c-Jun sur ce site. Le complexe Fra2 / c-Jun redevient ensuite prédominant (Sonobe, et al., 1995).

Ces résultats indiquent que les gènes *fra1* et *fra2* sont principalement sous le contrôle d'AP-1, contrairement aux autres membres des familles Fos et Jun.

### 2.10.8. Conclusion.

Les gènes des familles *fos* et *jun* sont des gènes de réponse précoce à la majorité des stimuli extracellulaires, à l'exception de *junD*. La complexité de la régulation de leurs promoteurs est à l'image des cinétiques spécifiques de leur expression différentielle en réponse aux agents inducteurs.

### 2.11. Conclusion.

Les facteurs de transcription des familles Fos-Jun et ATF-CREB sont des protéines bZip formant entre elles des dimères spécifiques. Ces facteurs régulent différemment la transcription de nombreux gènes *via* des sites semblables, TRE ou CRE. Ils répondent rapidement aux stimuli extracellulaires qui contrôlent leur phosphorylation par l'intermédiaire de kinases spécifiques. Ils interagissent physiquement avec d'autres facteurs de transcription et avec la machinerie transcriptionnelle, directement ou par l'intermédiaire de leurs coactivateurs CBP et p300.

L'activation des protéines Fos et Jun présynthétisées s'accompagne également d'une régulation complexe de la transcription des gènes de cette famille. Plusieurs d'entre eux sont régulés positivement ou négativement par des protéines Fos-Jun. Une cascade d'inductions et d'inhibitions contrôle l'expression et l'activité de ces facteurs de transcription qui régulent différemment de nombreux gènes cibles, en particulier les métalloprotéases de la matrice.

### 3. Les facteurs de transcription Ets.

#### 3.1. La famille.

Les virus de leucémie aviaire aiguë AMV et E26 présentent une séquence *myb* responsable de leur capacité d'induction de leucémies myéloïdes chez le poulet. Contrairement à AMV, le virus **E26** contient également une séquence *ets* (« E twenty-six specific » ou « E26 transformation specific ») corrélée à sa capacité d'induction de leucémies érythroïdes (Leprince, et al., 1983, Nunn, et al., 1983). Ces séquences sont traduites en une protéine de fusion  $p135^{\delta gag-myb-ets}$ . Ets et Myb sont des facteurs qui coopèrent à l'induction de la transcription (§ 3.7.2.1).

Le gène cellulaire *c-ets1* est l'homologue de l'oncogène viral *v-ets*. Ets1 est le fondateur de la famille Ets dont de nombreux membres sont connus aujourd'hui (figure 11). Les facteurs de transcription de la famille Ets sont caractérisés par le domaine conservé ETS de 85 acides aminés. C'est un domaine original de liaison à l'ADN (DBD). Le domaine ETS est généralement positionné dans la partie C-terminale des protéines Ets, ou dans la partie N-terminale chez Elk1, Sap1a et Elf1. Le domaine ETS est structurellement apparenté au DBD de Myb et présente un motif hélice-tour-hélice (Laget, et al., 1993, Donaldson, et al., 1996).

La famille Ets est très ancienne dans l'évolution. La construction d'un arbre phylogénétique indique que la duplication des différents groupes a eu lieu avant la séparation arthropodes / vertébrés (Laudet, et al., 1993).

Les facteurs de transcription Ets sont impliqués dans la régulation de la croissance cellulaire, dans la transformation cellulaire, dans l'activation des lymphocytes et sont exprimés au cours du développement (MacLeod, et al., 1992, Duterque-Coquillaud, et al., 1993, Wasyluk, et al., 1993).

#### 3.2. Liaison à l'ADN : les sites EBS.

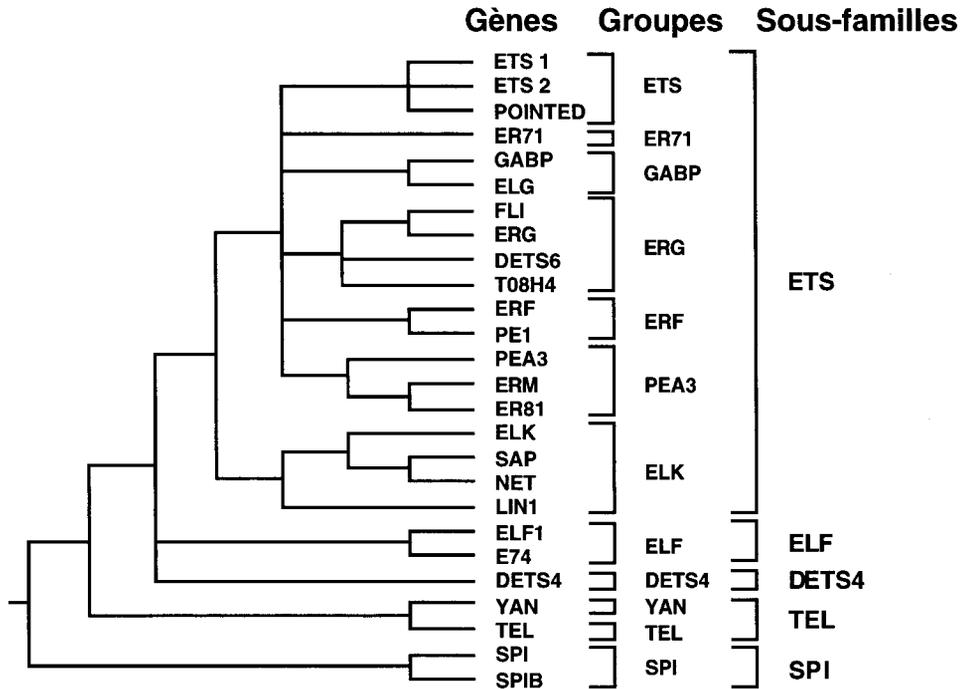
##### 3.2.1. Le site EBS.

La liaison d'oligonucléotides aléatoires par des protéines Ets1 a permis d'identifier la séquence consensus de liaison de Ets1 à l'ADN. Les résultats de trois études sont les suivants :

Ets1 humaine	(A/G)	(G/C)	(C/A)	<b>GGA</b>	<b>A</b>	G	(T/C)	(Fisher, et al., 1991)
Ets1 murine	(A/G)	C	C	<b>GGA</b>	<b>(A/T)</b>	G	(T/C)	(Nye, et al., 1992)
Ets1 aviaire	A	C	(C/A)	<b>GGA</b>	<b>(A/T)</b>	(A/G)		(Woods, et al., 1992)

Ces résultats montrent que la protéine Ets1 lie l'ADN sur des sites appelés EBS centrés autour d'un cœur GGA(A/T). Une étude de retard sur gel combinant la protéine Ets1 murine complète et un délétant montre que Ets1 lie le site EBS en monomère (Nye, et al., 1992).

Les différents facteurs Ets ciblent des séquences semblables mais différentes. De nombreux gènes présentent des sites EBS impliqués dans la régulation de la transcription (MacLeod, et al., 1992, Wasyluk, et al., 1993, Shore, et al., 1996).



**Figure 11.** Classification des membres de la famille Ets.

Le schéma présente un arbre phylogénétique qui classe les membres de la famille Ets par groupes et sous-familles en fonction du niveau de divergence de leurs séquences protéiques (Vincent LAUDET, communication personnelle).

### 3.2.2. Liaison d'une paire de sites EBS.

Dans certains cas, la liaison à l'ADN a lieu avec la coopération de deux sites EBS dont la position relative et l'orientation sont importantes pour la liaison de membres spécifiques de la famille Ets.

L'élément activateur du promoteur de la cytokératine présente 6 répétitions d'un tandem de sites EBS, typiquement EBS1 et EBS2 (CAGGAAGTAGGAACA). Un délétant correspondant au DBD de Ets2 lie *in vitro* EBS1, mais pas EBS2. *In vivo*, une protéine Ets différente de Ets2 lie EBS1. EBS1 et EBS2 coopèrent à l'induction de la transcription (Fujimura, et al., 1994).

Une étude sur l'élément activateur du VIH-1 (virus de l'immunodéficience humaine) montre que Ets1, Ets2 et Fli1 lient faiblement un tandem direct de cœurs TTCC séparés par 4 pb (CT **TTCC GCCT TTCC** GG), mais fortement quand la distance est de 12, 16 ou 20 pb. Au contraire, Ets2 lie fortement un tandem inversé du promoteur de GATA-1 contenant deux cœurs GGAA et TTCC séparés par 4 pb (GA **GGAA GGCC TTCC** TT). La liaison est perdue pour une distance de 12, 16 ou 20 pb. Ets1 lie ces oligonucléotides avec une affinité qui décroît avec la distance. Fli1 a un comportement inverse, puisqu'il ne lie ce tandem inversé que pour une distance de 12, 16 ou 20 pb (Hodge, et al., 1996).

Ets1, ainsi que Ets2, lie un oligonucléotide du promoteur de l'anti-oncogène p53 qui présente un tandem inversé de sites EBS (AC **GGAA AGCC TTCC** TA). La liaison de Ets1 et Ets2 décroît rapidement et s'annule quand la distance de 4 pb entre les cœurs GGAA et TTCC est augmentée à 12, 16 et 20 pb. Au contraire, la liaison de Fli1 est plus forte quand la distance augmente (Venanzoni, et al., 1996).

Nous avons observé expérimentalement que la protéine de fusion GST-Ets2 lie le promoteur de la stromélysine-1 au niveau d'un tandem inversé de sites EBS (-216 CA **GGAA GCAC TTCC** TG) (§ 4.1, figure 4, d). La mutation de ces 2 sites supprime la liaison de GST-Ets2 au fragment (-275/-101) et la mutation d'un seul site suffit à rendre la liaison extrêmement faible. Ets2 induit le promoteur de la stromélysine-1 *via* ce tandem EBS inversé (Butticè et Kurkinen, 1993).

D'un point de vue transcriptionnel, un gène rapporteur contrôlé par un tandem inversé de cœurs GGAA et TTCC est induit par Ets2 pour une distance de 4 ou 6 pb (x 14-17) et plus faiblement pour une distance de 10 ou 14 pb ou pour un seul site EBS (x 2-3) (Galang, et al., 1994).

Ces résultats mettent en évidence la liaison à l'ADN des facteurs Ets1, Ets2, Erg et Fli1 sur 2 sites EBS voisins. La liaison de chaque facteur est spécifique et dépend de la distance et de l'orientation relative de ces 2 sites. Des résultats obtenus avec Ets2 suggèrent que l'activité transcriptionnelle induite *via* un tandem EBS est fonction de la capacité de Ets2 à lier l'ADN.

### 3.2.3. Régulation intramoléculaire de la liaison à l'ADN.

Les protéines Ets1 et Ets2 présentent deux domaines inhibiteurs de la liaison à l'ADN, situés de part et d'autre du DBD. Ces domaines sont appelés **DBID1** (Wasylyk, et al., 1992) et **DBID2** (Hagman et Grosschedl, 1992, Lim, et al., 1992). Le domaine DBID1 est en position N-terminale par rapport au DBD et comporte 61 résidus chez Ets1 et Ets2 (homme, poulet). Il n'est pas conservé chez les protéines isoformes Erg. Le domaine DBID2 est situé à l'extrémité C-terminale de Ets. Il est constitué de 13 résidus chez Ets1 et Ets2 (homme, poulet) et n'est pas conservé chez Erg qui présente une région C-terminale adjacente au DBD de 75 résidus.

Le domaine DBID1 est absent de la protéine virale v-Ets et le domaine DBID2 est remplacé par 16 résidus non conservés. v-Ets ne présente pas d'activité intramoléculaire inhibitrice de la liaison à l'ADN.

### **3.2.4. La liaison à l'ADN induit un changement de conformation.**

La liaison de Ets1 à l'ADN s'accompagne du déploiement d'une hélice  $\alpha$  du domaine DBID1 (Petersen, et al., 1995). La délétion du DBID2 induit un changement de conformation du DBID1 identique à celui observé lors de la liaison à l'ADN. Les domaines DBID1 et DBID2 coopèrent à l'inhibition (Jonsen, et al., 1996). La détermination de la structure de la région C-terminale de la protéine Ets1 de souris par résonance magnétique nucléaire montre que le petit domaine DBID2 interagit physiquement avec les domaines DBD et DBID1, au bord de leur surface de contact. Ce résultat explique la coopération des domaines DBID1 et DBID2 dans l'inhibition de la liaison à l'ADN (Donaldson, et al., 1996).

Le changement de conformation du DBID1 permet non seulement l'interaction du DBD avec l'ADN, mais il est susceptible d'exposer un domaine protéique qui pourrait interagir avec un autre facteur de transcription. Une telle interaction protéique pourrait rendre la liaison de Ets à l'ADN à la fois plus stable et plus spécifique. Ce modèle est en accord avec un ensemble de données qui indiquent que les facteurs Ets sont des modulateurs de la transcription qui agissent avec des partenaires (Crépieux, et al., 1994) (§ 3.7).

### **3.3. Les domaines régulateurs de l'activité transcriptionnelle.**

Les gènes *ets1* et *ets2* sont homologues et sont très conservés chez les mammifères (Watson, et al., 1988). Les gènes de poulet et de mammifère présentent des régions fonctionnelles semblables : une région C-terminale contrôlant la liaison à l'ADN (domaines DBID1, DBD, DBID2) et une région N-terminale contrôlant l'activité transcriptionnelle (Schneikert, et al., 1992, Chumakov, et al., 1993, Albagli, et al., 1994). Une analyse détaillée des protéines Ets1 (p68) et Ets2 (p58) de poulet révèle trois domaines adjacents contrôlant l'activité transcriptionnelle. Le domaine N-terminal **R I** et le domaine central **R III** sont transactivateurs. Le domaine intermédiaire **R II** inhibe l'activité de R I et induit celle de R III.

Des protéines tronquées exprimant le DBD de Ets1 ou de Ets2 lient plus efficacement l'ADN que les protéines Ets complètes et entrent en compétition avec elles. Ne contenant pas de domaine transactivateur, ces délétants n'induisent pas la transcription et se comportent comme des dominants négatifs de la famille Ets (Wasylyk, et al., 1994).

### **3.4. Régulation par phosphorylation.**

#### **3.4.1. Régulation de la liaison à l'ADN.**

Lors de l'activation des lymphocytes B et T, Ets1 est rapidement phosphorylé par une voie qui nécessite les ions calcium. La protéine p54<sup>c-ets1</sup> de poulet exprimée dans des cellules COS traitées par l'ionomycine est phosphorylée au niveau des résidus sérine (S) d'un site SSQSS du domaine **DBID1**. Cette phosphorylation inhibe la liaison à l'ADN *in vitro* (Rabault et Ghysdael, 1994). *In vivo*, Ets1 est hyperphosphorylé pendant la mitose, vraisemblablement au niveau de résidus sérine dans une région **RLTQSWSSQSSFNSLQRVPS** qui contient

2 résidus arginine (R), le site SSQSS et un autre site de phosphorylation RVPS. Le site RVPS est phosphorylé *in vitro* par la **CaM-KII** dont le site consensus est RxxS. Dans cette étude, la phosphorylation de Ets1 n'affecte pas la liaison à l'ADN (Fleischman, et al., 1993). La mutation des sites SSQSS et RVPS en des séquences non phosphorylables augmente d'un facteur 10 la capacité transactivatrice de Ets1 sur l'élément activateur du VIH-1 (Hodge, et al., 1996).

### 3.4.2. Régulation de la capacité transactivatrice.

#### 3.4.2.1. Régulation de Ets1 et Ets2.

Plusieurs études indiquent que Ets1 et Ets2 sont activés par une voie passant par Ras, ce qui suggère l'implication de MAP kinases (figure 10, page 86). L'induction du gène *junB* par Ras est médiée par Ets1 et Ets2 (Coffer, et al., 1994). Des cellules NIH 3T3 (fibroblastes de souris immortalisés) transformées par *ras* sont révertées par des dominants négatifs Ets1, Ets2 ou PU.1 (Wasylyk, et al., 1994). L'induction mitogène de cellules NIH 3T3 par une voie de signalisation passant par *ras* est supprimée par l'expression d'un dominant négatif Ets2 (Langer, et al., 1992).

Un oncogène *c-Ha-ras* activé augmente la capacité transactivatrice de Ets1 et de Ets2 évaluée sur un gène rapporteur contrôlé par une paire de sites EBS-AP-1. Cette activation est médiée par la phosphorylation de la Thr<sup>38</sup> de Ets1 (p54 de poulet) ou la Thr<sup>72</sup> de Ets2 (humaine) (Yang, et al., 1996). L'induction par Raf1 du promoteur du facteur de croissance liant l'héparine semblable à l'EGF (HB-EGF) *via* un site EBS-AP-1 nécessite à la fois l'expression de Ets2 et de la MAP kinase ERK2. ERK fait partie d'une cascade de kinases Raf-MEK-ERK qui s'activent séquentiellement. *In vitro*, **ERK1** et **ERK2** phosphorylent Ets2 sur la Thr<sup>72</sup>. La cinétique de phosphorylation de Ets2 est identique à celle de l'induction transcriptionnelle. Ces observations suggèrent que l'activité transcriptionnelle de Ets2 est induite par la phosphorylation de la Thr<sup>72</sup> par ERK (McCarthy, et al., 1997).

#### 3.4.2.2. Régulation des TCFs.

Le domaine transactivateur C-terminal des facteurs **Elk1**, **Sap1a** et **Sap2** du groupe des TCFs est phosphorylé *in vitro* par **ERK2**, ainsi qu'en culture cellulaire après une stimulation par des facteurs de croissance. La stimulation des kinases ERKs suffit à l'induction du gène *c-fos* (Price, et al., 1995). La phosphorylation de Elk1 par ERK augmente la formation *in vitro* du complexe ternaire avec le SRF sur le site SRE du promoteur de *c-fos* (§ 2.10.5.1.1) et l'activité transcriptionnelle en culture cellulaire (Gille, et al., 1995).

L'irradiation par les U.V. ou l'activation de la kinase MEKK1 induisent aussi la transcription du gène *c-fos*. Contrairement à l'induction par les facteurs de croissance, ces stimuli induisent **JNK1** et **JNK2**, mais pas les kinases ERKs. Ils augmentent la phosphorylation de **Elk1** sur les sites également reconnus par les ERKs et ils stimulent sa

capacité transactivatrice. Les U.V., mais pas le sérum ou les esters de phorbol, induisent la translocation nucléaire de JNK1 (Cavigelli, et al., 1995). Cette étude révèle l'existence de deux voies indépendantes d'induction de Elk1 par des MAPKs, une voie activée par des mitogènes et une voie activée par le stress (figure 10, page 86).

**Sap1a** est aussi activé par les JNKs (Janknecht et Hunter, 1997).

Elk1 et Sap1a sont également activés par la **p38 MAPK** (Price, et al., 1996).

### 3.4.2.3. Régulation de Erf.

Le facteur répresseur Erf de la famille Ets inhibe le promoteur du gène *ets2* (§ 3.7.2.4.4). Dans le cycle cellulaire, la quantité de Erf est constante, mais sa phosphorylation est variable. La transformation par *ras* s'accompagne d'une hyperphosphorylation de Erf et d'une baisse de sa capacité répressive. Erf est phosphorylé *in vitro* par **ERK2** et par la **cdc2/cycline B kinase** (Sgouras, et al., 1995).

### 3.4.3. Conclusion.

L'activité transcriptionnelle de Ets1 et de Ets2 dépend directement de la phosphorylation d'un résidu thréonine et indirectement de la capacité à lier l'ADN, modulable par la phosphorylation de résidus sérine du domaine inhibiteur DBID1. En ce qui concerne la régulation de la liaison à l'ADN, la multiplicité des sites de phosphorylation pourrait théoriquement expliquer les différences observées entre plusieurs études. Des facteurs du groupe TCFs sont également régulés par phosphorylation. Leur phosphorylation conditionne la formation du complexe ternaire ADN / SRF / TCF et l'induction de la transcription. La phosphorylation du répresseur Erf inhibe sa capacité transinhibitrice. Des MAP kinases pourraient donc induire la transcription à la fois en activant des facteurs Ets transactivateurs et en inhibant le répresseur Erf.

### 3.5. Stabilité des protéines.

Nous notons également que le traitement d'une culture cellulaire par le TPA induit l'accumulation de Ets2, selon un mécanisme qui dépend de la PKC. Cette accumulation s'explique par une augmentation de la demi-vie de la protéine qui passe de 20 min à 2 h. Cette étude n'indique pas quel est le mécanisme de la stabilisation de Ets2 (Fujiwara, et al., 1988).

### 3.6. Régulation par réduction ou oxydation.

Dans des extraits nucléaires de la lignée CEM de lymphocytes T humains, la protéine Ets1 est détectée sous 4 isoformes majoritaires (p39, p42, p48, p51), plus 2 isoformes phosphorylées (pp49 et pp52 dérivées des p48 et p51). La p42 se distingue de la p51 à la suite de la perte de l'exon VII par un épissage alternatif. La p39 et la p48 dérivent respectivement de la p42 et de la p51 par une modification de groupes sulphydryl (groupe -SH de la cystéine). La détection des isoformes p39 et p48 est conditionnée par la présence de TLCK

(N<sup>α</sup>-p-tosyl-L-lysine chlorométhyl cétone) dans le tampon de lyse des cellules. Cet agent convertit *in vitro* la p42 en p39 et la p51 en p48 (Fisher, et al., 1992). A notre connaissance, l'existence *in vivo* d'isoformes Ets1 dans des états rédox différents reste hypothétique.

La modification *in vitro* de Ets1 sur des résidus cystéine par la NEM (N-éthyl maléimide) supprime la liaison à l'ADN. L'activité de liaison à l'ADN de v-Ets est particulièrement sensible aux conditions d'incubation *in vitro*, en particulier à la présence d'agents réagissant avec les groupes -SH. Une régulation rédox directe de Ets est envisageable et dépendrait, le cas échéant, de la structure (séquence et conformation) de sa région C-terminale (Wasylyc et Wasylyc, 1993).

### **3.7. Activité transcriptionnelle.**

#### **3.7.1. Activation versus inhibition.**

Dans de nombreuses circonstances, les facteurs de transcription de la famille Ets induisent la transcription. Dans le cas de la régulation des promoteurs des MMPs, des mécanismes inducteurs et un mécanisme inhibiteur contrôlés par des facteurs Ets ont été observés (§ 1.9.1.2, § 4.1). Nous présentons ici plusieurs mécanismes d'induction par Ets en coopération avec d'autres facteurs, ainsi que des mécanismes d'inhibition par Ets de l'inductibilité par un autre facteur ou d'inhibition par un autre facteur de la transcription induite par Ets (§ 3.7.2). Dans certains cas, des interactions protéiques ont été mises en évidence entre Ets et ses partenaires (§ 3.7.3).

#### **3.7.2. Coopérations et antagonismes.**

##### **3.7.2.1. Coopération avec Myb.**

Les séquences *myb* et *ets* confèrent au virus E26 ses propriétés spécifiques (§ 3.1). Dans le but de mettre en évidence un lien fonctionnel entre ces deux oncogènes, un groupe a étudié l'activité de Ets et Myb sur un gène inductible par Myb. *Mim1* (« gène myéloïde 1 induit par v-Myb ») est un gène spécifique des cellules promyéloïdes. Il code une protéine contenue dans les granules et peut être sécrétée. Il est inductible par v-Myb en coopération avec le facteur C/EBP $\beta$ . v-Myb et C/EBP $\beta$  interagissent physiquement et reconnaissent une paire de sites Myb-C/EBP (Mink, et al., 1996).

c-Myb est un faible activateur du promoteur de *mim1* dans les fibroblastes de caille QT6, mais une forme oncogène tronquée est un inducteur fort. La coexpression de **Ets2**, mais pas celle de Ets1, augmente l'induction par c-Myb ou par son délétant. Ets2 seul n'est pas un activateur du promoteur de *mim1*. Ets2 et Myb coopèrent à l'induction transcriptionnelle, mais lient d'une manière indépendante un fragment de 262 pb de ce promoteur (Dudek, et al., 1992).

Une autre étude concerne la régulation de la glycoprotéine **CD13**/aminopeptidase N, un marqueur des progéniteurs des granulocytes/monocytes les plus précoces. Un fragment du

promoteur du gène CD13 présentant un site consensus de liaison de Myb et 3 sites EBS potentiels suffit à conférer à un gène rapporteur la spécificité d'expression de CD13 dans des lignées hématopoïétiques. La protéine c-Myb complète, ainsi que le délétant oncogène, coopère avec **Ets1** ou **Ets2** dans l'induction *via* cette région. Myb et Ets2 sont exprimés de manière endogène par les cellules myéloïdes, ainsi que d'autres facteurs de la famille Ets comme PU.1/Spi1, Fli1 et Elf1 qui ne coopèrent pas avec Myb (Shapiro, 1995).

Ces études montrent que des facteurs Ets spécifiques, Ets1 et Ets2, coopèrent avec Myb à l'induction de gènes spécifiques dans des types cellulaires spécifiques.

### 3.7.2.2. *Coopération avec AP-1 ou antagonisme.*

#### 3.7.2.2.1. Le virus du polyome : induction et inhibition.

Une coopération entre des facteurs Ets et AP-1 a été mise en évidence pour la première fois dans l'induction de l'élément activateur du virus du polyome. Cet élément contient une paire de sites PEA3 (« élément activateur A3 du virus du polyome », un site EBS) et AP-1 like, de séquence **CAGGAAGTGACTAA**. Il est induit par la coopération de **Ets1** (p68 de poulet) et de **c-Fos / c-Jun**, dans des fibroblastes (Wasylyk, et al., 1990).

Au contraire, un test de transcription *in vitro* en présence d'extraits nucléaires de cellules HeLa montre que Ets1 seul (p54 de poulet) n'influence pas l'activité de cet élément. De plus, Ets1 inhibe, *via* le site EBS, la transcription induite par c-Jun. Un délétant artificiel  $\Delta$ VII ne contenant pas le domaine DBID1 codé par l'exon VII n'inhibe pas l'activité de c-Jun. En retard sur gel, Ets1 et c-Jun lient l'élément activateur d'une manière indépendante. v-Ets est un coactivateur faible. v-Ets pourrait induire la transcription de gènes cellulaires en entrant en compétition avec un facteur Ets inhibiteur (Goldberg, et al., 1994).

Ces résultats suggèrent que la régulation de l'élément activateur du virus du polyome par Ets pourrait soit être directe, soit procéder par l'induction de facteurs cellulaires qui seraient responsables des différences observées en culture cellulaire et *in vitro*.

#### 3.7.2.2.2. Induction de MMPs et de TIMP-1.

Comme nous l'avons vu, les facteurs des familles Ets et Fos-Jun coopèrent à l'induction de la collagénase-1, de la stromélysine-1 et de TIMP-1. L'expression de la gélatinase B est également induite *via* des sites EBS et AP-1 (§ 1.9.1.2). Cette capacité à induire à la fois des MMPs et l'inhibiteur TIMP-1 contribue à la complexité de la régulation de l'activité protéolytique extracellulaire.

#### 3.7.2.2.3. Induction de l'uPA.

L'uPA, une protéase physiologiquement apparentée aux MMPs, est également régulé au niveau transcriptionnel par la coopération d'un site AP-1 et d'une paire EBS-AP-1, dans les

cellules HepG2. Cette coopération nécessite une région médiatrice COM présentant des sites UEF1 à 4 (§ 1.9.1.6). Un mécanisme de coopération complexe et original semble ici en œuvre.

#### 3.7.2.2.4. Induction de *junB*.

L'élément de réponse à l'IL-6 du promoteur de *junB* (JRE-IL6) contient un site EBS (-146) et un site CRE like (-134) (§ 2.10.3). La recherche par clonage d'un facteur liant le site JEBS a désigné **ERM**, un membre de la famille Ets. ERM induit la transcription *via* une paire de sites EBS-CRE plus efficacement que *via* un site EBS seul. L'induction est plus élevée en présence de **ATF-2** qu'en présence de CREB. De plus, **c-Jun**, qui forme un dimère avec ATF-2 (§ 2.2.2), coopère avec ERM à l'induction *via* l'élément EBS-CRE. c-Fos, JunB et JunD ne coopèrent pas avec ERM. c-Jun, mais pas c-Fos ou JunD, augmente d'un facteur 20 la transcription induite par une construction GAL4-ERM. Un membre spécifique de la famille AP-1, c-Jun, agit donc directement sur la capacité transactivatrice de ERM (Nakae, et al., 1995).

#### 3.7.2.2.5. Induction du TNF- $\alpha$ .

Le promoteur du TNF- $\alpha$  humain présente un site EBS (-118 GCTTCCTC) et un site TRE like (-106 TGAGCTCA) nécessaires à l'activité basale. Ils coopèrent à l'induction par le PMA et sont les cibles respectives de l'induction par **Ets1** (p68) et **c-Jun** (Kramer, et al., 1995).

#### 3.7.2.2.6. Induction du CD11c.

Le promoteur de l'intégrine de leucocyte CD11c code la chaîne  $\alpha$  d'un récepteur membranaire. Il est régulé par un site AP-1 (-60 TGA $\underline{C}$ TCA) et un site AP-1 like (-50 TGACA $\underline{AAT}$ ) qui opèrent de manière additive l'un avec à l'autre et qui coopèrent avec un site EBS adjacent (-41 TCTTCCTT) (Noti, et al., 1996).

#### 3.7.2.2.7. Induction du « *macrophage scavenger receptor* ».

Le gène du « *macrophage scavenger receptor* » (MSR) est exprimé à partir des derniers stades de la différenciation des monocytes en macrophages. Le MSR est un récepteur multipotent impliqué dans la liaison, l'internalisation et le traitement d'un large éventail de macromolécules chargées négativement (Asaoka, et al., 1993), ainsi que dans l'adhérence des macrophages dans des organes lymphoïdes ou non lymphoïdes (Hughes, et al., 1995) et dans le nettoyage des cellules apoptotiques du thymus (Platt, et al., 1996).

Le TPA induit la différenciation de la lignée THP1 de leucémie monocytique et induit le promoteur du MSR *via* un site AP-1 like et une paire EBS-AP-1 like (AAGGAAAT $\underline{T}$ AGTCA) situés dans un élément activateur vers (-4500) et *via* une autre paire EBS-AP-1 like (-65 TGTGTCAT $\underline{TTCCTT}$ ). Ces 3 éléments lient les facteurs **c-Jun** et **JunB** qui forment des complexes ternaires avec un facteur liant les sites EBS, vraisemblablement **Ets2**. En présence d'un oncogène *ras* activé, c-Jun et Ets2 coopèrent à

l'induction de la transcription d'un gène rapporteur contrôlé par une triple copie de l'élément EBS-AP-1 like (-65), en cellules F9. Ets2 et PU.1 sont exprimés de manière endogène dans les cellules THP1, mais PU.1 n'affecte pas la transcription de ce gène rapporteur (Wu, et al., 1994).

La région (-245/+46) suffit à conférer à un gène rapporteur la spécificité d'expression dans les monocytes et les macrophages. Cette région contient l'élément EBS-AP-1 like (-65), lié par des facteurs Ets préférentiellement exprimés dans les monocytes et les macrophages, et un site (-198 TCACTTCTCTTTTT) ciblé par **PU.1/Spi1**, un membre de la famille Ets exprimé dans les macrophages, les neutrophiles et les lymphocytes B. D'une manière inattendue, SpiB lie faiblement ce site, alors qu'il lie avec une bonne affinité d'autres sites ciblés par PU.1 (Moulton, et al., 1994).

Ces études montrent que le MSR, un gène clé spécifique de la différenciation des monocytes en macrophages, est induit par la coopération de plusieurs facteurs Ets (exprimés dans différentes cellules sanguines spécifiques) et de facteurs Jun.

#### 3.7.2.2.8. Conclusion.

Ces études montrent que des facteurs spécifiques des familles Ets et AP-1 coopèrent à l'induction de nombreux gènes ou, dans le cas d'une étude *in vitro*, sont antagonistes. Nous présentons plus loin des études qui mettent en évidence l'implication d'interactions protéiques Ets / AP-1 dans la régulation de la transcription (§ 3.7.3.4-4).

#### 3.7.2.3. *Coopération avec Sp1.*

L'élément activateur du virus des lymphocytes T humains (**HTLV1**) présente une paire de sites Sp1-EBS (-139 CCACCC ATTCCTC) et un deuxième site EBS (-157 CGGGAAGC). Les facteurs **Ets1** et Sp1 forment un complexe ternaire avec le site Sp1-EBS et coopèrent à l'induction de la transcription. Des paires de sites Sp1-EBS sont présentes dans les promoteurs de plusieurs gènes cellulaires, ce qui suggère la possibilité d'une coopération entre Sp1 et des facteurs Ets dans leur régulation (Gégonne, et al., 1993).

#### 3.7.2.4. *Induction et inhibition via des sites EBS.*

##### 3.7.2.4.1. Régulation de la stromélysine-1.

Nous rapportons que **Erg** inhibe l'activité du promoteur de la stromélysine-1 induite par **Ets2** dans les cellules HepG2, selon un mécanisme qui semble impliquer une interaction protéique de Ets2 avec Erg et la liaison d'un complexe Ets2 / Erg inactif sur le tandem EBS inversé (-216 CAGGAAGC ACTTCCTG) (§ 4.1, § 4.2).

##### 3.7.2.4.2. L'élément activateur du VIH-1.

Dans des fibroblastes NIH 3T3 transformés par *c-ets1*, **Ets1**, mais pas Fli1, induit un gène rapporteur contrôlé par l'élément activateur du VIH-1. Cet élément présente un tandem

EBS direct (CTTTCCGC TGGGGA CTTTCCAG). De plus, **Fli1** inhibe l'induction par Ets1. Dans les cellules COS, au contraire, Fli1 induit ce gène rapporteur (Hodge, et al., 1996).

Ces résultats rappellent l'antagonisme de Ets2 et Erg dans la régulation de la stromélysine-1 *via* un tandem EBS inversé. Les gènes *ets1*, *ets2*, *fli1* et *erg* auraient été engendrés au cours de l'évolution par la duplication, sur un même chromosome, d'un ancêtre commun, suivie de la duplication de cette paire de gènes sur un autre chromosome. Chez l'homme, *ets1* et *fli1* sont situés en 11q23-24, et *ets2* et *erg* en 21q22 (Laudet, et al., 1993). Il est tentant, quoique très hypothétique, d'envisager que cette parenté puisse s'exprimer fonctionnellement dans les propriétés régulatrices remarquables des paires de facteurs de transcription Ets1 / Fli1 et Ets2 / Erg.

#### 3.7.2.4.3. Régulation de la thrombomoduline.

Le TNF- $\alpha$  inhibe l'activité du promoteur de la thrombomoduline dans les cellules endothéliales *via* la région (-76/-56) qui contient 3 sites EBS. Cette région lie un facteur spécifique des cellules endothéliales. Elle est responsable d'une part du niveau basal élevé sensible au TNF- $\alpha$  et d'autre part de l'inductibilité par Ets1 et Ets2 insensible au TNF- $\alpha$ . Ces résultats suggèrent que le TNF- $\alpha$  inhibe la transcription de la thrombomoduline *via* des sites EBS en induisant le blocage d'un facteur Ets spécifique des cellules endothéliales ou d'un coactivateur (von der Ahe, et al., 1993).

#### 3.7.2.4.4. Régulation de *ets2*.

**Erf** (« facteur répresseur de *ets2* ») est un nouveau membre de la famille Ets, isolé en tant que facteur liant un site EBS dans le promoteur de *ets2* (+12 ACTTCCTC). Erf inhibe plusieurs promoteurs, notamment celui de *ets2* (: 30), proportionnellement à son affinité de liaison aux sites cibles. Le DBD de Erf est situé dans la région N-terminale, comme chez les protéines du groupe Elk. Le DBD est cependant le seul domaine de Erf conservé avec les autres facteurs Ets (Sgouras, et al., 1995). Erf est régulé par phosphorylation (§ 3.4.2.3).

#### 3.7.2.5. Antagonismes Ets / récepteurs nucléaires.

Nous avons vu que l'induction du promoteur de la collagénase-1 par les facteurs **Ets1**, **ERM** et **PEA3** est inhibée par le récepteur **AR** (§ 1.9.2.3.7). D'autres récepteurs aux stéroïdes inhibent la transcription induite par des facteurs Ets.

En présence de dexaméthasone, le récepteur **GR** inhibe la transcription induite par **PU.1** et, inversement, PU.1 inhibe l'induction de promoteurs *via* des sites GRE. PU.1 inhibe également la transcription induite par les récepteurs **TR** et **RAR $\alpha$**  *via* leurs sites cibles T<sub>3</sub>RE et RARE (Gauthier, et al., 1993).

Ces résultats suggèrent que des interactions protéiques entre des facteurs Ets spécifiques et des récepteurs nucléaires inhibent leur capacité à induire la transcription.

### 3.7.2.6. *Inhibition par Ets1 via un site ISRE.*

L'IFN- $\alpha$  induit la transcription de gènes cellulaires *via* la liaison d'un complexe spécifique **ISGF3** (contenant les protéines Stat1 $\alpha$  et  $\beta$ ) sur des sites ISRE dont le consensus **AGTTTCnnTTTCn(C/T)** (Darnell, et al., 1994) offre deux possibilités de chevauchement avec des sites EBS. La recherche de facteurs liant le site ISRE par criblage d'une banque d'ADNc de souris a conduit à l'isolement d'un clone *ets1*. La formation d'un complexe ISGF3 sur le site ISRE est inhibée par un anticorps dirigé contre Ets1. Ets1 inhibe l'activité transcriptionnelle d'un gène rapporteur contrôlé par un site ISRE. Ces résultats indiquent que Ets1 peut inhiber la transcription induite *via* un site ISRE en participant à la formation d'un complexe protéique sur ce site (Rutherford, et al., 1997).

### 3.7.2.7. *Inhibition par Elf1 via un site GAS.*

Le promoteur du gène humain codant le **récepteur  $\alpha$  de l'IL-2** présente un site semblable à GAS (consensus **TTnCnnnAA**, présenté en § 2.10.3) qui chevauche un site EBS (-3768 **TTCTAGGAAGT**). L'IL-2 induit la liaison des facteurs **Stat5a et b** sur le site GAS en corrélation avec l'induction de la transcription, dans des lymphocytes T. La mutation du site EBS élève le niveau basal et ne permet plus d'induction par l'IL-2. Stat5a induit la transcription *via* ce site et la coexpression de Elf1 l'inhibe. Elf1 n'a par contre pas d'effet sur l'activité basale. Ces résultats suggèrent que Elf1 est un répresseur qui lie constitutivement le site GAS dans des lymphocytes T non stimulés et que l'IL-2 induit la liaison compétitive de facteurs activateurs Stat (Lécine, et al., 1996).

## 3.7.3. **Interactions physiques de Ets avec d'autres facteurs.**

### 3.7.3.1. *Ets1 et GHF1.*

Le facteur de transcription GHF1/Pit1 est un facteur à homéodomaine POU, spécifique de l'hypophyse. Il est nécessaire, mais pas suffisant, à l'expression des gènes de la **prolactine** (PRL), de l'**hormone de croissance** (GH) et de la thyrotropine. Ets1, mais pas Ets2, coopère avec GHF1 à l'induction du promoteur PRL *via* une paire de sites EBS-GHF (-214). Un test de corétention protéique *in vitro* montre que Ets1, mais pas Ets2, interagit physiquement avec GHF1 et GHF2. GHF2 est une isoforme exprimée par épissage alternatif qui inhibe l'inductibilité du PRL par Ets1. Le promoteur de la GH ne présente pas d'élément EBS-GHF et n'est pas induit coopérativement par Ets1 et GHF1. Cette étude indique que l'interaction du facteur GHF1 exprimé dans l'hypophyse avec Ets1 au niveau d'éléments EBS-GHF pourrait expliquer l'expression différentielle de gènes spécifiques régulés par GHF1 (Bradford, et al., 1997).

### 3.7.3.2. *Ets1* et *PEBP2α*.

Le gène du récepteur alpha des lymphocytes T (TCR $\alpha$ ) est induit coopérativement par les facteurs *Ets1* et *PEBP2 $\alpha$*  (sous unité alpha de la « protéine 2 liant l'élément activateur du virus du polyome »). *Ets1* est recruté sur l'ADN par *PEBP2 $\alpha$*  pour former un complexe ternaire instable au niveau d'un élément mixte contenant 2 sites de liaison de *PEBP2 $\alpha$*  et un site EBS (+83 CCGCA GAAG CC ACATCCTC +101). Une interaction physique est observée entre *PEBP2 $\alpha$*  et la région (123-240) de *Ets1* qui recouvre le domaine DBID1 et une région transactivatrice. La stabilisation de ce complexe dépend aussi de la phase angulaire d'un site ATF/CREB (+33 TGACGTCA) situé à l'autre extrémité de l'élément activateur. Elle nécessite également le facteur LEF-1 (« facteur activateur lymphoïde ») qui courbe l'élément activateur en un site central (+69 CCTTTGAA), ce qui permettrait le rapprochement des facteurs liés sur les éléments *PEBP2 $\alpha$* -EBS et ATF/CREB (Giese, et al., 1995).

### 3.7.3.3. *Ets1* et *MafB*.

**MafB** est un membre de la famille Maf (§ 2.2.3) de facteurs de transcription à domaine bZip. Il est exprimé dans les cellules myélomonocytiques, mais pas dans les cellules érythroïdes. Sa surexpression dans des érythroblastes inhibe l'expression du gène du **récepteur de la transferrine** induite par *Ets1* et la différenciation érythroïde dont ce gène est un acteur essentiel. *In vitro*, la région bZip de *MafB* interagit physiquement avec le DBD de **Ets1**. Dans les cellules QT6 de caille, *MafB* inhibe la transcription d'un gène rapporteur contrôlé par 5 sites EBS induit par la p68<sup>c-ets1</sup> (Sieweke, et al., 1996). Ces résultats mettent en évidence une inhibition par *MafB* de la transcription induite par *Ets1*. Cette activité inhibitrice semble impliquée dans l'hématopoïèse.

### 3.7.3.4. *Erg* et *c-Fos* / *c-Jun*.

Nous rapportons que *Erg*, mais pas *Ets2*, induit le promoteur de la **collagénase-1** *via* un site EBS. Un test de retard sur gel montre cependant que *Erg* ne peut pas lier seul le site EBS. Il est recruté sur l'ADN par une interaction physique avec le complexe *c-Fos* / *c-Jun* qui lie un site AP-1 adjacent (§ 4.1).

### 3.7.3.5. *Elf1* et *Jun*.

Le gène de la chaîne lourde des immunoglobulines (**IgH**) est régulé dans les lymphocytes B. L'activité du gène *IgH* induite *via* le récepteur des *IgM* s'accompagne du recrutement d'un complexe NFAB (« facteur nucléaire des cellules B activées ») sur un élément original appelé ETS/AP-1. Cet élément (CAGAATGAGTAA) contient un site AP-1 like et un site chevauchant de liaison de *Ets* avec un cœur GAAT différent du consensus GGA(A/T). Ce motif suffit à conférer à un gène rapporteur l'inductibilité *via* le récepteur des *IgM*. Le complexe NFAB contient les facteurs **c-Fos**, **JunB** et **Elf1**. Dans les fibroblastes NIH 3T3, l'expression de *Elf1* est nécessaire à l'inductibilité de cet élément par le TPA. Ces

résultats suggèrent que les facteurs c-Fos et JunB, induits dans les lymphocytes B par l'activation du récepteur des IgM, coopèrent avec Elf1 à l'expression du gène IgH (Grant, et al., 1995). Ce mécanisme régulateur rappelle l'induction du promoteur de l'IL-2 dans les cellules T activées par un complexe NFAT-1 contenant les facteurs Fra1 et JunB et vraisemblablement Elf1, ou un facteur Ets apparenté (§ 2.4.1.2).

Une autre étude montre que Elf1 interagit physiquement avec c-Jun, JunB et JunD, mais pas avec c-Fos, FosB, Fra1 ni Fra2, dans un test *in vitro* où le bromure d'éthidium est utilisé pour supprimer une éventuelle interaction avec l'ADN. Elf1 interagit avec la région c-Jun(221-334) qui inclut le domaine bZip. Les DBD de Elf1, PU.1, Ets1 et Fli1 interagissent avec c-Jun, JunB et JunD. Des tests de coimmunoprécipitation montrent que Elf1 lie des complexes Fos / Jun *in vivo* (Bassuk et Leiden, 1995).

Ces résultats indiquent que l'interaction physique entre Elf1 et Jun permet la formation de complexes Elf1 / Jun / Fos et une coopération entre ces facteurs dans l'induction de la transcription du gène de l'IgH. La formation de tels complexes est indépendante de l'interaction avec l'ADN et pourrait favoriser le recrutement des facteurs c-Fos, JunB et Elf1 sur l'élément ETS/AP-1 où les sites de liaison ne sont pas des consensus EBS ou AP-1. L'originalité de ce mécanisme de recrutement pourrait contribuer à la spécificité de la régulation du gène IgH.

#### 3.7.3.6. *Elf1 et NFκB/NFAT.*

Les promoteurs des virus **VIH-1** et **VIH-2** et les promoteurs de gènes cellulaires inductibles dans les lymphocytes T présentent des paires de sites EBS-NFκB. Ces promoteurs sont induits coopérativement par des facteurs de la famille Ets et des deux familles apparentées Rel/NFκB et NFAT (« facteur nucléaire des cellules T activées »). Elf1 interagit physiquement avec plusieurs facteurs Rel/NFκB ou NFAT, *in vitro* et dans les lymphocytes T. L'interaction a lieu entre le DBD de **Elf1** et le DBD (correspondant au domaine d'homologie à Rel) des facteurs **Rel**, **NFκB p50** et **NFAT2**, mais pas NFκB p65. Une étude par mutation montre que la liaison de chacun des partenaires à un fragment (-183/-83) de l'élément activateur du VIH-2 est nécessaire à l'interaction observée *in vitro*. Ce fragment présente 2 sites EBS reconnus par Elf1 (-168 CAGGAACA, -143 CAGGAAGT) et un site NFκB (-109 GGGACTTCC). L'interaction observée pourrait avoir lieu simplement par l'intermédiaire de l'ADN, sans mettre en jeu d'interaction protéique. Elle n'est cependant pas obtenue avec deux protéines chimères p50/p65 capables de lier l'ADN. Il s'agit donc d'une interaction protéine-protéine dépendante de l'ADN (Bassuk, et al., 1997).

Le promoteur de l'**IL-2** présente 5 sites NFAT (-284, -163, -138, -95, -50) qui participent tous à son induction maximale lors de l'activation des lymphocytes T. Ils définissent un consensus GGAAAA(A/T). Ils sont chacun reconnus *in vitro* par les 4 membres de la **famille NFAT** : NFAT1 (= NFATp), NFAT2 (= NFATc), NFAT3 et NFAT4 (Rooney, et al., 1995). NFAT1 interagit physiquement avec les dimères c-Fos / c-Jun et c-Jun / c-Jun qui stabilisent la liaison de NFAT1 sur l'ADN (Jain, et al., 1993). Les sites NFAT (-284)

et (-138) chevauchent les sites EBS1 (-286) et EBS2 (-240). Ces EBS sont reconnus par le facteur **Elf1** qui induit le promoteur en interagissant avec un complexe AP-1 lié à des sites adjacents (§ 2.4.1.2). Le chevauchement des sites EBS et NFAT suggère que le promoteur de l'IL-2 pourrait être induit d'une manière mutuellement exclusive par Elf1 ou par NFAT, en coopération avec AP-1. Elf1, lié sur EBS1 ou sur EBS2, pourrait aussi interagir avec des facteurs NFAT liés sur les 4 sites NFAT distants. Comme dans le cas des VIH-1 et VIH-2, Elf1 pourrait aussi interagir avec un facteur NFκB qui reconnaît le site (-207 GGGATTTCAC) (Rooney, et al., 1995).

Ces résultats indiquent que des interactions physiques entre des facteurs Ets et Rel/NFκB ou NFAT jouent un rôle dans la régulation de gènes cellulaires et de virus spécifiques des lymphocytes T.

### 3.7.3.7. *Elk et Pax5.*

Pax5 est une protéine activatrice spécifique des lymphocytes B (la « BSAP ») impliquée dans leur différenciation. *mb1* est un gène spécifique des lymphocytes B induit *via* un élément Pax5-Ets. Cet élément présente un site de liaison de Pax5 et, à une base près dans le cœur TTCC, un consensus de liaison de Elk1 (-73 ATCTCCGGC). En test de retard sur gel, Sap1a peut lier seul cet élément, contrairement à Elk1 ou Sap2. **Pax5** peut cependant recruter **Elk1** ou **Sap2** sur l'ADN, mais ne forme pas de complexe ternaire avec Sap1a. La mutation du cœur CTCC en consensus TTCC permet la liaison de Sap2 seul et diminue ( : 20) la liaison de Pax5, ce qui suggère que le nucléotide atypique est important à la fois pour la liaison de Pax5 et la liaison de Sap2. *In vivo*, Pax5 forme des complexes sur le promoteur de *mb1* avec plusieurs facteurs de la famille Ets, comme **Ets1**, **Fli1** et **GABPα/β** (Fitzsimmons, et al., 1996).

Cette étude suggère que des interactions physiques entre Pax5 et des facteurs spécifiques de la famille Ets, en particulier des membres du groupe Elk, sont impliquées dans l'expression du gène *mb1* dans les lymphocytes B.

### 3.7.3.8. *Elk et SRF.*

Nous avons vu que l'induction du promoteur de *c-fos* par le sérum met en jeu la formation de complexes ternaires entre le site SRE, le facteur SRF et des facteurs TCFs de la famille Ets, à savoir Elk1, Sap1a, Sap2, Fli1 ou EWS-Fli1. Le recrutement de Elk1 nécessite la liaison du SRF à l'ADN. *In vitro*, Elk1 interagit physiquement avec le SRF (§ 2.10.5.1.1).

Les facteurs TCFs forment également des complexes ternaires avec le SRF au niveau des SREs du promoteur de *egr1*, un autre gène de réponse précoce (présenté en § 2.10.5.1.2). De plus, Elk1 et Sap1a forment des complexes quaternaires sur l'un des SREs de *egr1*, ce qui suggère un niveau supplémentaire d'interaction physique et de régulation transcriptionnelle (Watson, et al., 1997).

### 3.7.3.9. *GABP $\alpha$ et GABP $\beta$ .*

GABP $\alpha$  et GABP $\beta$  sont des facteurs Ets qui peuvent lier ensemble des tandems EBS. GABP $\beta$  ne modifie pas la spécificité de la liaison de GABP $\alpha$  sur un EBS unique mais augmente fortement sa liaison sur un tandem EBS, par la formation d'un tétramère  $\alpha_2\beta_2$ . Le criblage d'extraits tissulaires par une protéine GABP $\beta$  radiomarquée révèle une stricte spécificité d'interaction avec GABP $\alpha$ . GABP $\beta$  permettrait donc une sélection des sites de liaison de GABP $\alpha$  (Brown et McKnight, 1992).

### 3.7.3.10. *Le domaine d'oligomérisation de Tel.*

Les facteurs Ets1, Ets2, Erg2, Fli1, GABP $\alpha$  et Tel, un nouveau facteur Ets, présentent un domaine N-terminal conservé de 65 acides aminés. Ce domaine permet l'homodimérisation des oncoprotéines de fusion Tel-PDGFR $\beta$  et Tel-Abl qui présentent en conséquence une activité kinase constitutive. Ce domaine permet l'homodimérisation de Tel, mais pas des autres facteurs Ets (Jousset, et al., 1997). L'implication de cette propriété spécifique dans la régulation transcriptionnelle par Tel n'a pas encore été étudiée à notre connaissance.

### 3.7.4. **Interaction de PU.1 avec la machinerie transcriptionnelle.**

PU.1/Spi1 est un membre de la famille Ets exprimé dans les macrophages, les neutrophiles et les lymphocytes B. Son domaine transactivateur est contenu dans la région N-terminale (1-75). Cette région interagit physiquement avec le facteur de transcription **Rb** (le suppresseur de tumeur du rétinoblastome) et avec le facteur **TFIID** de la machinerie transcriptionnelle générale (§ 2.9.1). La région (75-182) adjacente au DBD augmente ces interactions. TFIID lie PU.1 *via* la région (167-317) qui est homologue de la région (399-564) de Rb, ce qui suggère un mécanisme d'interaction commun (Hagemeier, et al., 1993).

Le facteur NF $\beta$ A, identique à PU.1, lie un élément conservé du promoteur de l'IL-1 $\beta$  situé 6 pb en amont de la boîte TATA. Des expériences de retard sur gel suggèrent que PU.1 pourrait induire l'assemblage d'un complexe dépendant de la **TBP** sur le promoteur de l'IL-1 $\beta$  (Buras, et al., 1995).

En conclusion, l'interaction de PU.1 et de TFIID est, à notre connaissance, la seule interaction protéique caractérisée entre un membre de la famille Ets et un facteur du complexe d'initiation de la transcription. De plus, PU.1 pourrait interagir avec la TBP en se fixant sur un site spécifique proche de la boîte TATA, en particulier dans le promoteur de l'IL-1 $\beta$ .

### 3.7.5. **Conclusion.**

Plusieurs facteurs de la famille Ets interagissent au niveau transcriptionnel avec des facteurs de plusieurs autres familles, comme par exemple des facteurs bZip (Fos-Jun, Maf). Des mécanismes coopératifs et des antagonismes entre ces facteurs contrôlent spécifiquement l'expression de nombreux gènes, en particulier des gènes impliqués dans la régulation de l'activité protéolytique extracellulaire ou dans la différenciation et l'activation des cellules

sanguines. La spécificité tissulaire de ces mécanismes est généralement conférée par la spécificité d'expression de l'un des deux facteurs régulateurs.

Parfois, des facteurs de transcription sont en compétition pour la liaison à l'ADN au niveau de sites qui se chevauchent. Plus fréquemment, des interactions protéiques entre facteurs de transcription ont été mises en évidence. Elles contribuent significativement au recrutement de facteurs Ets sur des promoteurs et à la spécificité de la régulation transcriptionnelle. Dans d'autres cas, une interaction protéique peut au contraire inhiber la liaison à l'ADN des partenaires.

D'une manière originale, des facteurs de la famille Ets sont antagonistes dans deux cas : Ets1 et Fli1 dans la régulation du VIH-1 (§ 3.7.2.4.2), Ets2 et Erg dans la régulation de la stromélysine-1 (§ 4.1).

### **3.8. Régulation de l'expression des gènes ets.**

#### **3.8.1. L'expression des gènes ets.**

Nous présentons maintenant des mécanismes régulateurs de l'expression des gènes *ets1*, *ets2*, et *erg*, trois gènes dont nous avons étudié les produits expérimentalement. A notre connaissance, les mécanismes contrôlant la transcription de *erg* n'ont pas été étudiés. L'expression de *ets1* et de *erg* est contrôlée par des épissages alternatifs.

#### **3.8.2. Expression de *ets1*.**

##### **3.8.2.1. Régulation transcriptionnelle.**

Le promoteur de *ets1* est induit dans la lignée lymphoïde Daudi et la lignée érythromyéloïde K562, mais pas dans la lignée promyélocytaire HL60. Il ne présente pas de boîte TATA ou CAAT. La transcription est initiée à partir de plusieurs positions voisines (+1, +4, +7, +10, +13).

Une première région inductrice contient un site **AP-1** (-828 TGA<sup>CT</sup>CA), un site atypique de liaison de **Ets1** (-745 CTCGCCTTC), un site **AP-2** (-537 CCCCAGCC), un site **Sp1** optimal (-439 GGGCGG) et 5 autres sites Sp1 présumés. L'expression de c-Jun ou de AP-2 induit le promoteur, vraisemblablement *via* les sites potentiels indiqués. D'une manière inattendue, c-Fos ne coopère pas avec c-Jun dans l'induction de la transcription (Oka, et al., 1991). Ets1, mais pas Ets2, induit le promoteur de *ets1* (Seth et Papas, 1990). La mutation du site Ets1 supprime l'induction par Ets1 (Chen et Wright, 1993). Un gène rapporteur contrôlé uniquement par la région des sites AP-1, Ets1 et AP-2 est induit plus efficacement par PEA3 que par Ets1 (Chen, et al., 1993a).

Une deuxième région inductrice contient un tandem de sites **PEA3** (-1603 GTTCCTG GCTTCCT) et deux sites **Oct** (-1584 ATTTGCTG, -1568 CTGCAAAT). La mutation des sites PEA3 et Oct réduit ou supprime l'induction par les facteurs PEA3 et Oct1 ou Oct2

respectivement. La région des sites PEA3 et Oct est flanquée de deux domaines inhibiteurs, **NRE1** en 5' et **NRE2** en 3'. NRE1 inhibe (: 4-8) l'activité basale induite par Ets1, PEA3, Oct1, Oct2 et AP-2. NRE2 inhibe spécifiquement l'induction par Oct (Chen et Wright, 1993). Des extraits nucléaires de cellules Daudi ou K562, mais pas de cellules HL60, forment *in vitro* plusieurs complexes avec NRE1 et NRE2 (Chen, et al., 1993a).

Le gène *ets1* est donc exprimé dans des cellules sanguines spécifiques. Son expression résulte d'un équilibre entre une autorégulation positive modérée *via* un site Ets1 atypique, une inductibilité par d'autres facteurs (PEA3, AP-1, AP-2, Oct) et, simultanément, une inhibition *via* les régions NRE1 et NRE2.

Chez l'embryon de souris, *ets1* est exprimé dans les vaisseaux en développement. Cependant, un gène rapporteur contrôlé par 5.3 kb de séquence 5' du gène *ets1* ne présente pas le même patron d'expression. La coexpression du rapporteur et de l'endogène est obtenue en ajoutant au rapporteur le premier exon et 9 kb du premier intron de *ets1*, ce qui montre que des séquences 3' participent à la spécificité de tissu de l'expression de *ets1* (Jorcyk, et al., 1997).

#### 3.8.2.2. Epissage alternatif.

Le gène *ets1* de **poulet** code deux isoformes, p54 (Ghysdael, et al., 1986) et p68 (Leprince, et al., 1988). Elles diffèrent au niveau de leur domaine N-terminal, par l'utilisation de deux sites d'initiation de la traduction et par un épissage alternatif. Cette région définit le domaine **RI**, transactivateur chez la p68, mais pas chez la p54 (Schneikert, et al., 1992).

Chez l'**homme**, les isoformes p42 et p51 (§ 3.6) diffèrent par la présence ou l'absence de l'exon VII qui code le domaine **DBID1**, un domaine inhibiteur de la liaison à l'ADN (§ 3.2.3) régulé par phosphorylation (§ 3.4.1). Des isoformes de Ets1 sont également connues chez la **souris**, p63 et p52. Leurs propriétés biochimiques suggèrent qu'elles seraient homologues des isoformes humaines (Pognonec, et al., 1990).

#### 3.8.3. Régulation transcriptionnelle de *ets2*.

Comme dans le cas de *ets1*, le promoteur de *ets2* ne présente pas de boîte TATA ou CAAT. La transcription est initiée à partir de plusieurs positions voisines (+1 à +5, +9, +10).

La région (-159/+141) est la plus petite région nécessaire à une activité maximale en cellules HeLa. Elle contient un site **Sp1** (-9 CGCGTGGGG) chevauchant un élément symétrique riche en **GC** (-15/-6) et un site **AP-2** (-62 GTCCCTCCT). En amont se trouvent un autre site Sp1 (-208 CCCCCAAGCC) et 2 autres sites AP-2 (-318, -285). Le promoteur contient également un site **CArG** de liaison du SRF (-1452 CCATTTATGG) semblable à celui du promoteur de *c-fos* et dont les extrémités chevauchent 2 cœurs EBS (TTCC.....GGAA) (Mavrothalassitis, et al., 1990).

Le promoteur de *ets2* présente aussi un élément mixte **EBS-AP-1 like** (+12 ACTTCCTC CAG AGACTGA). Les sites GC, EBS et AP-1 like sont liés par plusieurs complexes ubiquitaires ou tissu-spécifiques. La formation de ces complexes est

corrélée à l'induction de la transcription (complexes au niveau des sites GC, EBS et AP-1 like), ou à son inhibition (sites EBS et AP-1 like). La coopération entre les sites EBS et AP-1 like semble essentielle à l'activité du promoteur (Mavrothalassitis et Papas, 1991). L'activité du promoteur est également régulée par un nouveau membre de la famille Ets, le répresseur Erf (§ 3.7.2.4.4).

A notre connaissance, *ets2* n'est pas traduit en plusieurs protéines isoformes.

#### **3.8.4. Les isoformes Erg.**

Les transcrits du gène *erg* sont modifiés par un épissage alternatif et sont traduits en plusieurs isoformes à partir de sites alternatifs d'initiation de la traduction. Ces protéines sont appelées Erg1, Erg2 (Rao, et al., 1987), p38, p55 et p49 (Duterque-Coquillaud, et al., 1993). Erg3 n'est autre que la p55 (Prasad, et al., 1994). Les isoformes Erg sont des facteurs transactivateurs dont la spécificité est en cours d'investigation. La protéine Erg utilisée dans nos travaux expérimentaux est la p55.

#### **3.9. Conclusion.**

Les facteurs Ets sont impliqués dans le développement, dans l'hématopoïèse et dans certains cancers. Ils régulent des gènes de différenciation et des gènes codant des protéases extracellulaires ou des inhibiteurs de protéases. Une spécificité de tissu a été mise en évidence pour plusieurs d'entre eux.

Les facteurs de la famille Ets ont un domaine de liaison à l'ADN conservé qui reconnaît des sites EBS centrés autour d'un cœur GGA(A/T), une séquence statistiquement très fréquente. La spécificité de la sélection des sites cibles et de l'induction ou de l'inhibition de la transcription est assurée dans de nombreux cas par des interactions protéiques avec des facteurs de transcription de plusieurs autres familles, dont certains ne sont exprimés que dans des tissus spécifiques.

Notre étude expérimentale souligne également la spécificité de l'activité des facteurs Ets. Elle montre que Erg induit le promoteur de la collagénase-1, mais inhibe l'activité du promoteur de la stromélysine-1 induite par Ets2. Cette régulation différentielle s'explique par la disposition différente des sites EBS et AP-1 dans ces promoteurs, par une interaction physique de Erg avec c-Fos / c-Jun et, vraisemblablement, par l'originale interaction physique entre Ets2 et Erg *via* des domaines protéiques contrôlant la liaison à l'ADN et la capacité transactivatrice de Ets2.

## 4. Résultats.

### 4.1. Publication 1.

#### 4.1.1. Résumé.

Titre en français : Erg, un membre de la famille Ets, régule différemment l'expression des gènes de la collagénase-1 (MMP-1) et de la stromélysine-1 (MMP-3) en interagissant physiquement avec le complexe Fos / Jun.

Dans cette publication, nous montrons que Ets2, Erg (p55) et leur combinaison régulent différemment l'activité des promoteurs de la collagénase-1 (-610/+61) et de la stromélysine-1 (-437/+4). Dans des expériences de transfection transitoire, Ets2 induit les deux promoteurs, alors que Erg induit la collagénase-1 mais pas la stromélysine-1. De plus, Erg inhibe totalement l'activité du promoteur de la stromélysine-1 induite par Ets2. Des expériences de retard sur gel ne permettent cependant pas de détecter une liaison de Erg au promoteur de la collagénase-1. Elles montrent au contraire qu'il se fixe au promoteur de la stromélysine-1. Par mutagenèse dirigée, nous avons identifié un site EBS (-89) nécessaire à l'induction du promoteur de la collagénase-1 par Erg. D'une manière inattendue, la mutation d'un site AP-1 (-72) supprime également l'induction par Erg, ce qui suggère que Erg coopère étroitement avec un facteur AP-1. En accord avec cette hypothèse, des expériences de retard sur gel et des tests d'interaction protéique *in vitro* (corétention protéique) montrent que Erg interagit physiquement avec le complexe c-Fos / c-Jun. Erg est donc le premier exemple d'un facteur de transcription capable de distinguer les promoteurs de la collagénase-1 et de la stromélysine-1. Erg induit la transcription quand il est recruté par Fos / Jun sur le promoteur de la collagénase-1, mais il n'induit pas le promoteur de la stromélysine-1. La disposition différente de sites EBS et AP-1 semblables dans ces promoteurs est à l'origine de leur régulation différentielle.



# Erg, an Ets-family member, differentially regulates human collagenase1 (MMP1) and stromelysin1 (MMP3) gene expression by physically interacting with the Fos/Jun complex

Giovanna Buttice<sup>1</sup>, Martine Duterque-Coquillaud<sup>1</sup>, Jean Phillippe Basuyaux<sup>1</sup>, Séverine Carrère<sup>1</sup>, Markku Kurkinen<sup>2</sup> and Dominique Stéhelin

<sup>1</sup>Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, CNRS URA 1160, Institut Pasteur de Lille, 1 rue Calmette, BP. 245, 59019 Lille Cedex, France and <sup>2</sup>Center for Molecular Medicine and Genetics and Department of Pathology Wayne State University, School of Medicine, 5125 Biological Sciences Bldg, 5047 Gullen Mall, Detroit, Michigan 48202, USA

Collagenase1 (MMP1) and stromelysin1 (MMP3) are extracellular proteolytic enzymes that degrade connective tissue macromolecules and basement membranes. Both genes are regulated by the Ets and Fos/Jun families of transcription factors/oncoproteins. Here, we show that two members of the Ets-family, Ets2 and Erg and their combinations differentially regulate collagenase1 and stromelysin1 promoter activity. In transiently transfected cells, Ets2 activates both promoters whereas Erg induces collagenase1 but not stromelysin1 promoter activity. Moreover, Erg completely inhibits stromelysin1 promoter activation by Ets2. In gel shift assays however, the Erg protein bound little or not to the collagenase1 promoter, whereas it bound to the stromelysin1 promoter. By site-specific mutagenesis, we identified one major site at –88 that abolished collagenase1 promoter activation by Erg. Surprisingly, mutation of the collagenase1 AP1 site at –73 also abolished the activation by Erg suggesting that Erg cooperates with Fos/Jun in collagenase1 promoter regulation. Indeed, gel shift and *in vitro* protein interaction studies showed that Erg binds to the Fos/Jun complex. Thus, Erg represents the first example of a transcription factor that can distinguish between the collagenase1 and stromelysin1 promoters in that when Erg is recruited by Fos/Jun at the promoter, it transcriptionally activates collagenase1 gene but not stromelysin1 expression.

**Keywords:** extracellular matrix; metalloproteinases; oncogenes; gene regulation

## Introduction

The Ets family members comprise a large number of genes that encode transcription factors/oncoproteins (Crépieux *et al.*, 1994; Janknecht and Nordheim, 1993; Symms and Kola, 1994; Wasylyk *et al.*, 1993) which are implicated in the generation of several types of cancers (Rabbitts, 1994). They are expressed widely during development and organogenesis. Ets1 is expressed in several cell types and is particularly abundant in endothelial cells during blood vessel formation (Wernert *et al.*, 1992). By contrast, Ets2

appears to be expressed in all proliferating tissues studied (Kola *et al.*, 1993) and can induce tumors in nude mice (Seth *et al.*, 1989). During chicken embryogenesis, the *ets* related gene *erg* is expressed in cells of mesodermal origin and may play a role in limb and skeleton formation (Dhordain *et al.*, 1995). It has also been shown that the *erg* gene can be rearranged in myeloid leukemia and Ewing's sarcoma, a long bone tumor of childhood (Ichikawa *et al.*, 1994; Sorensen *et al.*, 1994), suggesting that *erg* may participate in the regulation of particular genes implicated in the metastatic progression of cancer.

Different members of the Ets-family of transcription factors contain an homologous DNA binding domain, the Ets domain, that binds to the purine rich GGA(A/T) core sequence, but have divergent transcriptional activation domains (Karim *et al.*, 1990; Laudet *et al.*, 1993).

Ets transcription factors regulate several viral and cellular genes (Nerlov *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 1994; Wasylyk *et al.*, 1990). It has been shown that the flanking regions of the GGA(A/T) core are responsible for the binding specificity of different members of the Ets-family (Ho *et al.*, 1990; Karim *et al.*, 1990; Nye *et al.*, 1992; Wasylyk and Wasylyk, 1992). However, as demonstrated in some cases, the binding of accessory proteins can confer such specificity to the different Ets proteins. Thus, SAP-1 and Elk are recruited by the serum response factor (SRF) at the *c-fos* serum response element (SRE) for promoter activation (Dalton and Treisman, 1992; Hipskind *et al.*, 1991; Shaw *et al.*, 1989) and NF-EM5 by Spi-1/PU1 for Igk enhancer activity (Pongubala *et al.*, 1992). In several reports (Bradford *et al.*, 1995; Dudek *et al.*, 1992; Gégonne *et al.*, 1993; Grant *et al.*, 1995; John *et al.*, 1995; Nelsen *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1994; Wasylyk *et al.*, 1990; Wu *et al.*, 1994) it is suggested that cooperation in the activation of several genes by the Ets-family members is due to an interaction between the Ets-members with other transcription factors. Despite some functional evidence, it still remains to be shown in several cases whether such interactions physically take place (Bradford *et al.*, 1995; Dudek *et al.*, 1992; Gégonne *et al.*, 1993; Grant *et al.*, 1995; John *et al.*, 1995; Nelsen *et al.*, 1993; Wasylyk *et al.*, 1990; Wu *et al.*, 1994).

As yet, little is known about the downstream cellular genes regulated by the Ets family of transcription factors. However, we (Buttice and Kurkinen, 1993,

Correspondence: G Buttice  
Received 18 April 1996; revised 19 August 1996; accepted 19 August 1996

1994) and others (Wasylyk *et al.*, 1991; Wasylyk and Wasylyk, 1992) have shown that c-Ets1 and c-Ets2 activate collagenase1 and stromelysin1 genes in transient transfection assays. These two genes encode enzymes that belong to a family of matrix-metalloproteinases (MMPs). MMPs are extracellular enzymes that degrade connective tissue and basement membranes and are expressed widely during growth and development (Birkedal-Hansen, 1995; Gack *et al.*, 1995). In mature adults, however, MMPs are rarely expressed except in places of disease or active tissue renewal/remodelling. For example, many MMPs are expressed in human tumors and are thought to play a critical role in several stages of tumor progression: tumor growth, tissue invasion and metastasis (MacDougall and Matrisian, 1995; Stetler-Stevenson *et al.*, 1993; Werb and Alexander, 1994).

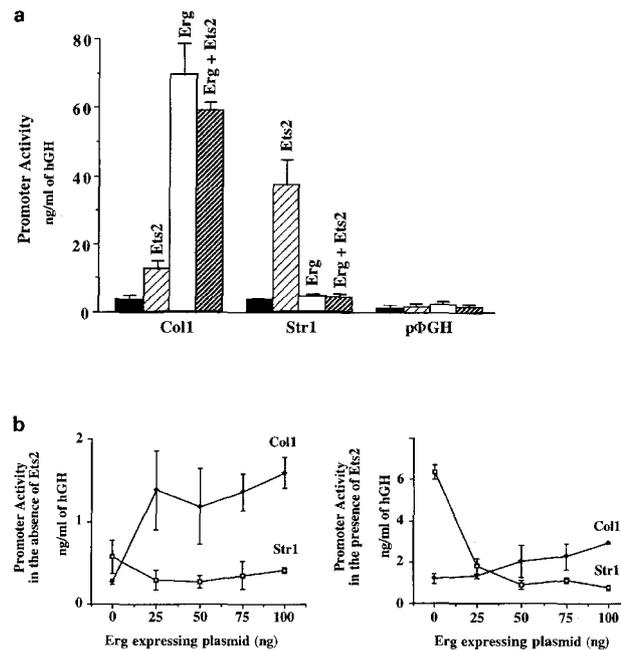
We have previously identified, by site-specific mutagenesis one functional AP1 (activator protein-1) site at  $-70$  in the human stromelysin1 (MMP3) promoter that is necessary for basal activity and binds the Fos and Jun transcription factors (Buttice *et al.*, 1991). Stromelysin1 promoter (Quinones *et al.*, 1989) contains 13 Ets binding sites (EBS), however only two of them, that are linked tail-to-tail at  $-217$  and  $-200$  are functional for Ets2 activation and TPA induction (Buttice and Kurkinen, 1993). Similarly, the human collagenase1 (MMP1) promoter has been shown to contain an AP1 site necessary for TPA induction (Angel *et al.*, 1987) and Fos/Jun activation when studied in a minimal ( $-89$  to  $-64$ ) collagenase promoter context (Gutman and Wasylyk, 1990). The collagenase promoter ( $-610$  to  $+61$ ) contains also 11 GGA(A/T) core sequences that are potential binding sites for the Ets-family of transcription factors.

In this study, we show that the collagenase1 and stromelysin1 gene promoters are differentially regulated by Erg, one of the Ets members. We identify in the collagenase1 gene promoter an EBS (Ets-binding site) sequence motif at  $-88$  for Erg transactivation. Also, we show that the Erg transactivation can operate through collagenase1 AP1 site at  $-73$  and we present evidence for the binding of the Erg protein to the Fos/Jun complex.

## Results

### *Ets-related gene product, Erg, differentially activates the collagenase1 and stromelysin1 promoters*

The effect of the Ets-family oncoproteins on the human collagenase1 and stromelysin1 promoter activity was first studied in transient gene transfection assays. The collagenase1 ( $-610$  to  $+61$ ) or stromelysin1 ( $-437$  to  $+4$ ) promoter was linked to the human growth hormone reporter gene and co-transfected into HepG2 cells with an equal amount of plasmids expressing Ets2 or Erg. We used the human HepG2 cell line because collagenase1 and stromelysin1 genes are transcriptionally regulated in these cells (Buttice and Kurkinen, 1993 and unpublished data). As shown in Figure 1a, Erg activated collagenase1 but not stromelysin1 promoter while Ets2 activated both promoters. In control experiments, Erg and Ets2 had no effect on the promoterless reporter gene (Figure 1a). In summary, data from eleven independent experiments



**Figure 1** Erg activates collagenase1 but not stromelysin1 promoter. Erg inhibits stromelysin1 promoter activation by Ets2. (a) The human collagenase1 ( $-610$  to  $+61$ ) and stromelysin1 ( $-437$  to  $+4$ ) gene promoters were linked to the growth hormone reporter gene and studied in transiently transfected HepG2 cells ( $10^6$ ). Equal amounts of empty plasmid pSG5 (black bar) and plasmids expressing Erg, or Ets2, oncoproteins were cotransfected with the collagenase1 or stromelysin1 promoter constructs. After transfection, the cells were incubated for 24 h and the growth hormone secreted into the culture medium was quantitated by radioimmunoassay. The total amount of DNA was kept constant by adding the empty vector pSG5. In control experiments, the promoterless reporter gene (pΦGH) was similarly studied. The graph shows data from a representative experiment. The values are the average of triplicate transfections expressed as ng/ml of secreted growth hormone and error bar represents the variation between transfections. (b) Cells ( $10^6$ ) were co-transfected with collagenase1 ( $-437$  to  $+4$ ) or stromelysin1 promoter ( $-437$  to  $+4$ ) constructs in the presence of increasing amounts of Erg. The vertical axis represents the promoter activity induced by Erg alone, or the promoter activity induced by Ets2 in the presence of increasing amounts of Erg. Note that the stromelysin1 promoter activity induced by 100 ng of Ets2 is repressed by low doses of plasmid expressing Erg. The bars represent the standard error from two independent experiments

reproducibly indicated that Ets2 activated at least twice better stromelysin1 than collagenase1 promoter (10-fold and 3.5-fold respectively in Figure 1a) whereas Erg was always a strong activator of collagenase1 promoter (20-fold). We also studied the effect of two other Ets member and found that Ets1 was a weak activator of collagenase1 and stromelysin1 promoters while Fli1 did not have an effect on either promoters (data not shown).

Interestingly, when Erg and Ets2 were transfected together the activation pattern of the collagenase1 and stromelysin1 promoter was very different. Ets2 did not augment nor prevent the collagenase1 promoter activation mediated by Erg (Figure 1a and b). In contrast, the activation of stromelysin1 gene by Ets2 was completely abolished with the co-expression of Erg (Figure 1a). As shown in Figure 1b, Erg repressed Ets2 induced transcription from the stromelysin1 promoter in a dose-dependent manner. Low levels of transfected Erg expression vector (25 ng) were sufficient to repress the stromelysin1 promoter activity induced by Ets2 and activate collagenase1 promoter. These results argue

against a squelching model for transcriptional repression (Ptashne, 1988) in which a small amount of protein would activate transcription but a large amount of protein would repress transcription by titrating limiting components of the transcriptional machinery. These findings suggest that Erg can act either as an activator or repressor of gene transcription depending on the promoter type.

*Erg target sites in the collagenase1 promoter*

From the transfection data it appears that Erg alone has no effect on stromelysin1 promoter activity

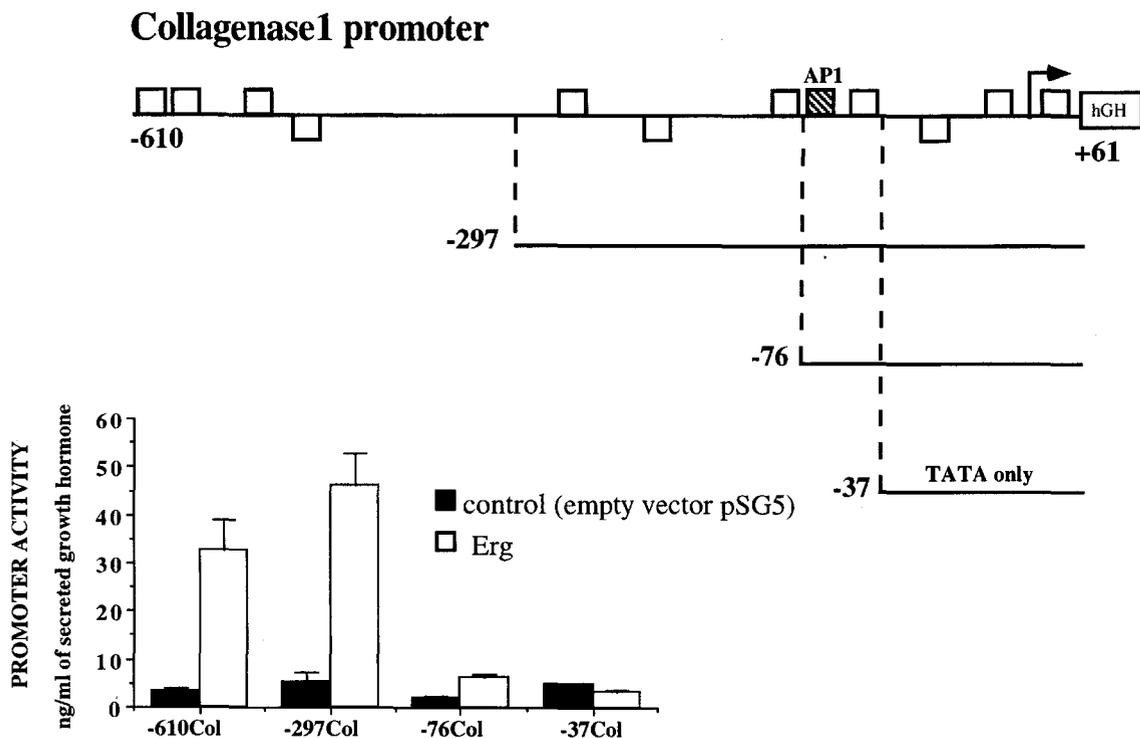
**Table 1** Potential Ets-binding sites of the collagenase1 promoter

Potential Ets-binding sites in the collagenase1 promoter	Position relative to the transcription start site*
attctgGGATtatagg	-595
M1 attaatGGAagccatg	-548
M2 cagaagGGAacctcag	-494
tagtaaTTCCaccctc	-386
M3 caaataGGAaagaaat	-256
M4 aagtgaTTCCaaataa	-151
M5 tcaagaGGATgttata	-88
M6 ctttctGGAaggcaaa	-48
M7 gggagcTTCCtagctg	-11
M8 tagctgGGATattgga	-4
M9 aggctgGGAagccatc	+20

The table shows the potential EBS and their flanking sequences. The EBS were mutated in the 5'-GGA(A/T)-3' core and the mutants named from M1 to M9. The indicated position refers to the first G in the GGA(A/T) motifs, or to the first C in the inverted motifs 5'-(T/A)TCC-3'

whereas it strongly activates the collagenase1 promoter. Therefore, we next determined which sequence motifs are involved in the Erg activation of the collagenase1 promoter. Inspection of the human collagenase1 promoter sequence (-610 to +61) revealed eleven GGA(A/T) core motifs as potential targets for the Ets-family of oncoproteins (Table 1). To characterize the GGA(A/T) target sequence(s) involved in the activation of the collagenase1 gene by Erg, we first prepared 5' end deletion mutants and studied their activity in transiently transfected HepG2 cells. Results from a representative transfection experiment are shown in Figure 2. The collagenase1 promoter (-610 to +61) and the mutant promoter (-297 to +61) were similarly activated, suggesting that the four GGA(A/T) motifs upstream of -297 are not involved in the promoter activation by Erg. By contrast, the promoter activation was decreased from 8.7-fold in the -297Coll promoter deletion to 2.9-fold in the -76Coll construct. Finally, the -37Coll promoter, still containing three GGA(A/T) core sequences and the TATA box, was not any more activated by Erg. Therefore, these data suggest that the GGA(A/T) target(s) for Erg activation of the collagenase1 promoter lies within the -297 to -76 sequence in the promoter.

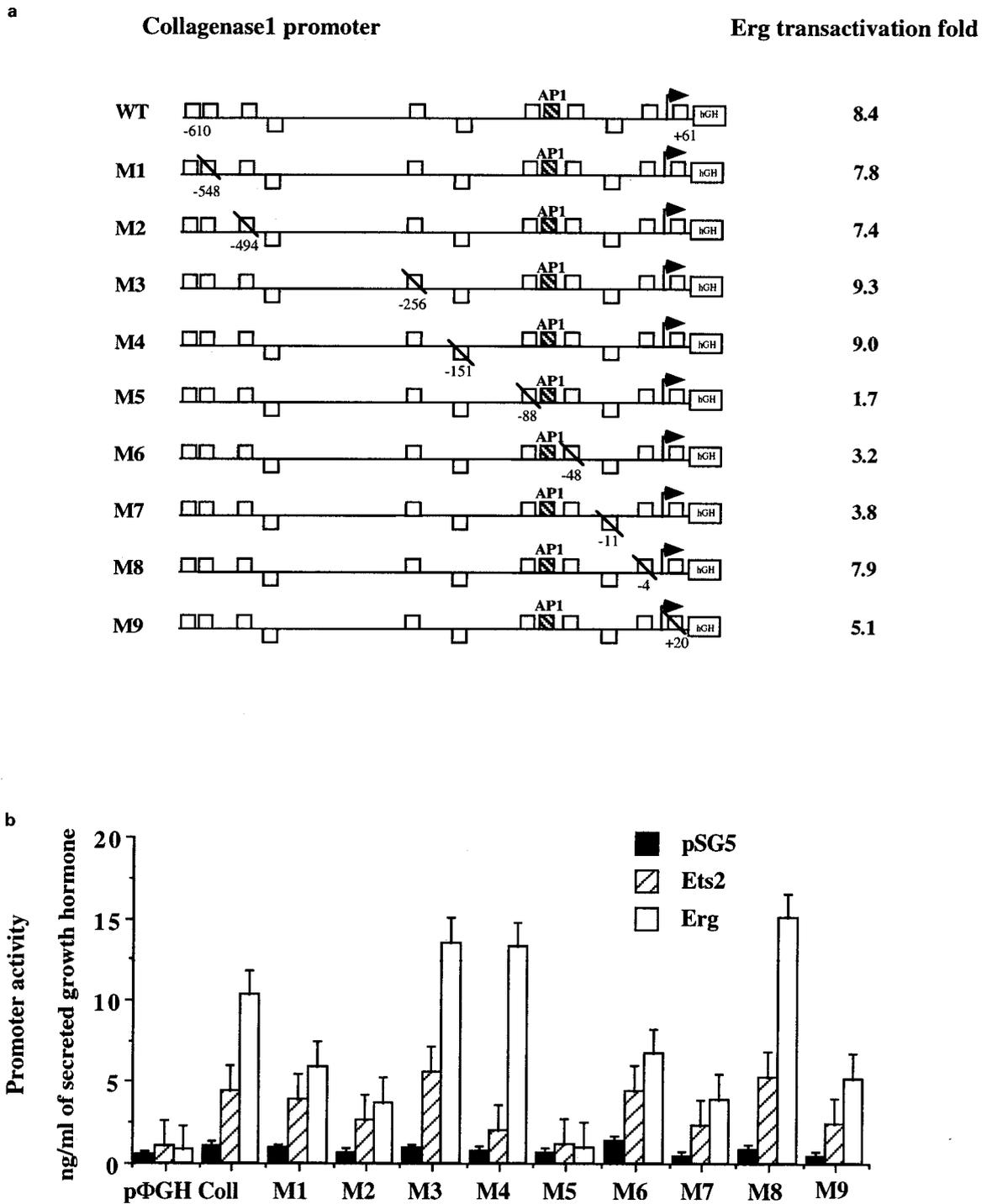
To identify more precisely the Erg target motif(s) in the collagenase1 promoter, we separately mutated each of the GGA(A/T) core sequences and inactivated the putative Ets-binding sites. The two guanines were substituted by two adenines using site-directed mutagenesis. The activation of these mutant promo-



**Figure 2** Deletion analysis and transactivation of the human collagenase1 gene by Erg. The collagenase1 promoter deletion mutants (-610, -297, -76, -37/+61) are indicated and a representation of the promoter shows the AP1 site and the potential targets, GGA(A/T) core sequences, for the Ets-family members. Each promoter construct was cotransfected with a control plasmid (pSG5) or a plasmid expressing Erg. The histogram represents a typical result of five independent experiments and the bars indicate the error of quadruplicate transfections. The graph shows that Erg activates the collagenase1 promoter through a promoter region extending from -297 to -76. This region contains four potential targets for the members of the Ets family. The collagenase1 promoter mutants (-610, -297, -76, -37/+61) were transactivated by Erg oncoprotein, 9.6-, 8.7-, 2.9- and 0.7-fold respectively

ters by Erg was then compared in transient transfection assays (Table 1 and Figure 3). Mutation of the GGA(A/T) motif at position -88 (M5) almost completely abolished the promoter activation by Erg.

The average transactivation fold from several independent experiments shows that the four proximal EBS mutants M5 (-88), M6 (-48), M7 (-11) and M9 (+20) were activated by Erg respectively 1.7-, 3.2-, 3.8-, 3.8-



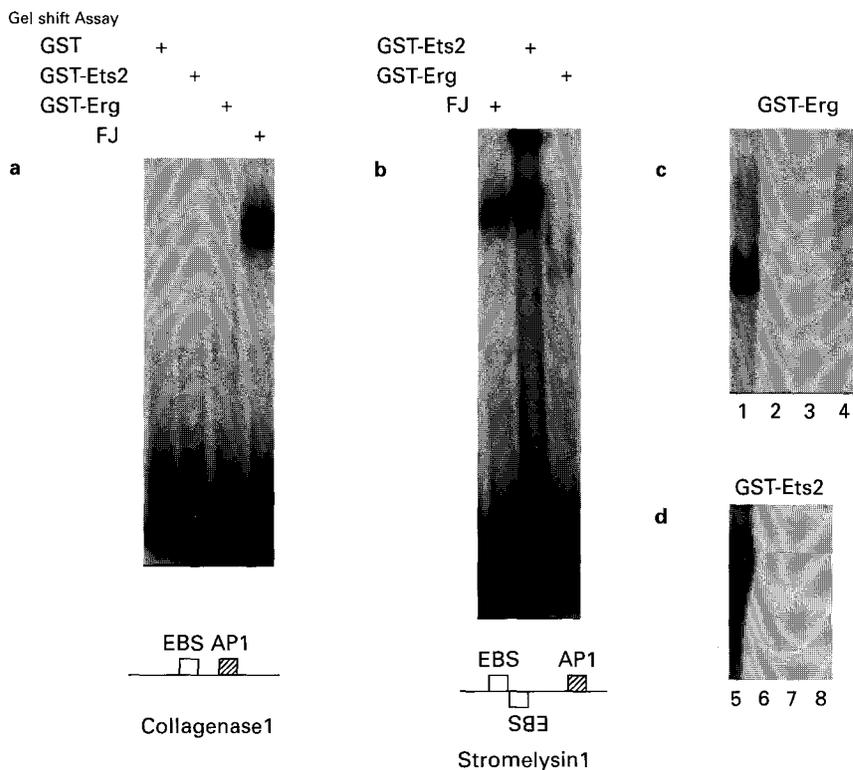
**Figure 3** Collagenase1 target motif for Erg transcriptional activation. Erg and Ets2 transactivate collagenase1 gene *via* the same core element. (a) The GGA(A/T) core sequences in the collagenase1 promoter were mutated to AAAA. The wild type and the mutant promoters were transfected with control or Erg expressing plasmids. Results from five independent experiments, expressed as transactivation fold, show that mutation of the distal GGA(A/T) cores (M1 to M4) does not significantly affect Erg activation of the collagenase1 promoter. In contrast, mutation in the three proximal GGA(A/T) cores M5, M6, and M7 reduces Erg transactivation. The M5 and M7 mutation reduces both the basal and Erg mediated activation, whereas the M6 mutation increases the basal activity twofold compared to the wild type expression. (b) The collagenase1 (-610 to +61) and mutant promoter constructs (M1 to M9 as in (a)) were cotransfected with a control plasmid (pSG5) or plasmids expressing Erg or Ets2. The graph shows that among the eleven potential Ets binding sites, the one at position -88 (M5) is a major motif in the Erg transactivation of the collagenase1 gene promoter. The same site is also a target for Ets2 transactivation. Results from one representative experiment are the average of two wells. Note that M3, M4 and M8 were better trans-activated by Erg compared to the wild type promoter (see also a)

and 5.1-fold compared to 8.4-fold for the wild type promoter. The M5, M7 and M9 mutation reduced both the basal and Erg mediated activation, while the M6 mutation increased the basal activity by twofold, compared to the wild type (see Figure 3b). Therefore, the activation fold by Erg of this mutant was apparently decreasing. We also noted that Ets2, although a weaker activator of collagenase1 promoter than Erg, displayed a pattern of activation of the mutants similar to that of Erg (Figure 3b). We therefore conclude that the same GGAT containing sequence at position -88 (M5) is the major target site for collagenase1 promoter activation by Erg and Ets2.

*Erg binds to the stromelysin1 promoter but not to the collagenase1 promoter*

To investigate whether the differential activation of the collagenase1 and stromelysin1 promoters by Erg was simply due to a different binding of Erg, we performed *in vitro* gel shift assays. We note that the collagenase1 and stromelysin1 promoters contain similar consensus sequence motifs such as EBS and AP1 sites. However, the number and position of the motifs differ between the two promoters. The stromelysin1 promoter has two copies (-217 and -200) of EBS, spaced by 130 nucleotides from the AP1 site (-70) (Buttice and

Kurkinen, 1993). The collagenase1 promoter contains, as demonstrated here, one functional EBS (-88) where the GGAT sequence is spaced by ten nucleotides from the AP1 motif (-73). For gel shift assays, we used promoter fragments of about 300 bp. Restriction fragments for collagenase1 (-296 to +61) and stromelysin1 (-274 to -11) were end-labelled with <sup>32</sup>P to a similar specific activity and incubated with bacteria-produced GST-fusion proteins for Ets2, Erg and/or with *in vitro* synthesized Fos and Jun. Surprisingly, the GST-Erg fusion protein bound to the stromelysin1 (Figure 4b) but not to the collagenase1 promoter (Figure 4a). The complex of the stromelysin1 promoter with Erg was very consistent but not as strong as with Ets2 (Figure 4b). Interestingly, Erg and Ets2 binding to the stromelysin1 promoter required both copies of the Ets-binding sites (Figure 4c and d). In contrast, the collagenase1 promoter did not show any detectable binding to the GST-Erg or to the GST-Ets2 fusion protein, at these conditions (Figure 4a) or even at low ionic salt conditions (data not shown). The lack of binding of the Ets-fusion proteins to the collagenase1 promoter cannot be attributed to the experimental conditions since the *in vitro* synthesized Fos and Jun bind strongly to the collagenase1 and stromelysin1 promoters (Figure 4a and b). Similarly, it seems unlikely that the lack of

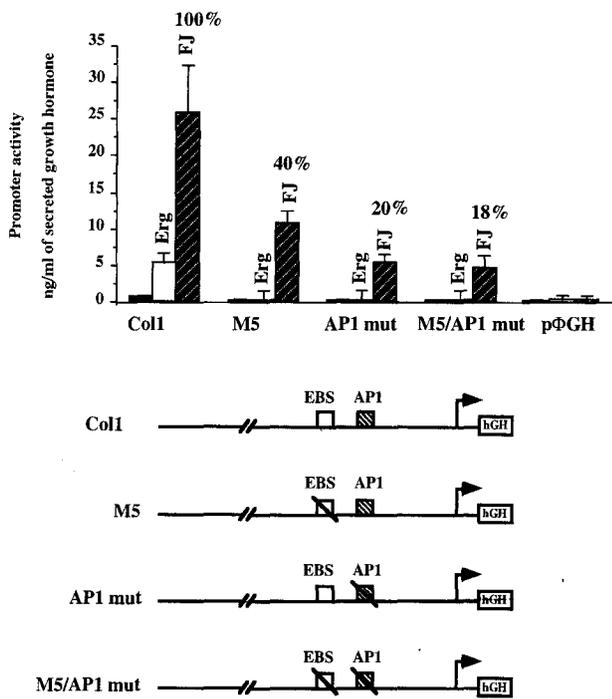


**Figure 4** Binding of Ets2, and Erg to the collagenase1 and stromelysin1 promoter fragments. (a and b) The promoter fragments of the human collagenase1 (-296 to +61) and stromelysin1 (-274 to -11) genes were end-labelled with <sup>32</sup>P and incubated with 100 ng of purified recombinant GST-Ets2, GST-Erg, or 1-2  $\mu$ l of *in vitro* translated Fos and Jun proteins (FJ). The complexes were separated from the free probe by 6% polyacrylamide gel electrophoresis in Tris-glycine buffer. Note that the upper band present in the lane of the stromelysin1 promoter shifted by GST-Erg is an artefact. It is a contaminant product copurified with the GST-Erg protein. (c and d) The stromelysin1 promoter fragments (-274 to -101) corresponding to the 5' end of the (-274 to -11) fragment and containing only the two wild types EBS (lane 1 and 5), the mutated distal (lane 2 and 6) or proximal site (lane 3 and 7) and both (lane 4 and 8), as previously described (Buttice and Kurkinen, 1993), were incubated with GST-Erg (lane 1 to 4) or with GST-Ets2 (lane 5 to 8). The complexes were resolved by 6% gel in Tris-glycine buffer (c) or in 0.25  $\times$  TBE (d). Note that two intact EBS are required for the binding of Ets2 and Erg proteins to the stromelysin1 promoter. A representation of the collagenase1 and stromelysin1 promoter shows the functional EBS (empty box) and the AP1 sites (shaded box)

binding observed in the collagenase1 promoter could be due to the conformation of GST-fusion proteins, since they (GST-Ets2 and GST-Erg) bind to the stromelysin1 promoter (Figure 4b, c and d). These results suggest that the transcription factor binding to the promoter does not necessarily correlate with the transcriptional gene activation.

*The AP1 site of the collagenase1 promoter is required for Erg activation*

The AP1 site (-73) of the collagenase1 promoter is spaced by ten nucleotides from the Erg target motif. Previously, it has been suggested that the AP1 site is necessary for efficient activation by v-Ets and c-Ets1 (p68) (Wasylyk and Wasylyk, 1992). From our results, it appears that Erg activates the collagenase1 promoter through one specific motif at -88. However, Erg does not bind *in vitro* to this site or other sites in the collagenase1 promoter. To explore the role of the collagenase1 AP1 site in the promoter activation by Erg, we first performed transfection experiments with the wild-type collagenase1 promoter and the AP1

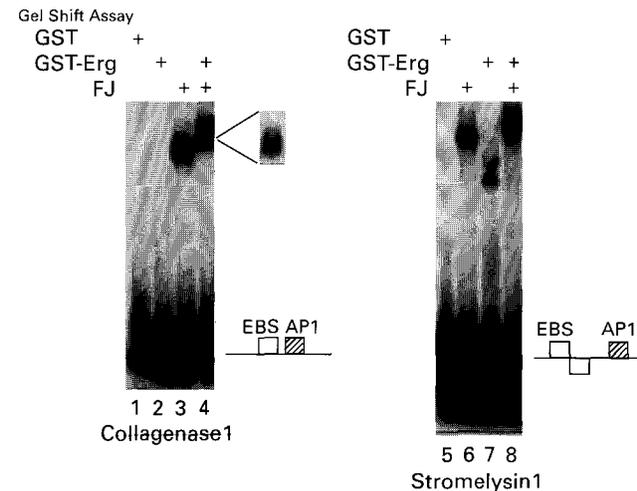


**Figure 5** The AP1 site is necessary for the collagenase1 promoter activation by Erg. HepG2 cells were transiently transfected with the collagenase1 promoter, the M5 mutant (EBS mut), or the AP1 mutant or the double mutant (EBS/AP1 mut) together with equal amount of Erg or Fos and Jun expression plasmids. Note that the EBS is only required for Erg but not for Fos/Jun activation (FJ), while mutation of the AP1 site abolishes Erg activation (see AP1 mut). The graph shows the absolute values of promoter activity with error bars from four transfections. The percentage of the Fos/Jun induced activity as compared to the wild type is indicated on top of the bars. We note that, in comparison with the Col1 promoter, the AP1 mutant showed an absolute reduction (20%) of Fos/Jun induced activity. Remark: the actual ratios of Fos/Jun-induced promoter activities divided by the basal promoter activities appear difficult to interpret since the basal levels themselves are also affected by the mutation. A schematic representation of the promoter constructs, with the functional target sites for the oncoproteins studied, is also indicated

promoter mutant. In this mutant, the first thymidine of the AP1 consensus site (TGAGTCA) was substituted by adenosine. The activation of these promoters by Erg and Fos/Jun in transfected cell was then compared. As shown in Figure 5, collagenase1 promoter was transactivated by both Erg and Fos/Jun. As before, mutation at -88 (M5) prevented the Erg activation, however it did not have any significant effect on the activation by Fos/Jun. Surprisingly, mutation of the AP1 site also abolished the Erg activation, indicating that the AP1 site is involved in the Erg regulation of collagenase1 promoter. It is of interest that the promoter AP1 mutant and the double mutant EBS/AP1 are still activated by Fos/Jun, suggesting that other sites in the collagenase1 promoter (-610 to +61) can function as targets for Fos/Jun. We note that, along the entire collagenase1 promoter studied here, there are three other putative AP1-like sites that can account for the residual Fos/Jun activation. However, the functional role of these sites need still to be explored.

*Erg interacts with the Fos/Jun complex*

The involvement of the AP1 site in the collagenase1 promoter activation by Erg prompted us to investigate a possible mechanism of interaction between Erg, Fos and Jun proteins. To study the role of the promoter DNA in such interactions we used gel shift assays.



**Figure 6** Erg supershifts the Fos/Jun complex formed with collagenase1 and stromelysin1 promoter fragments. The promoter fragments of the human collagenase1 (-296 to +61) and stromelysin1 (-274 to -11) were end-labelled with <sup>32</sup>P and incubated with 100 ng of purified recombinant GST-Erg (lanes 2 and 7) or GST alone as control (lanes 1 and 5). For the binding with Fos and Jun, 1-2 μl of *in vitro* translated products were used (lanes 3 and 6). Co-incubation of GST-Erg (100 ng) and Fos/Jun (1-2 μl) were simultaneously performed with collagenase1 or stromelysin1 probe (lanes 4 and 8). The complexes were resolved in 6% polyacrylamide gel electrophoresis in Tris-glycine buffer. The gels were dried and exposed 8 h. In control experiments Fos/Jun did not bind the collagenase1 AP1 mutant while it bound to the collagenase1 EBS mutant (data not shown). Note the shift in molecular weight of Fos/Jun complex when coincubated with GST-Erg (lanes 4 and 8), and the two bands more visible in a shorter exposure (2 h) of the same gel (small boxed picture). The upper band in lane 7 is an artefact due to a high molecular weight contaminant product copurified with the GST-Erg protein

Labelled collagenase1 probe was incubated with GST-Erg fusion protein alone, or in combination with *in vitro* synthesized Fos and Jun (Figure 6). In contrast to the stromelysin1 promoter (Figures 4 and 6), collagenase1 promoter did not bind to the GST-Erg protein alone whereas it showed a strong binding to the Fos/Jun heterodimer. In control experiments Fos/Jun did not bind the collagenase API mutant while it bound to the collagenase EBS mutant (data not shown). Interestingly, co-incubation of the GST-Erg with Fos and Jun yielded two distinct complexes at the collagenase1 promoter, that both migrated with a slower mobility than the complex formed with Fos/Jun alone. Although we cannot distinguish the nature of these two complexes, one possibility is that the slower migrating complex represents a complex of Fos, Jun and Erg. As seen also before (Figure 4), no detectable complex was formed with Erg alone (Figure 6), suggesting that the Fos/Jun complex at the API site may help Erg to bind to the collagenase1 promoter. Of interest is that the Erg complex at the stromelysin1 was supershifted when co-incubated with Fos/Jun, indicating that Erg may associate with Fos and Jun.

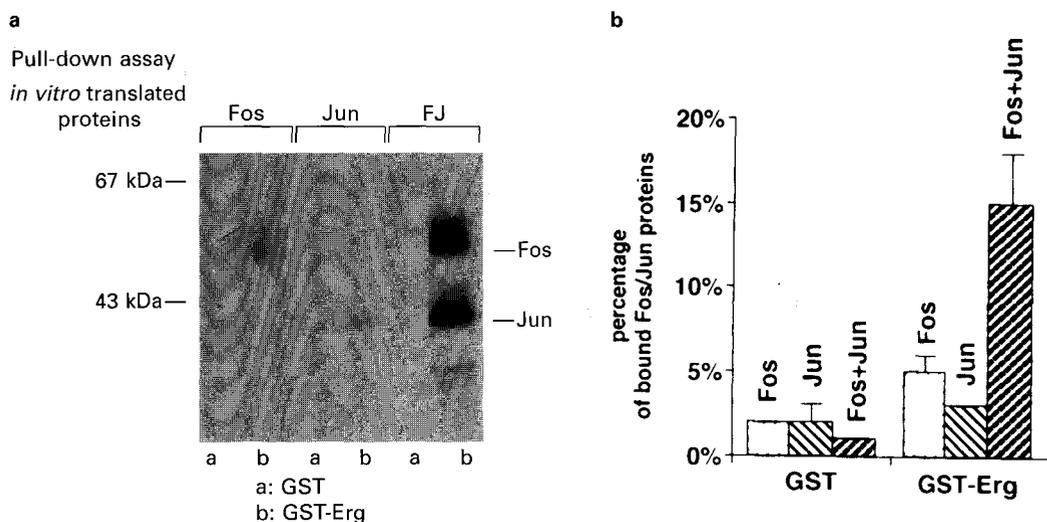
To further investigate the molecular mechanism of the API site involvement in Erg activation, we hypothesized that the two motifs, API at -73 and EBS at -88, could facilitate direct protein interaction of Erg and Fos/Jun. We used the *in vitro* protein interaction assay (pull-down) with bacteria-produced GST-Erg fusion protein and <sup>35</sup>S-labelled *in vitro* synthesized Fos and Jun from reticulocyte lysate. The GST-Erg protein was immobilized to Sepharose beads and the bound Fos, Jun and Fos/Jun products were eluted and analysed in SDS-PAGE gel (Figure 7). The Fos or Jun protein alone gave only a faint signal (~5% and ~2.5% of the total input respectively), suggesting that they bind poorly to the Erg protein. In contrast, when Fos and Jun were incubated together, they were able to strongly bind the Erg protein

(Figure 7, last lane) by reaching 15% of the total input. As shown in Figure 7, no signal was detectable with the GST protein attached to the Sepharose beads used as a negative control. In addition, an unrelated <sup>35</sup>S-labelled protein such as luciferase did not bind to the GST-Erg (data not shown), suggesting that the binding of Fos/Jun to the Erg protein is specific. These data are consistent with our gel shift studies (Figure 6) and suggest that Erg can directly interact with the Fos/Jun complex. Although the results from gel shift and pull-down experiments do not necessarily reflect the *in vivo* interactions that may occur in transient gene transfection assays, they suggest a possible regulatory mechanism, implying both protein-DNA and protein interactions.

**Discussion**

Our previous studies demonstrated that the human collagenase1 and stromelysin1 promoters are similarly regulated in transfected cells by several transcription factors/oncoproteins that are genetic markers for different types of cancers (Buttice and Kurkinen, 1994; Curran and Vogt, 1992). The data described in this study represent the first example of a transcription factor/oncoprotein, Erg (an Ets-family member) that activates collagenase1 promoter but not stromelysin1 promoter. Rather, Erg completely prevents stromelysin1 promoter activation by other Ets and Fos/Jun oncoproteins (data not shown). We also provide evidence that the API site is necessary for collagenase1 promoter activation by Erg, and that Erg interacts with the Fos/Jun heterodimer.

Collagenase1 and stromelysin1 genes share similar or identical promoter elements that are targets for regulation by oncogene products. The API site, that binds the Fos and Jun transcription factors, is a well conserved sequence-motif in collagenase1 and stromely-



**Figure 7** Erg interacts with the Fos/Jun complex. (a) The figure shows an *in vitro* protein interaction assay (pull-down) between GST-Erg fusion proteins and <sup>35</sup>S-labelled Fos and Jun proteins. GST-Erg (residues 1-462) fusion protein (125 pmol) or GST alone was immobilized on Glutathione Sepharose beads and incubated with *in vitro* translated Fos, Jun, and Fos/Jun. After extensive washing, the bound proteins were analysed by SDS-PAGE, visualized by autoradiography (3 h exposure) and the amount of bound Fos and Jun was quantitated by PhosphorImager analysis. Note the lack of binding of Fos/Jun to GST alone. The [<sup>35</sup>S]luciferase used as an unrelated protein did not bind to the GST-Erg (not shown). Molecular size markers are shown in kilodaltons. (b) The graph shows the amount of bound Fos, Jun or Fos/Jun to the GST or the GST-Erg proteins expressed in percentage of the total input (not shown). The bars indicate the standard error from two independent experiments

sin1 genes while the Ets-binding sites differ by sequence and position between the two genes. Previously, based only on sequence homology with the PEA3 element of the polyoma virus enhancer, a GGAT motif was identified in the collagenase1 promoter (−89 to −82). This motif was further studied as a multimerized sequence linked to the  $\beta$ -globin promoter and thus defined as a target for Ets1 (p68) transactivation (Gutman and Wasylyk, 1990; Wasylyk and Wasylyk, 1992). However, additional GGA(A/T) motifs with different flanking sequences are present in the human collagenase1 promoter and thus the function and role of the other GGA(A/T) core sequences in the collagenase1 gene regulation were unknown.

We demonstrate here that an Ets related gene product, Erg, activates the collagenase1 promoter *via* a GGAT target motif at position −88. Our results also suggest that, among the other eleven GGA(A/T) motifs with different flanking sequences (Table 1), only the motifs proximal to the transcription start site at −48 and −11 also contribute to the Erg regulation. Therefore, it is possible that the close proximity of these target motifs to the transcription start site reflects transcription factor interactions with the transcription apparatus. Surprisingly, the collagenase1 AP1 site at position −73 is also required for Erg activation, suggesting that the transcription factors (Fos/Jun) that bind to it might serve as a mediator of interaction between the Ets factors and the basal transcription complex. This hypothesis is consistent with our novel finding that the Erg protein physically interacts with the Fos/Jun complex *in vitro* and is in agreement with recent studies showing that Fos interacts with the TATA-binding protein (TBP) of the transcription apparatus (Metz *et al.*, 1994).

Although Erg activates collagenase1 promoter *via* the GGAT motif at −88, we could not detect in gel shift assay any binding of the Erg protein to the promoter. However, the binding may take place because of protein interaction with Fos/Jun bound to the nearby AP1 site. This notion is consistent with our gel shift data showing that in the presence of Fos/Jun, Erg supershifts the Fos/Jun complex of the promoter. The effects of Erg on the collagenase1 promoter strongly resemble that of Elk, another Ets family member, at the Fos promoter. Elk does not bind to the EBS near the serum responsive element (SRE), unless it is recruited by the serum responsive factor (SRF) at the adjacent site SRE (Shaw *et al.*, 1989). So far, this represents an interesting aspect of two distantly related Ets family member, Elk and Erg that display similar features of binding and gene activation following an interaction with a second partner, SRF for Elk and Fos/Jun for Erg.

In contrast to the collagenase1 promoter, Erg binds in gel shift assay to the stromelysin1 promoter and yet it does not activate this gene. A simple interpretation of our data would be that Erg at stromelysin1 promoter, masks sites that are targets for activators. Secondly, the sequence and the EBS arrangement in stromelysin1 promoter are significantly different from the collagenase1 promoter, suggesting that the particular tail-to-tail arrangement of the stromelysin1 pair of EBS brings together two monomers of Erg which would have inhibiting effect on promoter activity. On the other hand, we cannot exclude the possibility that Erg forms heterodimers with Ets2 at the stromelysin1 EBS pair and, as a result, the dimeric

complex would be transcriptionally inactive. This would also explain how Erg can inhibit stromelysin1 activation by Ets2, but it would imply that Erg and Ets2 must interact to form the heterodimer. Indeed, we have recently detected by gel shift and pull-down assays that in the presence of Ets2, Erg supershifts the stromelysin1 promoter fragment and that Erg physically associates with distinct domains of Ets2 (JP Basuyaux *et al.*, in preparation). Thus, although protein interactions between different Ets-family members may be required for differential gene regulation, they cannot be sufficient as regulation also depends on the promoter sequence.

Finally, the spacing between the EBS and the AP1 motifs differs between the stromelysin1 and collagenase1 genes (respectively 130 and 10 nucleotides). The 130 nucleotide stretch contains several motifs that may bind transcription factors including NF-IL6 (nuclear factor-IL6), NIP (nuclear inhibitor protein), or high mobility group (HMG) proteins that function as architectural components. Of interest is that NF-IL6 has been shown to interact with Fos and Jun *via* their leucine zippers (Hsu *et al.*, 1994) and that HMG protein can induce a sharp bend in DNA (for review, see Landsman and Bustin, 1993). In line with this, Giese *et al.* have recently provided evidence that a multiprotein complex of Ets1, PEBP2 $\alpha$  (polyomavirus enhancer binding protein), ATF/CREB (activating transcription factor/CRE-binding protein) and LEF-1 (lymphoid enhancer factor-1) formed at the minimal TCR $\alpha$  (T cell receptor  $\alpha$ ) enhancer contributes to the synergistic function of these factors (Giese *et al.*, 1995). The authors demonstrate that although Ets1 does not bind alone to its binding site, it can physically associate with PEBP2 $\alpha$  at the adjacent site. Ets1 can also contact the ATF/CREB factor at the distant site. These multiple interactions are facilitated by the presence of the regulatory lymphocyte enhancer-binding factor1 (LEF-1) that bends DNA. Therefore, it is possible that interactions of different transcription factors that are interspersed between the EBS and AP1 sites of the stromelysin1 promoter could explain why stromelysin1 gene is differently regulated from collagenase1 gene. Combinatorial protein interactions play an important part in gene regulation, since only minute changes in transcription factors can lead to synergistic activation or repression of gene expression and therefore provide precise control for transcription.

It is significant that we have now found that Erg provides a major switch between the expression of stromelysin1 and collagenase1 genes in transfected cells. Matrix metalloproteinases share homologous gene sequences and similar promoter elements. Despite their similarity, they show differential expression in response to several stimuli, probably by recruiting different sets of transcription factors. In addition, collagenase1 and stromelysin1 are enzymes with distinct substrate specificities. For instance, stromelysin1 has the widest range of substrates and can degrade almost any extracellular matrix component including type IV collagen, the main component of basement membranes. Stromelysin1 is also a potent activator of other MMPs such as collagenase1 (Murphy *et al.*, 1987), and the 92 kDa type IV procollagenase (Shapiro *et al.*, 1995) and therefore can act as a major control point and upstream regulator of the extracellular matrix degradation and

tissue remodelling. On the other hand, collagenase1 digests only fibril-forming collagens type I, II and III (Imai *et al.*, 1995), which are the most abundant proteins in the body, mainly present in bone and cartilage. In summary, our results show that collagenase is an Erg-regulated gene. Of interest is that Erg is expressed during embryogenesis in skeletal tissues. Therefore, it will be important to study and differentiate the collagenase1 and stromelysin1 gene regulation by Erg in cells *in vivo*, in the context of normal ontogenesis as well as in tumor progression.

## Materials and methods

### Constructs

The human collagenase1 promoter (-610 to +61) was cut with HaeIII, ligated to HindIII linkers and cloned into the HindIII site of the human growth hormone reporter gene, pΦGH (S Quinones and MK, unpublished data). To generate the 5' deletion mutants, this construct was linearized with ScaI, FokI or HinfI and the ends generated by FokI and HinfI were then filled-in with T7 polymerase (Pharmacia). The fragments with 5' blunt ends were released by cutting at the 3' end with XbaI and cloned into pΦGH vector which was blunted at the Sall site and sequentially digested at the XbaI site. The resulting constructs named -297Col, -76Col and -37Col contain promoter fragments extending respectively from -297, -76, -37 to +61 in respect to the +1 transcription start site.

The collagenase1 promoter mutants of the Ets binding sites were constructed by the polymerase chain reaction (PCR) (Ho *et al.*, 1989). The collagenase1 gene promoter (-610 to +61) linked to the human growth hormone reporter gene was used as template. The following primers were used: the 5' flanking primer 1 (+) (5'-AAGCTTCCTCCTGAAATTCGGGATTATAG-3') at -610 of the collagenase1 promoter sequence contained a tailed HindIII site; the 3' flanking primer 2 (-) (5'-GAGCTGTCCACAGGACCCCT-3') at position 50 of the growth hormone reporter gene (pΦGH). Forward primers and the complementary reverse primers with two central AA or TT were used to mutate the GG of the GGA(A/T) core sequences. The following forward primer (5'-GTTATAAAG-CAGGAGTCAGACAGCCTCT-3') and the complementary reverse primer (5'-AGAGGCTGTCTGACTCCTGCTTTA-TAAC-3') were used for the API mutant. The PCR products were purified by agarose gel, sub-cloned in PCRII vector (Invitrogen) and the sequence confirmed by the dideoxy termination method. The mutant collagenase1 promoter fragments were then cloned into the HindIII site of the pΦGH reporter gene.

The stromelysin1 promoter constructs were prepared as described (Buttice and Kurkinen, 1990, 1993).

### Cell culture

Human HepG2 hepatocarcinoma cells (HB8065) from American Type Culture Collection were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) containing 10% fetal calf serum (FCS), streptomycin (100 μg/ml), penicillin (100 units/ml).

### Transient transfection and reporter gene assay

The human growth hormone was used as a reporter to study the regulation of the human collagenase1 and stromelysin1 genes in transiently transfected cells in culture. For the experiments, HepG2 cells were grown on 96-well microtiter plates (Buttice and Kurkinen, 1990).

100 ng of total DNA per well was transfected overnight using calcium phosphate procedure with the cell transfect kit (Pharmacia). Cultures were then rinsed twice and incubated for 24 h in DMEM containing 10% FCS plus antibiotics after which the culture medium was removed and assayed for secreted growth hormone using a solid phase radioimmunoassay kit (Nichols Institute). Experiments were carried out in triplicate or quadruplicate wells and repeated several times using two different DNA preparations. In cotransfections, the DNA consisted of equal amounts of a target gene (100 ng/well) and (100 ng/well) plasmids expressing c-Ets2, c-Erg, or c-Fos/c-Jun. To construct the c-ets2 expression plasmid (Buttice and Kurkinen, 1993), an EcoRI insert from the human c-ets2 cDNA, a kind gift of Dennis Watson (Watson *et al.*, 1988), was isolated from low melting point agarose gel and ligated to SV40 early promoter in pSVK3 vector (Pharmacia). The cloning of c-erg expression vectors (pSG5) containing respectively the human c-erg (isoform p55<sup>erg</sup>) has been previously described (Duterque-Coquillaud *et al.*, 1993). The pSV-c-jun and pBK28 expressing mouse c-Jun (Lamph *et al.*, 1988) and human c-Fos (Sassone-Corsi *et al.*, 1988), respectively, were kind gifts of Inder Verma. All DNA preparations were purified by centrifugation twice through a CsCl gradient.

### In vitro synthesis of oncoproteins

Rat cDNAs for c-fos and c-jun (Rauscher *et al.*, 1988) were kindly provided by Tom Curran. The transcription and translation of the cDNAs were simultaneously performed using the TNT coupled reticulocyte lysate system and [<sup>35</sup>S]methionine, according to the instructions of the manufacturer (Promega). The translation products were visualized in SDS-minigel and quantified by Phosphor Imager (Molecular Dynamics). The GST-Ets2, and GST-Erg fusion proteins were expressed in DH5α *E coli*, purified on Glutathione-Sepharose beads (Pharmacia) as described (JP Basuyaux *et al.*, in preparation).

### Gel shift

Restriction fragments from the collagenase1 and stromelysin1 promoters were isolated by agarose gel electrophoresis and end-labelled to similar specific activity using T7 DNA polymerase and [<sup>32</sup>P]dNTP. The binding reaction mixture (20 μl) contained 0.4 ng of probe (20 000 c.p.m.), 1-2 μl of the *in vitro* translation products Fos and Jun, or 100 ng of GST-Ets2, GST-Erg, fusion proteins and 17 μl of binding reaction buffer (12 mM HEPES pH 7.9; 4 mM Tris-HCL pH 7.9; 50 mM NaCl, 10 mM KCl; 1 mM EDTA, 1 mM DDT, 200 μg/ml bovine serum albumine, 12% glycerol, 100 μg/ml poly(dI-dC; dI-dC)). Protein-DNA complexes were resolved by 6% polyacrylamide (acrylamide/bis-acrylamide 37.5:1, Biorad) gel in 1 × Tris-glycine gel shift buffer (50 mM Tris-HCl, 380 mM glycine, 2 mM EDTA) at constant current of 30 mA. Autoradiography was performed on dried gels using an extra film to quench radioactivity arising from the <sup>35</sup>S-labelled proteins.

### Acknowledgements

We thank Frédérique Dewitte for technical assistance, Drs Simon Saule and Jean Coll for critical reading of the manuscript and Nicole Devassine for patient typing. This work was supported by a grant no 1093 from the Association pour la Recherche sur le Cancer.

## References

- Angel P, Imagawa M, Chiu R, Stein B, Imbra RJ, Rahmsdorf HJ, Jonat C, Herrlich P and Karin M. (1987). *Cell*, **49**, 729–739.
- Birkedal-Hansen H. (1995). *Curr. Opin. Cell Biol.*, **7**, 728–735.
- Bradford AP, Conrad KE, Wasylyk C, Wasylyk B and Gutierrez HA. (1995). *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 2849–2857.
- Buttice G and Kurkinen M. (1990). *Nucleic Acids Res.*, **18**, 3079.
- Buttice G and Kurkinen M. (1993). *J. Biol. Chem.*, **268**, 7196–7204.
- Buttice G and Kurkinen M. (1994). *Contrib. Nephrol.*, **107**, 101–107.
- Buttice G, Quinones S and Kurkinen M. (1991). *Nucleic Acids Res.*, **19**, 3723–3731.
- Crépieux P, Coll J and Stéhelin D. (1994). *Critic. Rev. Oncogenesis*, **5**, 615–638.
- Curran T and Vogt PK. (1992). Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.
- Dalton S and Treisman R. (1992). *Cell*, **68**, 597–612.
- Dhordain P, Dewitte F, Desbiens X, Stéhelin D and Duterque-Coquillaud M. (1995). *Mec. Dev.*, **50**, 17–28.
- Dudek H, Tantravahi RV, Rao VN, Reddy ESP and Reddy EP. (1992). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 1291–1295.
- Duterque-Coquillaud M, Niel C, Plaza S and Stéhelin D. (1993). *Oncogene*, **8**, 1865–1873.
- Gack S, Vallon R, Schmidt J, Grigoriadis A, Tuckermann J, Schenkel J, Weiher H, Wagner EF and Angel P. (1995). *Cell Growth Differ.*, **6**, 759–767.
- Gégonne A, Bosselut R, Bailly RA and Ghysdael J. (1993). *EMBO J.*, **12**, 1169–1178.
- Giese K, Kingsley C, Kirschner JR and Grosschedl R. (1995). *Genes Dev.*, **9**, 995–1008.
- Grant PA, Thompson CB and Pettersson S. (1995). *EMBO J.*, **14**, 4501–4513.
- Gutman A and Wasylyk B. (1990). *EMBO J.*, **9**, 2241–2246.
- Hipskind RA, Rao VN, Mueller CGF, Reddy ESP and Nordheim A. (1991). *Nature*, **354**, 531–534.
- Ho I-C, Bhat NK, Gottschalk LR, Lindsten T, Thompson CB, Papas TS and Leiden JM. (1990). *Science*, **250**, 814–818.
- Ho SN, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK and Pease LR. (1989). *Gene*, **77**, 51–59.
- Hsu W, Kerppola TK, Chen PL, Curran T and Chen KS. (1994). *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 268–276.
- Ichikawa H, Shimizu K, Hayashi Y and Ohki M. (1994). *Cancer Res.*, **54**, 2865–2868.
- Imai K, Yokohama Y, Nakanishi I, Ohuchi E, Fujii Y, Nakai N and Okada Y. (1995). *J. Biol. Chem.*, **270**, 6691–6697.
- Janknecht R and Nordheim A. (1993). *Biochem. Biophys. Acta*, **1155**, 346–356.
- John S, Reeves RB, Lin JX, Child R, Leiden JM, Thompson CB and Leonard WJ. (1995). *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 1786–1796.
- Karim FD, Urness LD, Thummel CS, Klemsz MJ, McKercher SR, Celada A, Beveren CV, Maki RA, Gunther CV, Nye JA and Graves BJ. (1990). *Genes Dev.*, **4**, 1451–1453.
- Kola I, Brookes S, Green AR, Garber R, Tymms M, Papas TS and Seth A. (1993). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 7588–7592.
- Lamph WW, Wamsley P, Sassone-Corsi P and Verma IM. (1988). *Nature*, **334**, 629–631.
- Landsman D and Bustin M. (1993). *Bioessays*, **15**, 539–546.
- Laudet V, Niel C, Duterque-Coquillaud M, Leprince D and Stéhelin D. (1993). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **190**, 8–14.
- MacDougall JR and Matrisian LM. (1995). *Cancer Metastasis Rev.*, **14**, 351–362.
- Metz R, Bannister AJ, Sutherland JA, Hagemeyer C, O'Rourke EC, Cook A, Bravo R and Kouzarides T. (1994). *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 6021–6029.
- Murphy G, Cockett MI, Stephens PE, Smith BJ and Docherty A. (1987). *Biochem. J.*, **248**, 265–268.
- Nelsen B, Tian G, Erman B, Gregoire J, Maki R, Graves B and Sen R. (1993). *Science*, **261**, 82–86.
- Nerlov C, Rorth P, Blasi F and Johnsen M. (1991). *Oncogene*, **6**, 1583–1592.
- Nye JA, Petersen JM, Gunther CV, Jonsen MD and Graves BJ. (1992). *Genes Dev.*, **6**, 975–990.
- Pongubala JMR, Nagulapalli S, Klemsz MJ, McKercher SR, Maki RA and Atchinson ML. (1992). *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 368–378.
- Ptashne M. (1988). *Nature*, 683–689.
- Quinones S, Saus J, Otani Y, Harris JED and Kurkinen M. (1989). *J. Biol. Chem.*, **264**, 8339–8344.
- Rabbitts TH. (1994). *Nature*, **372**, 143–149.
- Rauscher FJ, Voulalas PJ, Franza BRJ and Curran T. (1988). *Genes Dev.*, **2**, 1687–1699.
- Sassone-Corsi P, Lamph WW, Kamps M and Verma IM. (1988). *Cell*, **54**, 553–560.
- Seth A, Watson DK, Blair DG and Papas TS. (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 7833–7837.
- Shapiro S, Fliszar JC, Broekelmann TJ, Mecham RP, Senior RM and Welgus WG. (1995). *J. Biol. Chem.*, **270**, 6351–6356.
- Shaw PE, Schröter H and Nordheim A. (1989). *Cell*, **56**, 563–572.
- Sorensen PH, Lessnick SL, Lopez TD, Liu XF, Triche TJ and Denny CT. (1994). *Nat. Genet.*, **6**, 146–151.
- Stetler-Stevenson WG, Aznavoorian S and Liotta LA. (1993). *Ann. Rev. Cell Biol.*, **9**, 541–573.
- Tymms MJ and Kola I. (1994). *Mol. Reprod. Dev.*, **39**, 208–214.
- Wang CY, Bassuk AG, Boise LH, Thompson CB, Bravo R and Leiden JM. (1994). *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 1153–1159.
- Wasylyk B, Hahn SL and Giovane A. (1993). *Eur. J. Biochem.*, **211**, 7–18.
- Wasylyk B, Wasylyk C, Flores P, Begue A, Leprince D and Stéhelin D. (1990). *Nature*, **346**, 191–193.
- Wasylyk C, Gutman A, Nicholson R and Wasylyk B. (1991). *EMBO J.*, **10**, 1127–1134.
- Wasylyk C and Wasylyk B. (1992). *Cell Growth Differ.*, **3**, 617–625.
- Watson DK, McWilliams MJ, Lapis P, Lautenberger JA, Schweinfest CW and Papas TS. (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 7862–7866.
- Werb Z and Alexander CM. (1994). *Proteinases and matrix degradation*. WB Saunders Co.
- Wernert N, Raes MB, Lassalle P, Dehouck MP, Gosselin B, Vandenbunder B and Stéhelin D. (1992). *Am. J. Pathol.*, **140**, 119–127.
- Wu H, Moulton K, Horval A, Parik S and Glass C. (1994). *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 2129–2139.

#### 4.1.2. Discussion.

Des études antérieures ont montré que les promoteurs de la collagénase-1 et de la stromélysine-1 sont régulés d'une manière semblable par différents facteurs de transcription caractérisés comme des oncoprotéines et des marqueurs génétiques de différents cancers (Curran et Vogt, 1992, Buttice et Kurkinen, 1994). Nous rapportons ici le premier exemple d'un facteur de transcription qui induit le promoteur de la collagénase-1, mais pas celui de la stromélysine-1. Il s'agit de Erg, un membre de la famille Ets.

Les promoteurs de la collagénase-1 et de la stromélysine-1 présentent un site AP-1 conservé (en position -72 et -70) et des sites EBS qui diffèrent à la fois par leur séquence et leur position. Ces sites sont les cibles des facteurs de transcription des familles Fos-Jun et Ets. Le site EBS (-89) du promoteur de la collagénase-1 contient un cœur GGAT qui a d'abord été identifié par homologie avec le site PEA3 du virus du polyome. Un gène rapporteur contrôlé par des copies de ce site est induit par la protéine Ets1 (p68 de poulet) (Gutman et Wasylyk, 1990, Wasylyk et Wasylyk, 1992). D'autres motifs GGA(A/T) avec des séquences flanquantes différentes sont présents dans le promoteur de la collagénase-1, mais leur fonction était jusqu'ici inconnue.

Nous montrons que Erg induit le promoteur de la collagénase-1 *via* un site EBS (-89). Nos résultats indiquent également que, parmi les 11 autres motifs GGA(A/T) du promoteur de la collagénase-1 (-610/+61), seuls les motifs proches du site d'initiation de la transcription (-48 GGAA) et (-14 TTCC) contribuent également à l'induction par Erg. La proximité de ces sites pourrait favoriser une interaction entre facteurs de transcription et machinerie transcriptionnelle. D'une manière inattendue, le site AP-1 est également nécessaire à l'induction par Erg. Cette observation suggère que des facteurs Fos-Jun liant ce site sont des intermédiaires dans l'interaction de Erg avec la machinerie transcriptionnelle. Cette hypothèse est confortée par notre découverte d'une interaction protéique *in vitro* entre Erg et le complexe c-Fos / c-Jun, ainsi que par des études qui montrent que des facteurs Fos interagissent avec TBP, la protéine de la machinerie transcriptionnelle qui lie la boîte TATA (Metz, et al., 1994a, Metz, et al., 1994b).

Bien que Erg induise le promoteur de la collagénase-1 *via* le site EBS (-89), nous n'avons pas détecté de liaison de Erg au promoteur en test de retard sur gel. Cependant, Erg retarde le complexe formé par c-Fos / c-Jun sur un fragment du promoteur. Le comportement de Erg sur le promoteur de la collagénase-1 ressemble à celui de Elk (un membre distant de la famille Ets) sur le promoteur de *c-fos*. Elk ne lie pas seul le site EBS adjacent au site SRE mais est recruté par le facteur SRF lié au SRE.

Inversement, Erg lie le promoteur de la stromélysine-1 en test de retard sur gel, mais ne l'induit pas en test de transactivation en cellules HepG2. Une interprétation simple serait de considérer que Erg occupe compétitivement un site ciblé par un facteur activateur. La séquence des sites EBS diffère entre les promoteurs de la stromélysine-1 et de la collagénase-1. Le

tandem EBS inversé de la stromélysine-1 (-216, -208) est la cible de l'induction par Ets2 (Butticè et Kurkinen, 1993) et pourrait fixer 2 molécules Erg formant un complexe inactif. Erg pourrait aussi lier le tandem EBS en formant un hétérodimère inactif avec Ets2. Cette hypothèse permettrait également d'expliquer comment Erg supprime l'activité transcriptionnelle induite par Ets2. Elle suppose une interaction protéique avec Ets2. Nous avons effectivement observé que Erg interagit physiquement avec différents domaines de Ets2 (§ 4.2). La spécificité de la régulation transcriptionnelle semble dépendre à la fois de la séquence des sites régulateurs dans les promoteurs et de la possibilité d'interactions protéiques entre facteurs de transcription.

De plus, la distance entre les sites fonctionnels EBS et AP-1 diffère entre les promoteurs de la collagénase-1 et de la stromélysine-1 (9 et 130 pb respectivement). L'intervalle de 130 pb présente des sites qui pourraient lier le facteur NIP, le facteur NF-IL6 de la famille C/EBP (« facteur nucléaire pour l'expression de l'IL-6 »), ou des facteurs à domaine HMG (« groupe à mobilité élevée ») qui agissent sur l'architecture du promoteur. NF-IL6 est un facteur à domaine bZip qui forme des hétérodimères avec c-Fos et c-Jun (Hsu, et al., 1994). HMG induit une courbure aiguë de l'ADN (Landsman et Bustin, 1993, Pil, et al., 1993). Ces observations dans le promoteur de la stromélysine-1 peuvent être comparées à l'exemple d'une coopération entre sites distants dépendante d'un facteur courbant l'ADN. Le gène du récepteur TCR $\alpha$  est induit coopérativement par les facteurs Ets1 et PEBP2 $\alpha$  qui lient des sites adjacents. Plus précisément, Ets1 est recruté par PEBP2 $\alpha$  pour former un complexe ternaire instable. Sa stabilisation dépend de la phase angulaire d'un site ATF/CREB situé à l'autre extrémité de l'élément activateur et nécessite le facteur LEF-1 (« facteur activateur lymphoïde ») qui courbe l'élément activateur en son centre (Giese, et al., 1995). Il est possible que des facteurs liant le promoteur de la stromélysine-1 entre les sites EBS et AP-1 contribuent au rapprochement physique des facteurs liant ces sites et à une régulation transcriptionnelle différente de celle observée avec la collagénase-1.

La capacité de Erg à réguler différemment les promoteurs de la collagénase-1 et de la stromélysine-1 est significative. Malgré des similarités dans leurs promoteurs, les MMPs sont souvent exprimées à des localisations différentes *in vivo*. Elles présentent également des spécificités de substrat différentes. En particulier, la stromélysine-1 présente le plus large éventail de substrats et peut activer la collagénase-1 (Murphy, et al., 1987) et la gélatinase B (Shapiro, et al., 1995). La stromélysine-1 serait donc un facteur majeur contrôlant directement et indirectement la dégradation de la MEC et le remodelage des tissus. Erg est exprimé dans le développement au début de la formation des os (Dhordain, et al., 1995). Il serait important d'étudier *in vivo* la régulation de la collagénase-1 et de la stromélysine-1 par Erg dans le développement et dans la progression tumorale.

## 4.2. Publication 2.

### 4.2.1. Résumé.

Titre en français : les facteurs de transcription Ets interagissent entre eux et avec le complexe c-Fos / c-Jun *via* des domaines protéiques distincts, d'une manière dépendante ou indépendante de l'ADN.

Dans cette publication, nous étudions au niveau moléculaire l'interaction entre les facteurs Ets2 et Erg (p55) qui régulent différemment les promoteurs de la collagénase-1 et de la stromélysine-1. Des tests d'interaction protéique *in vitro*, (corétention protéique) montrent que Ets2 lie faiblement des protéines Ets1, c-Fos et c-Jun synthétisées *in vitro*, mais qu'il lie fortement Erg et le dimère c-Fos / c-Jun. Ces interactions *in vitro* sont augmentées en présence de fragments d'ADN spécifiques et sont inhibées par le bromure d'éthidium. Elles font intervenir des domaines protéiques différents de Ets2. A la fois la région N-terminale transactivatrice et la région C-terminale de liaison à l'ADN de Ets2 interagissent avec Erg. L'interaction entre Erg et la région N-terminale de Ets2 ne dépend pas de l'ADN. L'interaction de Ets2 avec c-Fos / c-Jun a lieu *via* sa région C-terminale de liaison à l'ADN. Cette interaction est supprimée par le bromure d'éthidium, ce qui indique qu'elle dépend de l'ADN. Elle est augmentée par un fragment spécifique du promoteur de la stromélysine-1 (-275/-15) présentant un tandem inversé de sites EBS (-216, -208), mais elle ne dépend pas de la présence du site AP-1 (-70). En utilisant le système du double hybride en levure, nous avons également montré que Ets2 interagit avec Erg et c-Jun *in vivo*.

# **The Ets transcription factors interact with each other and with the c-Fos/c-Jun complex *via* distinct protein domains in a DNA-dependent and -independent manner.**

Jean Philippe Basuyaux, Elisabeth Ferreira, Dominique Stéhelin and Giovanna Butticè.

## **Abstract**

The transcription factors Fos, Jun and Ets regulate the expression of human stromelysin-1 and collagenase-1 genes. Recently, we found that Erg, an Ets-family member, activates collagenase-1 gene but not stromelysin-1 by physically interacting with c-Fos / c-Jun. Interestingly, Erg binds to stromelysin-1 promoter and represses its activation by Ets2. Here, to investigate the molecular mechanism of this regulation, we have used an *in vitro* protein-protein interaction assay and studied the transcription factor interactions of Ets2. We found that Ets2 could weakly associate with *in vitro* synthesized Ets1, c-Fos, c-Jun and strongly with c-Fos / c-Jun complex and Erg *via* several distinct Ets2 domains including the C-terminal region which contains the DNA-binding domain (DBD). Strikingly, these interactions were stabilized *in vitro* by DNA as they were inhibited by ethidium bromide (Et.Br.). Both the N-terminal region, comprising the transactivation (TA) domain, and the C-terminal region of Ets2 associated with Erg, and the interaction of Erg through the TA domain of Ets2 was DNA-independent. The DNA-dependent interaction of Ets2 with c-Fos / c-Jun was enhanced by specific DNA fragments requiring two Ets-binding sites (EBS) of the stromelysin-1 promoter. Using the two hybrid system, we also demonstrated that Ets2 interacts with c-Jun or Erg *in vivo*.

## **Introduction**

Transcription of genes is controlled positively or negatively by a variety of extracellular stimuli, yielding to a fine tuned regulation of gene expression. Gene transcription requires the assembly of RNA polymerase II with a multiprotein preinitiation complex at specific DNA sequences including the TATA promoter box. Interactions of general transcription factors with basal promoter elements are generally essential for basal transcription but cannot be sufficient to increase or decrease its rate. Activation and repression of gene transcription depend on the binding of several transcription factors to DNA-specific motifs that, when bound to their promoter elements, stimulate or inhibit

transcription through protein-protein interactions with the basal transcription machinery (for review see (Goodrich, et al., 1996)).

An extensive number of transcription activators and repressors that regulate cellular and viral genes have been characterized including the Fos, Jun and Ets families of transcription factors. Generally, transcription factors contain distinct domains with different functions. For instance, Fos and Jun contain a leucine-zipper domain that allows the formation of homo- and / or heterodimeric complexes and a basic region, *via* which the c-Fos / c-Jun heterodimer binds to the 5'-TGAGTCA-3' DNA sequence or AP-1 site (Gentz, et al., 1989). Similarly, the Ets-family of transcription factors are composed of two main domains, the transactivation domain and the DNA-binding domain *via* which they bind to the 5'-GGA(A / T)-3' core sequence (Janknecht et Nordheim, 1993, Wasylyk, et al., 1993, Crépieux, et al., 1994). The DNA-binding domain (DBD), also known as the ETS domain, is well conserved among the different members of the Ets-family. Thus, Ets1, Ets2, Erg and Fli-1 share 98% of homology in the ETS-domain but have divergent transactivation domains (TA) (Karim, et al., 1990, Laudet, et al., 1993). Additional domains other than DBD and TA have been identified for Ets1, Ets2 and Erg. These domains include regulatory regions that modulate positively or negatively the transactivation property of the Ets proteins and inhibitory domains (ID) that interfere with the binding of the Ets proteins to their DNA motifs (Wasylyk et Wasylyk, 1992, Siddique, et al., 1993, Petersen, et al., 1995). It has been suggested that accessory factors would relieve the inhibitory effect of DNA binding, by interacting with the ID domains (Lim, et al., 1992, Wasylyk et Wasylyk, 1992). However, supporting evidences for such interactions remain to be established.

The Fos, Jun and Ets transcription factors can regulate the same set of cellular genes that contain composite target motifs (Wu, et al., 1994, Grant, et al., 1995). The cellular genes controlled by Fos, Jun and Ets include the well studied stromelysin-1 and collagenase-1 genes that encode two matrix metalloproteinases implicated in normal growth and development, as well as in tumor invasion and metastasis. The functional DNA motifs *via* which Fos, Jun and Ets-transcription factors regulate basal and induced transcription activities, have been characterized (Angel, et al., 1987, Buttice, et al., 1991, Wasylyk, et al., 1991, Buttice et Kurkinen, 1993, Buttice, et al., 1996). While the AP-1 site is a well conserved sequence-motif in collagenase-1 and stromelysin-1 genes and binds the Fos and Jun heterodimer, the Ets-binding sites (EBS) differ by sequence and position between the two genes and they display different binding affinities for the Ets-transcription factors. Recently, we reported that the adjacent EBS and AP-1 motifs of collagenase-1 promoter are both necessary for collagenase-1 activation by Erg. We have shown that Erg, in defined conditions does not bind to the collagenase-1 EBS unless it is recruited, *via* physical interaction, by the c-Fos / c-Jun complex that binds to the adjacent AP-1 site. In contrast to the collagenase-1 promoter, Erg binds to the two linked EBS of the stromelysin-1 promoter, but does not activate this gene. In transiently transfected cells, Ets2 activates stromelysin-1 gene ; however, when Erg is

coexpressed with Ets2, Erg inhibits stromelysin-1 activation by Ets2, suggesting a possible mechanism of interaction between Ets2 and Erg.

In this report, we demonstrate that the Ets2 transcription factor physically interacts with the c-Fos / c-Jun heterodimer and with other Ets-family members. We found that different domains of Ets2 make contacts with the Fos / Jun complex and with other members of the Ets-family to form stable hetero-trimeric Ets2 / Fos / Jun (EFJ) and hetero-dimeric Ets2 / Erg ( $E_2Er$ ) and Ets2 / Ets1 ( $E_2E_1$ ) complexes. Also, we found that these complexes were stabilized by DNA and that stromelysin-1 promoter DNA specifically stabilized the EFJ-complex, dependent on the two linked EBS. We discuss the implications of these results for combinatorial gene regulation and for stromelysin-1 gene regulation by the Ets family of transcription factors.

## Materials and methods

### Recombinant DNA plasmids.

The recombinant GST-Ets2(1-469) plasmid containing the entire coding region of Ets2 was cloned as follows : an EcoR I fragment containing *ets2* cDNA was transferred from pSVKEts2 (Butticè et Kurkinen, 1993) to the EcoR I site of the pGEX1 $\lambda$ T. This construct (pGEX Ets2) was digested with BamH I and Sac I, which cut in the vector linker and in the coding region of Ets2 respectively. The digestion removed the 5' end untranslated region and part of the Ets2 cDNA. This was replaced by an EcoR I-Sac I Ets2 fragment after treatment of the EcoR I end with mung bean nuclease and ligation into the filled end of BamH I and Sac I. The EcoR I-Sac I fragment was obtained from a plasmid construct pSVKEts2(1-469) that contains an EcoR I site, introduced by PCR, 9 nucleotides upstream of the ATG.

The GST-Ets2(1-290) was derived from GST-Ets2(1-469) digested with Sac I and EcoR I (in the linker) to remove the 3' part of the *ets2* gene. The Sac I and EcoR I ends were treated with mung bean nuclease and the plasmid ligated back. The GST-Ets2(1-129) plasmid was constructed by cloning a BamH I-Bgl II fragment, encoding the N-terminal 129 amino acids of Ets2, from an intermediate plasmid pGADEts2(1-129) into the BamH I site of the pGEX1 $\lambda$ T vector. The intermediate plasmid pGADEts2(1-129) was generated by inserting a BamH I-Pst I fragment, from the GST-Ets2(1-469) into the BamH I and Pst I sites of the pGAD 424 vector (Clontech) which contained a Bgl II site downstream of the Pst I site.

The Ets2-DNA binding domain constructs were made by PCR amplification using the appropriate primers. The 5' primer was always designed in-frame with BamH I site. The amplified fragments were then cloned into the Sma I site of pUC18 (Sure Cut kit from Pharmacia) to create the intermediate constructs pUC18-Ets2(289-469), pUC18-Ets2(289-439), pUC18-Ets2(359-439), pUC18-Ets2(359-469), pUC18-Ets2(289-359), pUC18-Ets2(443-469). The orientation and frame of the fragments were verified by double strand sequences. The fragments were then released from the pUC18 vector by BamH I and

EcoR I digestion and cloned into the corresponding sites of the pGEX1 $\lambda$ T vector to generate the following GST-Ets2 binding domain fusion proteins: GST-Ets2(289-469), GST-Ets2(289-439), GST-Ets2(359-439), GST-Ets2(359-469), GST-Ets2(289-359), GST-Ets2(443-469).

To construct the plasmids for the yeast two hybrid assay, plasmid vectors expressing Gal-4 binding (B) domain (pGBT9) and activation (A) domain (pGAD424) were purchased from Clontech. To generate the B-Ets2(289-469) plasmid the Ets2-DBD fragment (residues 289-469) was made by PCR amplification and cloned into the Sma I site of pGBT9 vector. The A-Erg construct was made by cloning the human Erg cDNA (residues 1-334) (Duterque-Coquillaud, et al., 1993) into the Sma I site of pGAD424. The cloning of A-Jun was done in two steps. First, an EcoR I-Sma I fragment of c-Jun (residues 1-179) was amplified by PCR and cloned into the corresponding sites of pUC18 vector. A Sma I-Pst I fragment (residues 179-334) was released from mouse pSVc-Jun (Lamph, et al., 1988), purified by low melting point agarose gel and cloned into the previous construct to generate pUC-Jun(1-334). This fragment was then released by digestion with EcoR I and Pst I and cloned into the corresponding sites of pGAD424 vector.

### **Expression and Purification of Glutathione-S-transferase-Ets2 Fusion Proteins**

Glutathione-S-transferase fusion protein expression and purification were essentially as described by Smith and Johnson, 1988 (Smith et Johnson, 1988). *E. coli* (DH5 $\alpha$ ) were transformed with the full-length GST-Ets2(1-469) or one of the recombinant plasmids described above. Fresh overnight cultures were diluted 1:20 in Luria-Bertani medium (LB) containing ampicillin (100  $\mu$ g / ml) and incubated for about 4 h at 30 °C with shaking. When the culture density reached OD<sub>600</sub> = 0.6, isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) was added to a final concentration of 0.1 mM and induced for additional 4 h, at 30°C.

To assay the level of expression of the fusion protein, aliquots of each bacterial cultures were pelleted in a microcentrifuge, boiled in SDS buffer (Tris-HCl 250 mM pH=7.9, 1%  $\beta$ -mercaptoethanol, 2% SDS) and loaded into an SDS-polyacrylamide gel. Proteins were visualized by Coomassie blue staining. For fusion protein recovery, bacterial culture were pelleted in microcentrifuge and resuspended in 1 / 20 vol of PBS [140 mM NaCl ; 2.7 mM KCl ; 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ; 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.3)]. Aliquots of 500  $\mu$ l of bacteria were then lysed on ice by mild sonication (10 sec) and centrifuged at 12000 rpm for 20 min. at 4°C. Bacterial supernatant was applied to an affinity column Glutathione Sepharose 4B (RediPack purification module, Pharmacia) and the fusion proteins were eluted by the addition of 1 ml of Elution Buffer (20 mM reduced Glutathione (Sigma), Tris 50 mM pH 8). Eluted proteins were dialyzed against incubation buffer at 4°C overnight. Proteases inhibitors (Complete, Boehringer Mannheim) and 25% glycerol were added before storage at -20°C. Purified proteins were resolved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS Page) and were estimated to be 50% pure by Coomassie blue staining. Protein yields were measured by

colorimetric reaction and approximated by comparison against known protein standards (BSA).

### ***In vitro* synthesis of oncoproteins**

Rat cDNAs for c-Fos and c-Jun (Rauscher, et al., 1988) were kindly provided by Tom Curran. The constructs pSVK3-Ets2, and pSG5-Erg containing the human *ets2* and *erg* (isoform p55) cDNAs were previously described (Butticè et Kurkinen, 1993, Duterque-Coquillaud, et al., 1993). The transcription and translation of the cDNAs were simultaneously performed in the TNT coupled reticulocyte lysate system and [<sup>35</sup>S]-methionine, according to the instructions of the manufacturer (Promega). The translation products were visualized in SDS-minigel and quantified by the PhosphorImager (Molecular Dynamics).

### **Interaction binding assay**

A 50 µl volume of a 50 % slurry Glutathione Sepharose 4B beads (Pharmacia) was incubated with 62 pmol GST or GST-Ets2 fusion protein (5 µg) for 20 min in the incubation buffer (12 mM Hepes pH 7.9 ; 4 mM TrisHCl pH 7.9 ; 50 mM NaCl ; 10 mM KCl ; 1 mM EDTA). The beads were washed three times with 0.2 ml of incubation buffer and centrifuged for 1 min at 500 x g. The GST or GST-Ets2 fusion proteins bound to the beads were then incubated with the indicated quantity of [<sup>35</sup>S]-methionine-labeled *in vitro* translated protein, in a total volume of 25 µl of incubation buffer for 30 min at room temperature. The beads were then washed five times with 0.2 ml of NETN (0.5 % NP-40 ; 1 mM EDTA ; 20 mM Tris HCl pH 8 ; 100 mM NaCl) and incubated for 10 min at room temperature in 25 µl of elution buffer (50 mM Tris HCl pH 8 ; 15 mM reduced glutathione). The eluted labelled protein(s) were resolved by SDS polyacrylamide gel electrophoresis. The gel was treated with Amplify (Amersham), dried and subjected to autoradiography. The signals were quantified with the PhosphorImager.

### **Stromelysin promoter fragments**

Restriction fragments from stromelysin1 promoter (-1303 to +4) (Quinones, et al., 1989, Butticè, et al., 1991 ) were isolated by agarose gel electrophoresis. The stromelysin wild-type fragment (-274 to -11, EcoR I-Ava I) (see Fig.5C, fragment 5) carries two EBS motifs, with the GGAA (-214) and TTCC (-206) containing sequences, and an AP-1 site TGAGTCA (-70). The fragments containing mutant EBS or AP-1 sites have been previously described (Butticè, et al., 1991, Butticè et Kurkinen, 1993). Briefly, to create the promoter mutants in the EBS and AP-1 sites, the GGAA sequence was mutated to AAAA (G>A) (fragment 8) and the TTCC to TTTT (C>T) (fragment 9), while the AP-1 sequence TGAGTCA was mutated either to GGAGTCA (M1) (fragment 6) or TGAGTAA (M6) (fragment 7). Two stromelysin promoter fragments (-755 to -479, Kpn I-Xba I and -478 to -275, Xba I-EcoR I) (fragments 3 and 4) were used as unrelated fragments in pull down assay.

These fragments contain no functional EBS or AP-1 sites as shown by transfection assay (Butticè et Kurkinen, 1993).

### **In vivo interaction analysis using the yeast two hybrid system.**

Growth and maintenance of yeast strains and two-hybrid assays (Fields et Song, 1989) were essentially performed using standard protocols from Clontech. The *S. cerevisiae* yeast strain SFY526 was transfected with plasmid expressing the Gal-4 binding domain fused to the DBD of Ets2 and plasmid expressing the Gal-4 activation domain fused to the Erg or Jun coding region. Transformants were plated on a synthetic medium lacking leucine and tryptophan. The plates were incubated at 30°C for three days. To monitor the interactions, the  $\beta$ -galactosidase activity was estimated by colony lift assay and measured quantitatively from liquid culture. Several independent transformants were isolated and grown in liquid culture at 30°C until OD600 reached 0.8-1.0.  $\beta$ -galactosidase activity was measured as described previously (Kuras et Thomas, 1995).

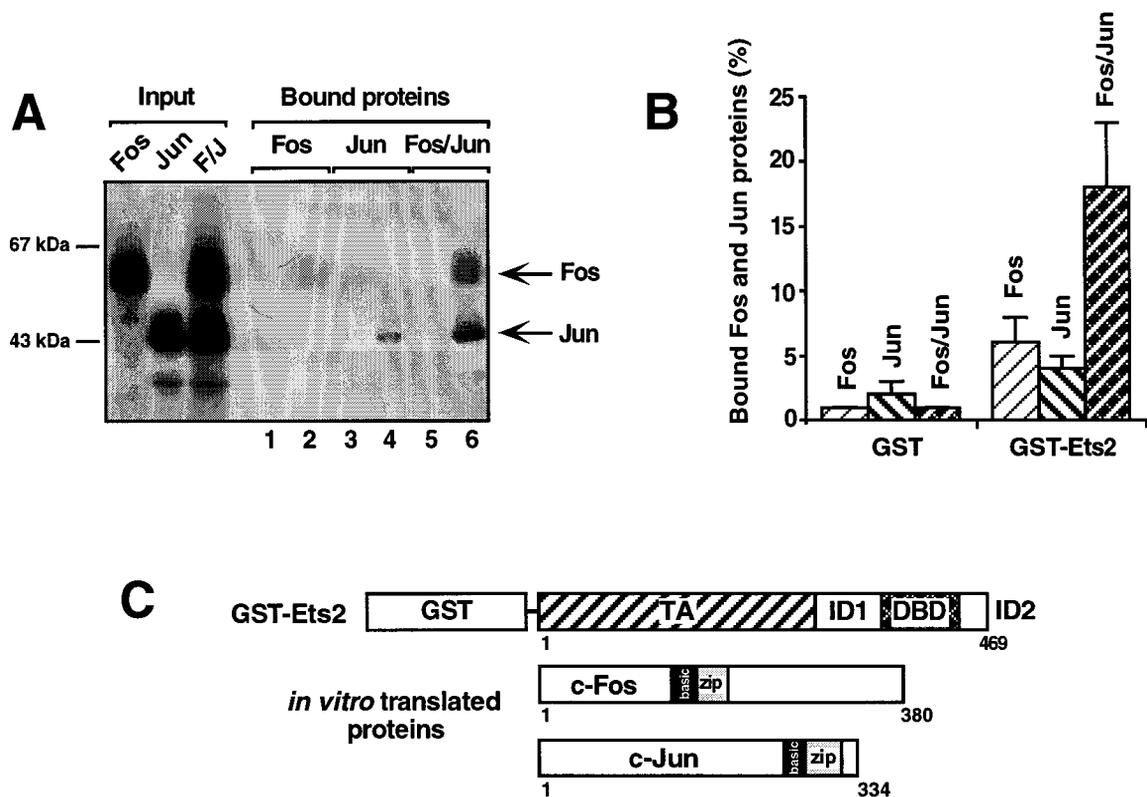
## **Results**

### **Ets2 interacts with the Fos / Jun heterodimer *in vitro*.**

We and others have shown that the Ets2 transcription factor activates genes which contain EBS adjacent to AP-1 sites such that of collagenase-1 and stromelysin-1. To study the molecular mechanism(s) of this regulation we first investigated possible protein-protein interactions of Ets2 and Fos / Jun using the GST-pull-down system. The *E. coli* expressed GST-Ets2 fusion protein was first immobilized on glutathione-sepharose beads and incubated with *in vitro* translated [<sup>35</sup>S]-labeled c-Fos, c-Jun, and c-Fos / c-Jun (Fig.1C). The non-specifically bound proteins were removed by extensive washing and the bound proteins were eluted, subjected to SDS-PAGE and detected by autoradiography. As shown in Fig.1A, Fos or Jun proteins were specifically retained by the GST-Ets2 fusion protein (lanes 2 and 4), but not by the beads carrying only GST (lanes 1, 3 and 5). Interaction of Jun with Ets2 was also detected *in vivo*, using the yeast two hybrid system (Fig.3). These results suggest that Fos or Jun alone specifically associates, although weakly, with Ets2. By contrast, the Fos / Jun heterodimer bound strongly to the GST-Ets2 fusion protein (Fig.1A, lane 6). The amount of Fos / Jun heterodimer retained by the GST-Ets2, quantitated by PhosphorImager analysis, was four times more than the amount of Fos or Jun alone (Fig.1, panel B).

### **Ets2 physically interacts with other Ets-family members.**

Recently, we found that, in transiently transfected cells, the Ets-family members and their combinations differentially regulate the human stromelysin-1 and collagenase-1 promoter activity in an antagonistic or synergistic fashion. For instance, Erg, when coexpressed with Ets2, strongly inhibits stromelysin-1 promoter activation by Ets2 (Butticè,



**Figure 1. Ets2 interacts with the c-Fos/c-Jun complex.**

A) The figure shows an *in vitro* protein-protein interaction assay (pull-down) for the GST-Ets2 fusion protein. GST-Ets2 (residues 1-469) or GST alone (62 pmol) was immobilized on glutathione sepharose beads and incubated with 0.03 pmol of [<sup>35</sup>S]-labeled *in vitro* synthesized c-Fos, c-Jun or c-Fos/c-Jun. The input lanes show the *in vitro* synthesized products before incubation with the beads. After washing, the bound proteins were analyzed by SDS-PAGE, visualized by autoradiography (3h exposure) and the amount of bound proteins was quantitated by PhosphorImager analysis. Molecular size markers are shown in kilodaltons.

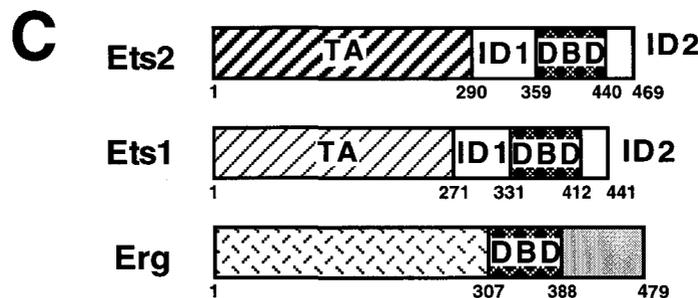
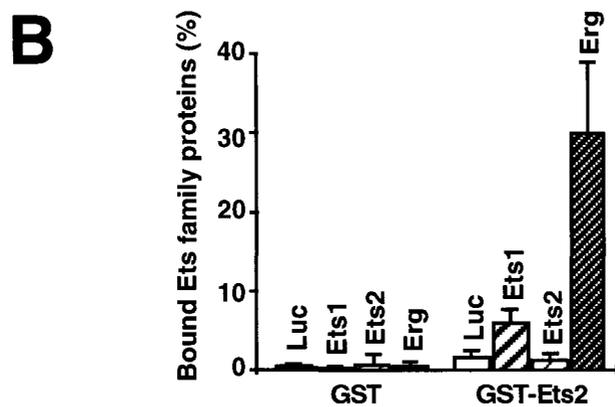
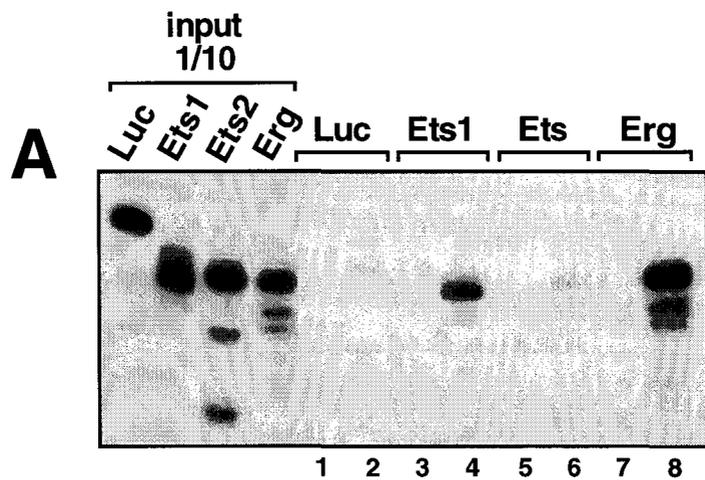
B) The graph shows the amount of c-Fos, c-Jun or c-Fos/c-Jun bound to GST or GST-Ets2 expressed as percentage of the total input. The bars indicate the standard error from three independent experiments.

C) Schematic representation of the GST-Ets2 fusion protein and c-Fos and c-Jun. Depicted are the transactivation domain (TA), inhibitory domains-1 and -2 (ID1 and ID2) and the DNA-binding domain (DBD) of Ets2. The leucine-zipper and basic domain of c-Fos and c-Jun are also indicated.

et al., 1996). Therefore we investigate the role of protein interactions of Ets2 and Erg as possible mechanism of the antagonistic effect on stromelysin-1 promoter. The immobilized GST-Ets2 fusion protein or the GST control was incubated with [<sup>35</sup>S]-labeled Erg, Ets1, Ets2, or an unrelated protein, luciferase as a negative control. Among the Ets-family members tested (Fig.2C), Erg and Ets1, but not Ets2, specifically interact with GST-Ets2 (Fig.2A, B). Erg interacts strongly, by reaching 29.8% (Fig.2B) of the total input, whereas the percentage of Ets1 bound proteins was only 5.9% in the experimental conditions used. We also note that a weak but reproducible *in vivo* interaction between Ets2 and Erg was detected using the yeast two hybrid system (Fig.3). These data suggest that Ets2 physically associates with other members of the Ets-family to form Ets-heterodimers. The data also suggest that Ets2 does not associate with itself as homodimer. This result is consistent with previous reports showing that Ets2 binds to Ets-binding sites (EBS) as a monomer (Lim, et al., 1992) (and our unpublished data).

#### **Different Ets2 domains are involved in the interaction with c-Fos / c-Jun, Erg and Ets1.**

The Ets2 transcription factor has been shown to contain two main domains : the transcription activation (TA) domain and the DNA-binding domain (DBD) which is flanked by two smaller domains called inhibitory domains (ID1 and ID2). To identify the Ets2 domains necessary for interaction with the Fos / Jun complex, Erg and Ets1, a series of N- and C-terminal Ets2 deletions were constructed as GST-fusion proteins (Fig.4). The Fos, Jun, Erg or Ets1 proteins were synthesized and radiolabeled *in vitro* in reticulocyte lysate, and incubated with glutathione-sepharose beads carrying the various GST-Ets2 fusions. Figure 4 shows that the full length GST-Ets2(1-469), but neither the N-terminal GST-Ets2(1-129) nor the GST-Ets2(1-290) containing the transactivation domain, can bind the Fos / Jun complex (Fig.4 panel D, lane 10, 2, 3). This result indicates that the Ets2 domain involved in the interaction with Fos / Jun complex lies within residues 290 and 469 that contains the DBD and two inhibitory domains (ID1 and ID2). In support of this, binding assay using the fusion protein GST-Ets2(289-469) shows that the Fos / Jun complex associates strongly with this domain (Fig.4 panel D, lane 9). Further mapping of this region indicates that the DBD [GST-Ets2(359-439)] or the ID1 [GST-Ets2(289-358)] and the ID2 [GST-Ets2(440-469)] are independently unable to bind to the Fos / Jun complex (lane 4, 6, 8). The fusion protein GST-Ets2(289-439) that contains the ID1 and the DBD was also unable to bind Fos / Jun while the GST-Ets2(359-469) containing the DBD and ID2 associates much stronger. These differences in binding were not due to a variation in the amount of GST-fusion proteins since the quantity and integrity of all fusion proteins were found to be similar by Coomassie staining (data not shown). Therefore, these results suggest that ID2, which contains the C-terminal 29 residues of Ets2, enhances the interaction of the DBD with Fos / Jun. However, both ID1 and ID2 were required for better contacts of DBD with Fos / Jun. Similarly, the

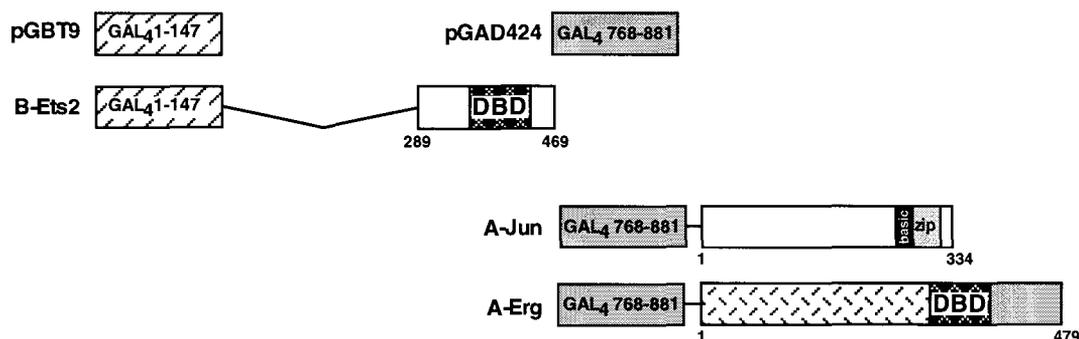
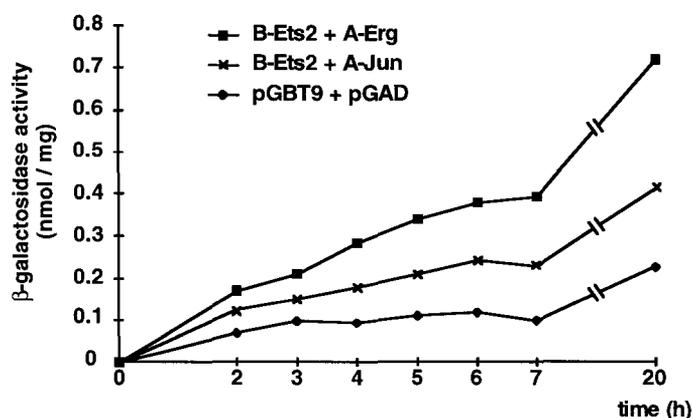


**Figure 2. Ets2 interacts with other Ets-family members.**

A) *In vitro* synthesized [<sup>35</sup>S]-labeled Ets1, Ets2, Erg or luciferase (as a negative control) were incubated with 62 pmol of *E. coli*-produced GST-Ets2 fusion protein (lanes 2, 4, 6, 8) or GST protein alone (lanes 1, 3, 5, 7) immobilized on glutathione sepharose beads. Bound proteins were analyzed in SDS-PAGE, visualized by autoradiography and quantitated by PhosphorImager analysis.

B) The graph shows the amount of luciferase (Luc), Ets1, Ets2, or Erg bound to GST or GST-Ets2 expressed as percentage of the total input. The bars indicate the standard error from five independent experiments.

C) Schematic diagram of the Ets-family members used in *in vitro* synthesis reactions.

**A****B**

**Figure 3. In vivo interaction of Ets2 with Erg and c-Jun.**

A) Schematic representation of the Gal4-Ets2, Erg and Jun fusion proteins used for the two-hybrid assay.

B)  $\beta$ -Galactosidase activity from the lacZ reporter construct. Several independent transformant harboring the plasmids indicated at the top of the figure were isolated, grown in liquid culture and their  $\beta$ -galactosidase activity was measured at different times. The  $\beta$ -galactosidase activity was normalized to the total amount of protein present in the cell extract and to the OD600 of the starting cell suspensions. Activity is given in nmol/mg of protein in the yeast cell extract. Note that additional controls such as pGBT9 + A-Erg, pGBT9 + A-Jun and B-Ets2 + pGAD were also used in the experiment (data not shown). The  $\beta$ -galactosidase activity resulted similar to that of the negative control pGBT9 + pGAD.

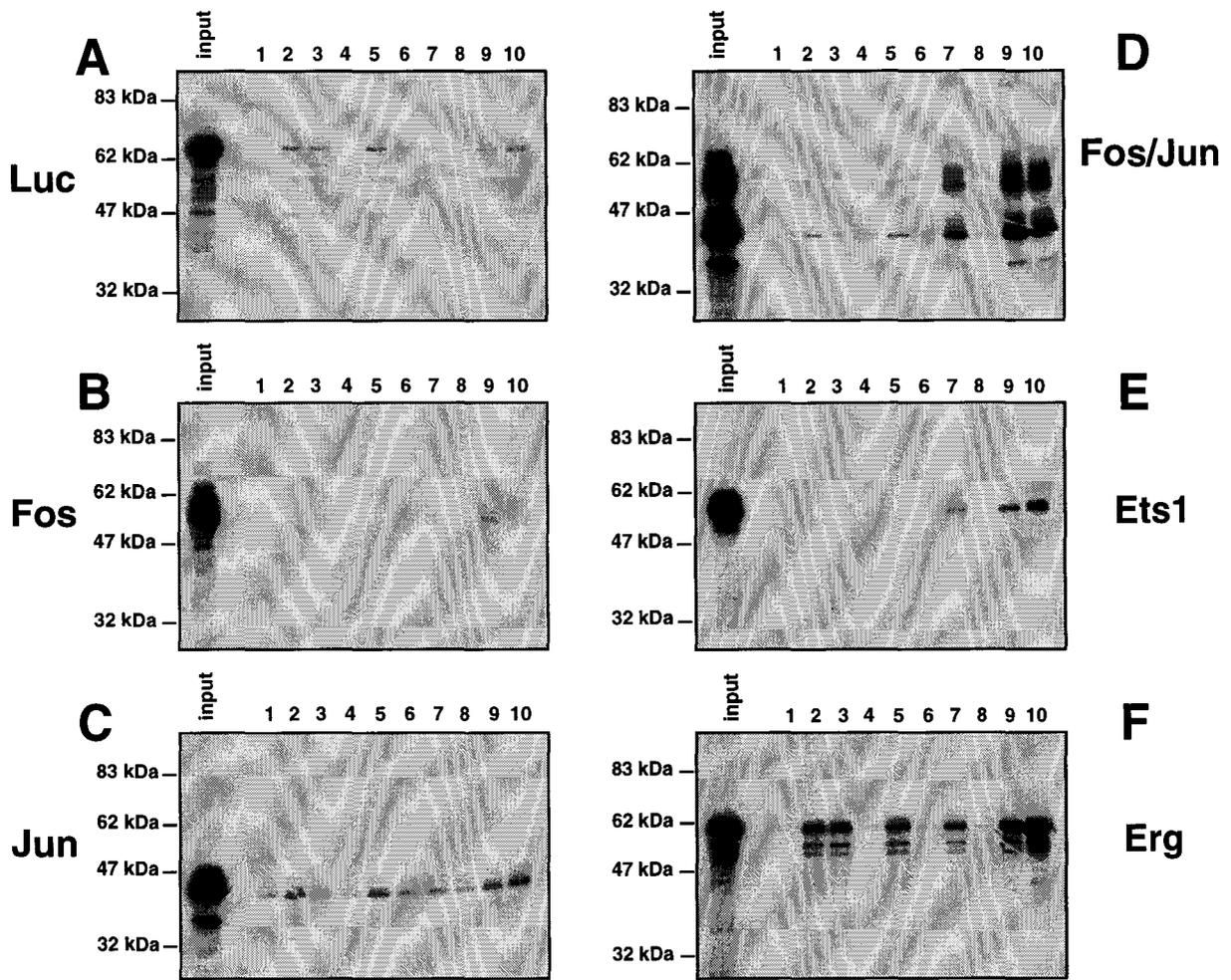
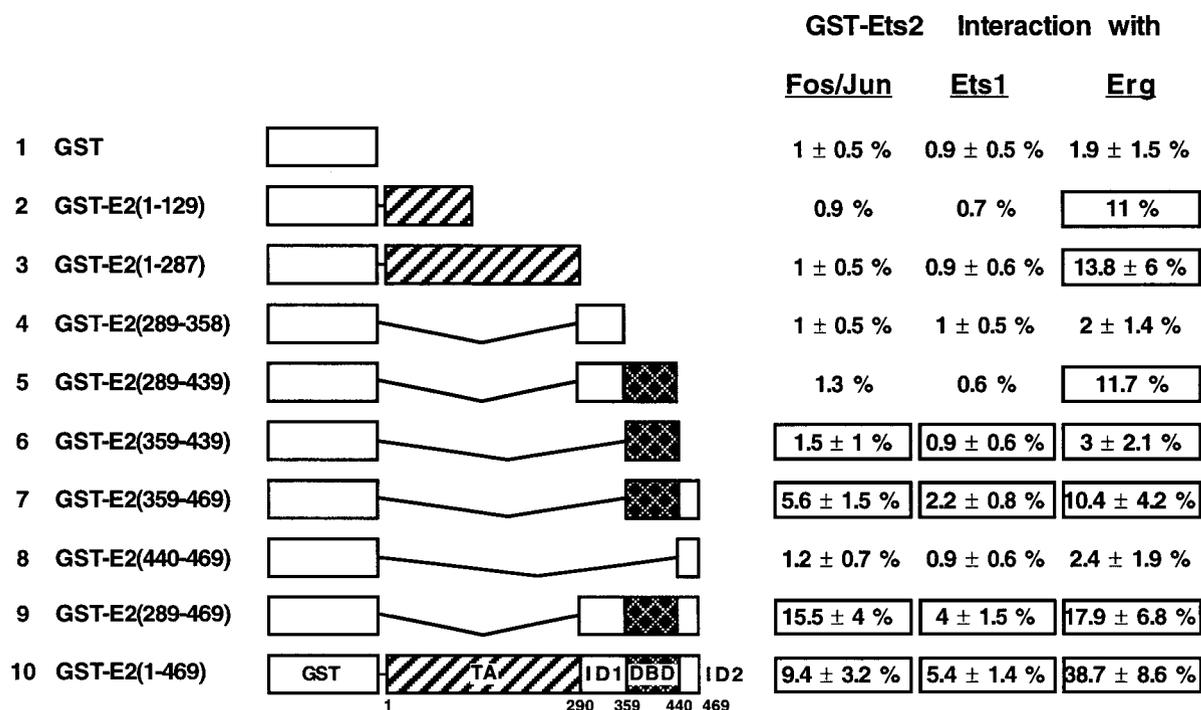


Figure 4. (first part)



**Figure 4. Distinct domains of Ets2 interact with c-Fos/c-Jun, Ets1 and Erg.**

Equal amounts (62 pmol) of *E.coli*-produced GST (lane 1) or GST-Ets2 deletion mutants (lanes 2 - 10) were immobilized on glutathione sepharose beads and incubated with [<sup>35</sup>S]-labeled *in vitro* synthesized luciferase, c-Fos, c-Jun, c-Fos/c-Jun, Ets1 or Erg. Bound proteins were analyzed in SDS-PAGE, visualized by autoradiography and quantitated by PhosphorImager analysis.

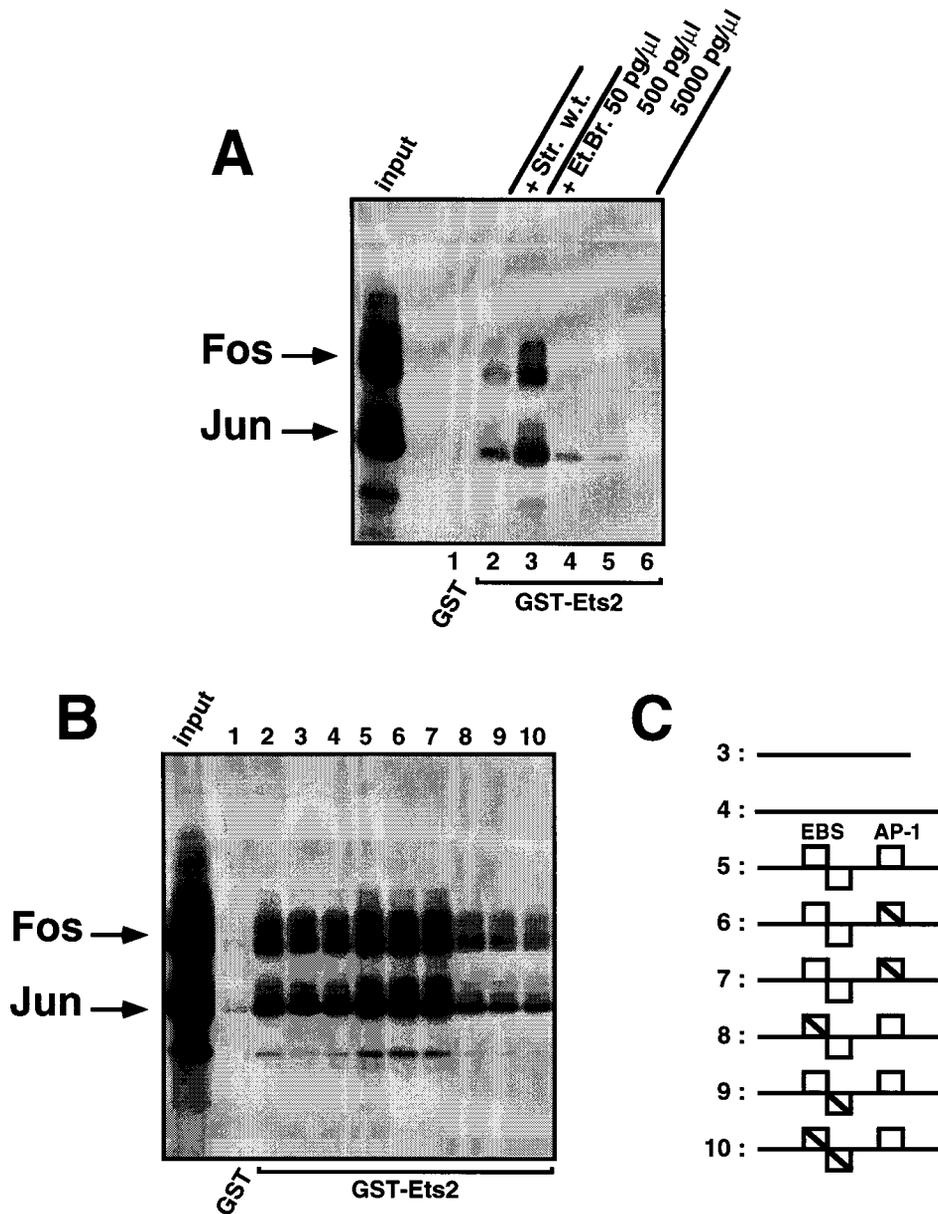
A schematic diagram illustrates the different GST-Ets2 deletion mutants and the lanes 1 - 10 (in A - F) correspond to the proteins used in the protein-protein interaction assay.

The amount of bound c-Fos/c-Jun is compared with that of Ets1 and Erg, expressed as percentage of the total input with the variation (+/-) of binding between three experiments. Boxed are the most significant interactions in comparison to the weak interaction of the Ets2-DBD [GST-Ets2(359-439)]. Note that c-Fos or c-Jun alone bound weakly to the GST-Ets2 deletion mutants. The amino acids residues of the deletions are indicated and the different domains are: TA =transactivation domain; ID1 = inhibitory domain-1; DBD = DNA-binding (ETS) domain; ID2 = inhibitory domain-2.

weak binding of Fos to Ets2 requires the C-terminal part of Ets2 that includes the DBD with the two inhibitory domains. In contrast, the weak binding of Jun to Ets2 appears to require all Ets2 domains. However, at the conditions employed here, the interactions are very weak compared to that observed with the Fos / Jun heterodimer (compare panels B, C, D). Of interest is that, among the Ets-family members, Ets1 gives similar results than that obtained with Fos / Jun by binding only with the C-terminal domain of Ets2 (panel E lane 10, 9, 7). Exceptionally, Erg interacts with additional Ets2 domains. For instance, Erg binds equally well to most of the Ets2 domains (panel F lane 2, 3, 5, 7, 9, 10) including the transactivation domain (TA) (panel F lane 2, 3). As for Fos / Jun, Erg does not associate with ID1, DBD or ID2 alone (lane 4, 6, 8). Erg, however, interacts strongly with the C-terminal regions containing the DBD and one of the inhibitory domains ID1 or ID2 (panel F, lanes 5, 7).

### **Protein-protein interactions of the DNA binding domain of Ets2 with Fos / Jun is enhanced by stromelysin-1 promoter DNA.**

Previously, we have shown that Fos / Jun and Ets2 transcription factors bind to the AP-1 and EBS motifs of the human stromelysin-1 and collagenase1 promoters and activated these genes (Butticè et Kurkinen, 1993). Here, we have demonstrated that Ets2 associates *in vitro* with the Fos / Jun complex and that this interaction involves the C-terminal part of Ets2. To establish the importance of the stromelysin-1 promoter in the interaction of the trimeric complex Ets2 / Fos / Jun we performed an interaction assay between GST-Ets2 and Fos / Jun in the presence of stromelysin-1 promoter fragments. For these experiments, we used promoter fragments containing native or mutated EBS and AP-1 sites (Fig.5C). Promoter fragments were simultaneously incubated with the Fos / Jun complex and immobilized GST-Ets2(1-469). The amount of bound Fos/ Jun proteins were then compared in the absence or presence of different DNA promoter fragments. PhosphorImager analysis of three independent experiments indicated that the stromelysin-1 promoter fragment (-274 to -11) containing two tail-to-tail EBS and one AP-1 site augmented twofold the amount of Fos / Jun proteins bound to Ets2 (Fig.5B, compare lane 2 and 5). This effect was specific since two unrelated stromelysin-1 promoter fragments did not increase nor diminish the amount of Fos / Jun bound to GST-Ets2 (Fig.5B, compare lane 2, 3, 4). Interestingly, mutation of the AP-1 site did not significantly affect the amount of Fos / Jun bound to the GST-Ets2 (Fig.5B, lane 6 and 7). However, mutation of the upstream or downstream or both EBS, significantly decreased the amount of Fos / Jun bound to GST-Ets2 (Fig.5B, lanes 8, 9, 10). This suggest that the binding of Ets2 to the EBS of the stromelysin-1 promoter is necessary for the formation of the trimeric complex Ets2 / Fos / Jun. However, the Ets2 / Fos / Jun interaction is not a result of simultaneous binding to the EBS and AP-1 motifs of the same DNA molecule. If this would be the case, addition of DNA fragments with mutated AP-1 site, that do not bind Fos / Jun (Butticè, et al., 1991), should result in a decrease of Fos / Jun protein recovered. Conversely, we found an increase of twofold in the amount of Fos / Jun protein



**Figure 5. Ets2 and c-Fos/c-Jun interaction is enhanced by specific stromelysin-1 promoter fragments.**

A) GST or GST-Ets2 were first immobilized on glutathione sepharose beads and incubated for 30 min with c-Fos/c-Jun and without (lanes 1 - 2) or with stromelysin-1 promoter DNA (-274 to -11, as fragment 5 in C) (lane 3) and increasing amounts of Et.Br. (lanes 4 - 6).

B) Stromelysin-1 promoter DNA (250 ng; 1.5 pmol) was simultaneously incubated with 0.03 pmol of c-Fos/c-Jun and 62 pmol of immobilized GST-Ets2(1-469) and the amount of bound c-Fos/c-Jun was analyzed by SDS-PAGE. Lanes 1 and 2 show c-Fos/c-Jun binding to GST and GST-Ets2 in the absence of stromelysin-1 promoter DNA. Lanes 3 - 10 show Fos/Jun interaction to the GST-Ets2 in the presence of non specific DNA fragments (-755 to -478 and -479 to -275 from the stromelysin promoter) (lanes 3 and 4), wild-type (-274 to -11) (lane 5), or mutant stromelysin-1 promoter DNA (-274 to -11) lacking functionally active EBS or AP1-sites (lanes 6 - 10).

C) Illustration of the stromelysin-1 promoter fragments and the mutant forms used in the experiment as described in Materials and Methods. EBS indicates the two tail-to-tail motifs for Ets-binding and AP1 is the binding site for c-Fos/c-Jun. Note that fragments 3 and 4 contain no functional EBS or AP-1 sites (Butticè, et al., 1993).

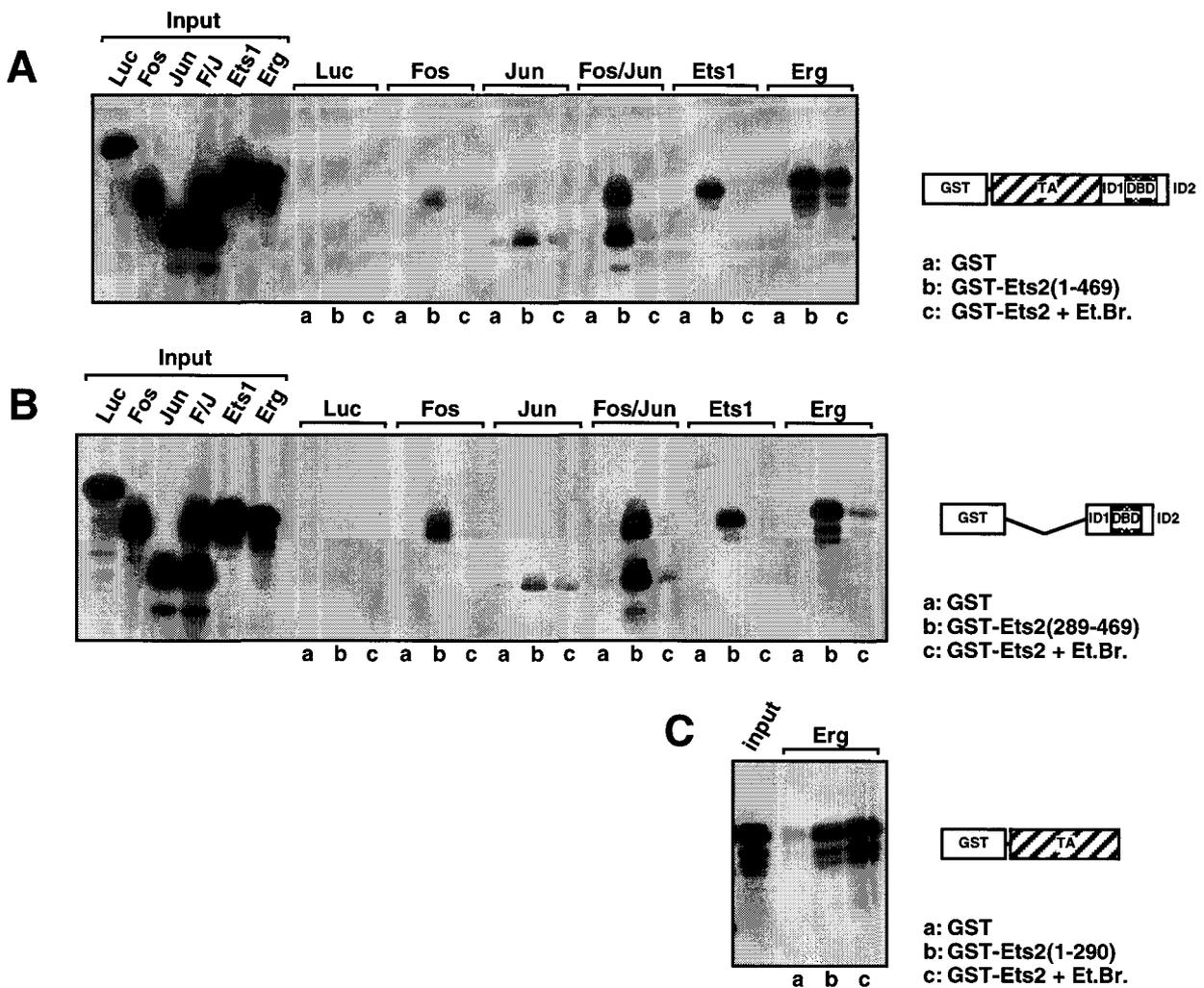
recovered equal to that observed with the wild type fragment (compare lanes 5, 6, 7). Control experiments were also performed with the addition in the reaction of different concentrations of ethidium bromide (Et.Br.) (Fig.5A) which has been shown to disrupt DNA-mediated protein-protein interactions (Lai et Herr, 1992). Of interest is that the direct interaction between GST-Ets2 and Fos / Jun was inhibited by the addition of Et.Br. (Fig.5A, lane 2, 4, 5, 6) and enhanced by addition of stromelysin promoter fragments (Fig.5A, lane 3). Taken together these data suggest that stromelysin-1 promoter DNA can enhance the Ets2 / Fos / Jun interaction, perhaps by stabilizing protein contacts, and that this depends on the integrity of the EBS of the stromelysin-1 promoter. However, this DNA-dependent interaction does not require intact AP-1 site.

### **Protein- interactions of the transactivation domain of Ets2 are not influenced by the presence of DNA.**

As shown here, while Ets1 and the Fos / Jun complex bind only to the C-terminal part of Ets2, Erg also interacts with the N-terminal part that includes the transactivation domain of Ets2. To determine whether this type of interaction is DNA-dependent we tested the effect of Et.Br. in the reaction. As expected, in the absence of Et.Br., Fos / Jun, Ets1 and Erg bound to the entire Ets2 protein as well to the C-terminal part that includes the DBD and the two IDs (Fig.6A-b and 6B-b). In the presence of Et.Br., the recovery of bound Fos / Jun and Ets1 proteins to the full-length GST-Ets2(1-469) and to the C-terminal part, GST-Ets2(290-469), was dramatically reduced (Fig.6A-c and 6B-c). In contrast, the recovery of Erg bound protein to the GST-Ets2(1-469) was only marginally affected by the presence of Et.Br. (Fig.6A-c and 6A-b). Similar to Fos / Jun and Ets1, the amount of Erg bound protein to the C-terminal part, GST-Ets2(290-469), strongly decreased in the presence of Et.Br. (Fig.6B-c). Interestingly, the percentage of Erg bound protein to the N-terminal part of Ets2 was not affected by the addition of Et.Br. (Fig.6C). These data suggest that while the C-terminal part of Ets2, that includes the DBD and the two IDs, is DNA- dependent in the interactions with other proteins, the transactivation domain physically associates with other proteins independently of DNA (Fig.7). Indeed, the amount of Erg bound protein to the transactivation domain of Ets2 [GST-Ets2(1-290)] was totally recovered in the presence of Et.Br. (Fig.6C) even at concentration of 50  $\mu\text{g} / \text{ml}$  (data not shown). Moreover, addition of exogenous DNA from stromelysin-1 and collagenase-1 promoters did not further increase the percentage of Erg bound protein to the TA of Ets2 (data not shown). These data suggest that Erg physically interacts with the TA of Ets2 in a DNA-independent fashion (Fig.7).

## **Discussion**

Synergistic repression or activation of gene expression play an important role in gene regulation. Combinatorial protein-protein interactions between multifunctional modular



**Figure 6. DNA-dependent and -independent interactions of Ets2 with Erg via the DBD and TA domain.**

A and B) GST and GST-Ets2 fusion proteins of the full-length (1-469) or the C-terminal part (290-469) of Ets2 were immobilized to glutathione sepharose beads and incubated without or with 5  $\mu\text{g/ml}$  of Et.Br. *In vitro* synthesized  $[^{35}\text{S}]$ -labeled luciferase, c-Fos, c-Jun, c-Fos/c-Jun, Ets1 or Erg were added for additional 20 min. The beads were then washed four times in binding buffer containing Et.Br. (5  $\mu\text{g/ml}$ ). The bound proteins were analyzed by SDS-PAGE, visualized by autoradiography (15 h exposure for the bound samples and 6 h for the input) and quantitated by PhosphorImager analysis.

C) GST and GST-Ets2 fusion protein containing the N-terminal TA domain (1-290) of Ets2 were immobilized to glutathione sepharose beads, incubated without or with 5  $\mu\text{g/ml}$  of Et.Br. and *in vitro* synthesized  $[^{35}\text{S}]$ -labeled Erg.

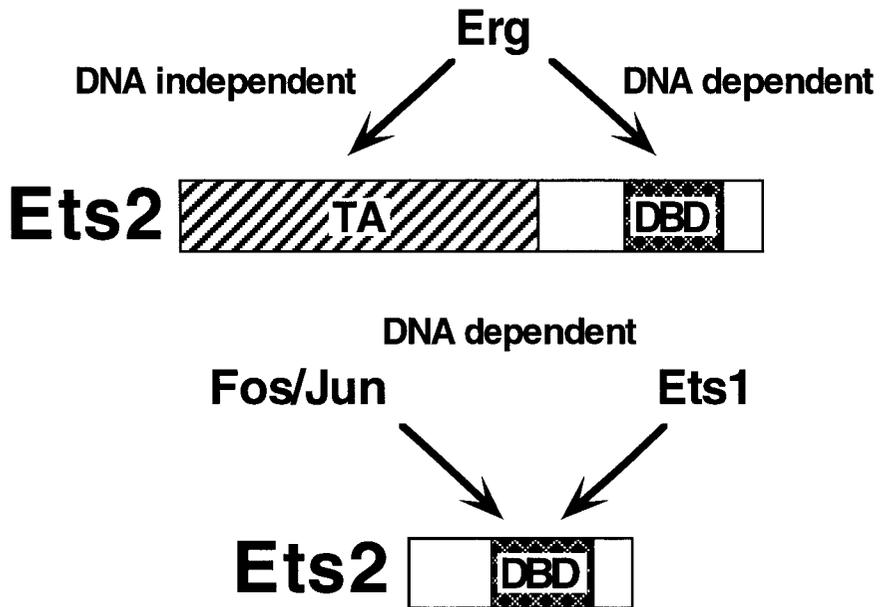


Figure 7. Schematic representation of the Ets2 domains involved in the interaction with c-Fos/c-Jun, Ets1 and Erg.

domains of transcription factors can provide the necessary complexity required to achieve appropriate gene regulation. In this study, using *in vitro* protein binding assay, we showed that the transcription factor Ets2 binds to the c-Fos / c-Jun complex and members of the Ets-family such as Ets1 and Erg. We characterized the Ets2 binding domain and found that binding to c-Fos / c-Jun and Ets1 occurred through the C-terminal end (residues 289-469), which contains the inhibitory domain ID1 (289-358), the DNA binding domain (359-439) and the inhibitory domain ID2 (440-469). None of these domains could separately bind to c-Fos / c-Jun and Ets1 although significant binding occurred through the combined DNA binding and ID domains. Ets2 binding to Erg through its C-terminal end was similar to that observed for c-Fos / c-Jun and Ets1. In addition, Erg interacted with the N-terminal region (residues 1-290) containing the TA of Ets2 and significant binding also occurred through the N-terminal residues (1-129). This region constitutes the first half of the transactivation (TA) domain of Ets2. In comparison with the full length Ets2, this region retained 30% of the capacity to bind to Erg.

### **Significance of interactions between DNA-binding domains**

The major findings of our studies are that (i) only the C-terminal part of Ets2, that contains the DBD and the two C- and N-terminal IDs, makes contacts with the Fos / Jun heterodimer and that (ii) this interaction is enhanced by specific DNA motifs suggesting diverse possible mechanisms of gene regulation by Fos, Jun and Ets transcription factors. While this work was in progress, the group of Leiden (Bassuk et Leiden, 1995) demonstrated that Elf1, an Ets-family member, associates with the basic domain of Jun and thus can form the hetero-trimeric complex Elf1 / Jun / Fos. Therefore, it appears that the Fos / Jun / Ets2 protein-protein interactions are mediated *via* the DBD or basic domain of Jun, as demonstrated by Bassuk and Leiden and *via* the C-terminal domain of Ets2 that includes DBD and the two IDs, as shown in this study. It is relevant to note that DNA binding domains have been found to be implicated in protein-protein interactions with other transcription factors (Choubey, et al., 1996). For instance, the p202, an interferon-inducible nuclear protein, interacts with the DNA binding domain of Fos and Jun and inhibits the expression of reporter genes activated by c-Fos and c-Jun (Min, et al., 1996). Moreover, recent results from Thomas Graf group, demonstrate that MafB, an AP-1 like protein, interacts *via* its basic region with the DBD of Ets-1 and represses Ets-1-mediated activation of the transferrin receptor gene (Sieweke, et al., 1996). It is therefore easy to imagine that transcription factors which interact *via* their DBDs, can interfere with each other in DNA-binding and as a result reciprocally inhibit gene transcription. Although the use of a DBD for a protein-protein interactions region would explain, in a simplistic way, interference and antagonistic effects in gene regulation, it might appear paradoxical to explain synergistic activation. It is intriguing, however, to note that protein-protein interactions involving the DBD are dependent on the presence of DNA as demonstrated by us and observed by few

others (Bassuk et Leiden, 1995, Fitzsimmons, et al., 1996). Remarkably, we found that the amount of Ets2 / Fos / Jun complex is enhanced by the presence of specific DNA promoter fragments, suggesting that DNA-binding possibly increases the proteins area of contact and as a result the quaternary complex EFJ-DNA is more stable. In support of this view, the X-ray crystal structure of the heterodimer c-Fos / c-Jun bound to the DNA, recently identified (Glover et Harrison, 1995) shows that the Fos / Jun / DNA complex exhibits a certain asymmetry in its coiled-coil and flexibility in its protein fork. The authors suggest that this special feature would allow the heterodimer to recognize disparate binding surfaces presented on other transcription factors bound at adjacent sites on the DNA. As more information of protein-DNA interactions will clearly come from X-ray crystal structures, it will be very interesting to reveal in more details the interaction we have detected in this study with the stromelysin-1 promoter DNA complexed with Fos, Jun and Ets transcription factors.

### **Implications of the role of DNA in transcription factors interactions.**

It is intriguing that the protein-protein interactions of DNA-binding domains of several transcription factors often are DNA-dependent. As originally described (Lai et Herr, 1992), the DNA intercalator ethidium bromide (Et.Br.) provides a simple tool for distinguishing genuine protein-protein interactions (DNA-independent) from those that are DNA-dependent. Although the protein associations stabilized by DNA (which is a contaminant, e.g. in samples of *in vitro* synthesized proteins) may be specific or non-specific, DNA may play a significant biological role in the protein-protein interactions of transcription factors. DNA, by making weak (i.e. non-specific) contacts with transcription factors, can significantly increase the probability for transcription factors interactions and at the same time, generate stable DNA-transcription factor complexes. Similarly, although the protein-protein interactions of transcription factors can be weak, so weak that they may not last in solution, however, because of additional contacts with DNA, the transcription factor complex should be stabilized. Indeed, it makes sense that transcription factor interactions should preferentially occur on DNA rather than in solution. The significance of physical interactions between transcription factors such as Ets- and c-Fos / c-Jun-families members is that it can effectively link different promoter elements such as EBS and AP-1 in gene regulation. Our results give significance not only for the stromelysin-1 and collagenase-1 regulation but also for other genes regulated by Ets and AP-1 transcription factors.

### **Inhibitory Domains of Ets2 enhance protein-protein interactions**

As shown here the c-Fos / c-Jun complex, as well as Ets1 and Erg, binds to the C-terminal region of Ets2. This region comprises not only the DBD but also the two inhibitory domains ID1 and ID2. These domains interact with each other and with the DBD *via* intramolecular contacts thus preventing the DBD to interact with the DNA. It has been suggested that association of the two IDs with other factors can release the DBD from their

negative influence (Petersen, et al., 1995, Donaldson, et al., 1996). It is intriguing, however, that the inhibitory domains alone do not bind to any of the transcription factors tested, c-Fos, c-Jun, c-Fos / c-Jun, Ets1 and Erg (Fig.4). In contrast when ID2 or both ID1 and ID2 are coupled to the DBD of Ets2 we detected increased binding of the transcription factors. Of interest is that ID2, which corresponds to the C-terminal end of 29 residues of Ets2, contributed largely to the increase of proteins bound to the DBD. Also, the C-terminal segment of 37 aminoacids adjacent to the DBD (ETS domain) of GABP $\alpha$  (GA binding protein) was found to mediate protein-protein interaction with the GABP $\beta$  subunit (Thompson, et al., 1991).

### **Repression of transcription by masking transactivation domains.**

The Ets-family members Ets2, Ets1, Fli1 and Erg and their combinations differentially regulate collagenase-1 and stromelysin-1 promoter activity, in an additive or antagonistic fashion in HepG2 cells (Butticè, et al., 1996). Interestingly, while Ets2 enhanced the stromelysin-1 promoter activity, Erg inhibited the Ets2-mediated activation of stromelysin-1 promoter. Therefore, we hypothesised a protein-protein interaction between Erg and Ets2 as a possible mechanism of the antagonistic effect on the stromelysin-1 regulation. Our results here, demonstrate that Ets2 physically interacts with Erg *via* several domains including the transactivation (TA) domain of Ets2, suggesting that Erg represses the Ets2 mediated activation in part by blocking the TA of Ets2. Transactivation domains of several other transcription factors are implicated in protein contacts leading to repression or activation of transcription. Thus, the protein product of the retinoblastoma gene (Rb) represses transcription by interacting directly with E2F and blocking its transactivation domain (Helin, et al., 1993). PU.1, a lymphoid-specific transcription factor can directly bind to both TFIID and Rb *via* its activation domain (Hagemeier, et al., 1993). Our results show that not only the TA of Ets2 associates with Erg, but also the C-terminal part of Ets2. However, the latter interaction is sensitive to Et.Br. treatment, suggesting that it is DNA dependent. By contrast, the interaction of Erg to the TA of Ets2 is a direct protein-protein interaction apparently not affected by the presence of DNA. Interestingly, these results raise two possible mechanisms of gene regulation by Erg and Ets2, one of which involves the TA of Ets2 and the other one the DBD. In one possibility, Erg would inhibit the Ets2 effect by masking its TA and therefore cancelling out the activation potential of Ets2. In another possibility, Erg, by interacting with the DBD of Ets2, would prevent it from binding to the DNA.

To our knowledge, this is the first evidence of the formation of Ets heterodimers, Ets2 / Ets1 and Ets2 / Erg, *in vitro* and *in vivo* in yeast. Whether they exist as heterodimer or as a multiprotein complex with other cofactors in the cell need still to be explored. Recently, only a few other groups have provided evidence that the Ets-family of transcription factors interacts with other transcription factors. Thus, the region of Ets1 (residues 123-240) that covers TA and ID1 domains interacts with the Runt domain of PEBP2 $\alpha$  (polyomavirus

enhancer binding protein) (Giese, et al., 1995) while the DBD of Ets1 associates with Pax-5 in a DNA dependent manner (Fitzsimmons, et al., 1996) and with MafB (Sieweke, et al., 1996).

Finally, we would like to propose that the C-terminal region of Ets2 is multifunctional, as it is capable not only of DNA sequence recognition but also of protein-protein interaction with other transcription factors. Here, we provided novel evidences demonstrating that the TA domain of Ets2 is implicated in protein-protein interaction with another member of the same family, Erg and that this interaction might have a functional relevance in the repression of gene transcription such that of the stromelysin-1 promoter. In summary, our results provide a molecular basis to a better understanding of the synergistic or antagonistic gene regulation by the different members of the Ets- and AP-1 (c-Fos / c-Jun) families.

### **Acknowledgements**

We thank Drs. J. Coll, M. Kurkinen and S. Saule for critical reading of the manuscript. We are grateful to Drs. T. Curran for the rat c-fos and c-jun, M. Dut rque for the human pSG-erg and F. Gilles for the human pSG-ets1 plasmids used in the pull-down experiments. This work was supported by a grant to G.B. (ARC 1093) from the *Association pour la Recherche sur le Cancer* (ARC) and by the Institut Pasteur of Lille. J.P.B. is the recipient of a scholarship from the ARC.

## References

**P. Angel, M. Imagawa, R. Chiu, B. Stein, R. J. Imbra, H. J. Rahmsdorf, C. Jonat, P. Herrlich and M. Karin (1987).** Phorbol ester-inducible genes contain a common *cis* element recognized by a TPA-modulated *trans*-acting factor. *Cell*, 49 : 729-739.

**A. G. Bassuk and J. M. Leiden (1995).** A direct physical association between ETS and AP-1 transcription factors in normal human T cells. *Immunity*, 3 : 223-237.

**G. Buttice, M. Duterque-Coquillaud, J. P. Basuyaux, S. Carrere, M. Kurkinen and D. Stéhelin (1996).** Erg, an Ets-family member, differentially regulates human collagenase1 (MMP1) and Stromelysin (MMP3) gene expression by physically interacting with the Fos/Jun complex. *Oncogene*, 13 : 2297-2306.

**G. Buttice and M. Kurkinen (1993).** A polyomavirus enhancer A-binding protein-3 site and Ets-2 protein have a major role in the 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate response of the human stromelysin gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 268 : 7196-7204.

**G. Buttice, S. Quinones and M. Kurkinen (1991).** The AP-1 site is required for basal expression but is not necessary for TPA-response of the human stromelysin gene. *Nucleic Acids Research*, 19 : 3723-3731.

**D. Choubey, S. J. Li, B. Datta, J. U. Gutterman and P. Lengyel (1996).** Inhibition of E2F-mediated transcription by p202. *The EMBO Journal*, 15 : 5668-5678.

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

**L. W. Donaldson, J. M. Petersen, B. J. Graves and L. McIntosh (1996).** Solution structure of the ETS domain from murine Ets-1 : winged helix-turn-helix DNA binding motif. *The EMBO Journal*, 15 : 125-134.

**M. Duterque-Coquillaud, C. Niel, S. Plaza and D. Stéhelin (1993).** New human erg isoforms generated by alternative splicing are transcriptional activators. *Oncogene*, 8 : 1865-1873.

**S. Fields and O. Song (1989).** A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 340 : 245-246.

**D. Fitzsimmons, W. Hodsdon, W. Wheat, S. M. Maira, B. Wasylyk and J. Hagman (1996).** Pax-6 (BSAP) recruits Ets proto-oncogene family proteins to form

functional ternary complexes on a B-cell-specific promoter. *Genes and Development*, 10 : 2198-2211.

**R. Gentz, F. J. Rauscher, C. Abate and T. Curran (1989).** Parallel Association of Fos and Jun leucine zippers juxtaposes DNA binding domains. *Science*, 243 : 1695-1699.

**K. Giese, C. Kingsley, J. R. Kirschner and R. Grosschedl (1995).** Assembly and function of a TCR $\alpha$  enhancer complex is dependant on LEF-1-induced DNA bending and multiple protein-protein interactions. *Genes and Development*, 9 : 995-1008.

**J. N. M. Glover and S. C. Harrison (1995).** Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-c-Jun bound to DNA. *Nature*, 373 : 257-261.

**J. A. Goodrich, G. Cutler and R. Tjian (1996).** Contacts in context: promoter specificity and macromolecular interactions in transcription. *Cell*, 84 : 825-830.

**P. A. Grant, C. B. Thompson and S. Pettersson (1995).** IgM receptor-mediated transactivation of the IgH 3' enhancer couples a novel Elf-1-AP-1 protein complex to the developmental control of enhancer function. *The EMBO Journal*, 14 : 4501-4513.

**C. Hagemeier, A. J. Bannister, A. Cook and T. Kouzarides (1993).** The activation domain of transcription factor PU.1 binds the retinoblastoma (RB) protein and the transcription factor TFIID *in vitro*: RB shows sequence similarity to TFIID and TFIIB. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 90 : 1580-1584.

**K. Helin, E. Harlow and A. Fattaey (1993).** Inhibition of E2F-1 transactivation by direct binding of the retinoblastoma protein. *Molecular and Cellular Biology*, 13 : 6501-6507.

**R. Janknecht and A. Nordheim (1993).** Gene regulation by Ets proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1155 : 346-356.

**F. D. Karim, L. D. Urness, C. S. Thummel, M. J. Klemsz, S. R. McKercher, A. Celada, C. V. Beveren, R. A. Maki, C. V. Gunther, J. A. Nye and B. J. Graves (1990).** The ETS-domain: a new DNA-binding motif that recognizes a purine-rich core DNA sequence. *Genes and Development*, 4 : 1451-1453.

**L. Kuras and D. Thomas (1995).** Functional analysis of Met4, a yeast transcriptional activator responsive to S-adenosylmethionine. *Molecular and Cellular Biology*, 15 : 208-216.

**J. S. Lai and W. Herr (1992).** Ethidium bromide provides a simple tool for identifying genuine DNA-independent protein associations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 89 : 6958-6962.

**W. W. Lamph, P. Wamsley, P. Sassone-Corsi and I. M. Verma (1988).** Induction of proto-oncogene Jun/AP1 by serum and TPA. *Nature*, 334 : 629-631.

**V. Laudet, C. Niel, M. Duterque-Coquillaud, D. Leprince and D. Stehelin (1993).** Evolution of the ets gene family. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 190 : 8-14.

**F. Lim, N. Kraut, J. Frampton and T. Graf (1992).** DNA binding by c-Ets-1, but not v-Ets, is repressed by an intramolecular mechanism. *The EMBO Journal*, 11 : 643-652.

**W. Min, S. Ghosh and P. Lengyel (1996).** The Interferon-inducible p202 protein as a modulator of transcription: Inhibition of NF-kB, c-Fos, and c-Jun activities. *Molecular and Cellular Biology*, 16 : 359-368.

**J. M. Petersen, J. J. Skalicky, L. W. Donaldson, L. P. McIntosh, T. Alber and B. J. Graves (1995).** Modulation of transcription factor Ets-1 DNA binding: DNA-induced unfolding of an alpha helix. *Science*, 269 : 1866-1869.

**S. Quinones, J. Saus, Y. Otani, E. D. Harris, Jr and M. Kurkinen (1989).** Transcriptional regulation of human stromelysin. *The Journal of Biological Chemistry*, 264 : 8339-8344.

**F. J. Rauscher, P. J. Voulalas, B. R. Franza, Jr and T. Curran (1988).** Fos and Jun bind cooperatively to the AP-1 site: reconstitution in vitro. *Genes and Development*, 2 : 1687-1699.

**H. R. Siddique, V. N. Rao, L. Lee and E. S. Reddy (1993).** Characterization of the DNA binding and transcriptional activation domains of the erg protein. *Oncogene*, 8 : 1751-1755.

**M. H. Sieweke, H. Tekotte, J. Frampton and T. Graf (1996).** MafB is an interaction partner and repressor of Ets-1 that inhibits erythroid differentiation. *Cell*, 85 : 49-60.

**D. B. Smith and K. S. Johnson (1988).** Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene*, 67 : 31-40.

**C. C. Thompson, T. A. Brown and S. McKnight (1991).** Convergence of Ets- and Notch-Related Structural Motifs in Heteromeric DNA Binding Complex. *Science*, 253 : 762-768.

**B. Wasyluk, S. L. Hahn and A. Giovane (1993).** The Ets family of transcription factors. *Eur. J. Biochem.*, 211 : 7-18.

**C. Wasylyk, A. Gutman, R. Nicholson and B. Wasylyk (1991).** The c-Ets oncoprotein activates the stromelysin promoter through the same elements as several non-nuclear oncoproteins. *The EMBO Journal*, 10 : 1127-1134.

**C. Wasylyk and B. Wasylyk (1992).** Oncogenic conversion alters the transcriptional properties of ets. *Cell Growth and Differentiation*, 3 : 617-625.

**H. Wu, K. Moulton, A. Horval, S. Parik and C. Glass (1994).** Combinatorial interactions between AP-1 and ets domain proteins contribute to the developmental regulation of the macrophage scavenger receptor gene. *Molecular and Cellular Biology*, 14 : 2129-2139.

#### 4.2.2. Discussion.

Des interactions physiques entre différents domaines protéiques de facteurs de transcription peuvent constituer une base moléculaire de la complexité des mécanismes coopératifs ou antagonistes régulant la transcription. Nous montrons ici que Ets2 lie le complexe c-Fos / c-Jun et des membres de la famille Ets comme Ets1 et Erg. L'interaction de Ets2 avec c-Fos / c-Jun et Ets1 a lieu au niveau de la région C-terminale de Ets2, région qui contient le domaine de liaison à l'ADN (DBD) et deux domaines adjacents inhibiteurs (DBID1 et DBID2). Aucun de ces trois domaines ne peut lier seul c-Fos / c-Jun ou Ets1, mais la combinaison du DBD et du DBID2 suffit à obtenir une interaction significative. La liaison de Erg à la région C-terminale de Ets2 présente des caractéristiques semblables. De plus, Erg interagit avec la région N-terminale qui contrôle la capacité transactivatrice de Ets2.

Seule la région de Ets2 contrôlant la liaison à l'ADN interagit physiquement avec c-Fos / c-Jun et cette interaction *in vitro* est augmentée par des fragments d'ADN spécifiques. Alors que ce travail était en cours, une autre équipe a montré que Elf1, un membre de la famille Ets, lie le domaine bZip des facteurs de la famille Jun, et forme des complexes Fos / Jun / Elf1 (Bassuk et Leiden, 1995). Les interactions entre des membres des familles Fos-Jun et Ets semblent donc impliquer les domaines de liaison à l'ADN de ces facteurs. Il est remarquable que des domaines de liaison à l'ADN participent à des interactions avec d'autres facteurs. La protéine p202 inductible par l'interféron interagit avec des domaines minimaux de liaison à l'ADN de c-Fos et c-Jun et inhibe l'activité basale ou induite d'un gène rapporteur contrôlé par un site AP-1. La p202 inhibe la liaison à l'ADN des dimères c-Fos / c-Jun et c-Jun / c-Jun (Min, et al., 1996b). La protéine MafB interagit *via* son domaine bZip avec le DBD de Ets1 et inhibe l'activité du promoteur de la transferrine induite par Ets1 (Sieweke, et al., 1996).

Dans notre étude, l'interaction physique de c-Fos / c-Jun avec le DBD de Ets2 n'est pas inhibitrice. Au contraire, les promoteurs de la collagénase-1 et de la stromélysine-1 sont induits coopérativement *via* les sites EBS et AP-1 (Butticè et Kurkinen, 1994). D'une manière comparable, Elf1 interagit avec la région bZip de Jun et coopère avec lui dans l'induction de la transcription (Bassuk et Leiden, 1995). Nous montrons de plus que la quantité de complexe c-Fos / c-Jun / Ets2 formée *in vitro* peut être augmentée spécifiquement par des fragments du promoteur de la stromélysine-1 présentant un tandem inversé de sites EBS. Cette observation suggère que la liaison à l'ADN augmente vraisemblablement les surfaces de contact entre les partenaires. Cette hypothèse est en accord avec une modification de la conformation de Ets1 accompagnant la liaison à l'ADN (Petersen, et al., 1995). De plus, une interaction physique de la région C-terminale de Ets avec un cofacteur pourrait stabiliser la liaison à l'ADN en empêchant les interactions inhibitrices entre les domaines DBD, DBID1 et DBID2 (Donaldson, et al., 1996). Il est remarquable que le domaine DBID2, ou à la fois le DBID1 et le DBID2, augmente les interactions protéiques dépendante de l'ADN observées dans notre étude. D'une

manière semblable, une région de 37 résidus adjacente au DBD de GABP $\alpha$ , un autre membre de la famille Ets, permet l'interaction avec GABP $\beta$  (Thompson, et al., 1991).

Ets2 et Erg sont des membres de la famille Ets qui régulent différemment les promoteurs de la collagénase-1 et de la stromélysine-1. Erg inhibe l'activité du promoteur de la stromélysine-1 induite par Ets2 (§ 4.1). Nous montrons ici que Erg interagit avec la région N-terminale de Ets2, région qui contrôle sa capacité transactivatrice. Les domaines transactivateurs d'autres facteurs sont impliqués dans des interactions qui induisent ou inhibent la transcription. Rb inhibe la transcription en interagissant avec le domaine transactivateur de E2F-1 (Helin, et al., 1993). Le domaine transactivateur de PU.1 interagit avec Rb et avec le facteur TFIID de la machinerie transcriptionnelle (Hagemeier, et al., 1993).

L'interaction de Erg avec la région N-terminale transactivatrice de Ets2 est insensible au bromure d'éthidium (BET), ce qui indique qu'elle est indépendante de l'ADN. Le BET s'intercale dans l'ADN et inhibe spécifiquement des interactions protéiques dépendantes de l'ADN (Lai et Herr, 1992). Les interactions observées dans notre étude en l'absence de BET pourraient mettre en jeu l'ADN présent dans les préparations de protéines en lysat de réticulocyte.

A notre connaissance, notre étude présente pour la première fois la formation de dimères de facteurs Ets (Ets1 / Ets2 et Ets2 / Erg), *in vitro* (test de corétention protéique) et *in vivo* (test de double hybride en levure). Ces dimères pourraient former des complexes multiples avec d'autres cofacteurs. Peu de travaux rapportent des interactions de facteurs Ets avec d'autres facteurs de transcription. La région Ets1(123-240) recouvrant le domaine DBID1 et une région transactivatrice interagit avec le facteur PEBP2 $\alpha$  (Giese, et al., 1995), le DBD de Ets1 interagit avec MafB (Sieweke, et al., 1996) et Ets1 interagit avec Pax5 (Fitzsimmons, et al., 1996).

Nos résultats proposent une base moléculaire à une meilleure compréhension des mécanismes coopératifs ou antagonistes de régulation de la transcription par les familles Ets et Fos-Jun. Ces mécanismes sont d'un intérêt général. Plus particulièrement, l'interaction de Erg avec la région transactivatrice N-terminale de Ets2 pourrait trouver une signification fonctionnelle dans la régulation du promoteur de la stromélysine-1.

### **4.3. Résultats complémentaires.**

#### **4.3.1. Introduction.**

Notre étude moléculaire de la régulation transcriptionnelle de la stromélysine-1 nous a conduit à étudier en test de retard sur gel la liaison de Ets2 et Erg sur des fragments (170 pb ou 260 pb) de son promoteur contenant un tandem EBS inversé. Cette paire de sites est la cible de l'induction du promoteur par Ets2. Une étude par mutation montre que les deux sites EBS sont nécessaires à une liaison significative des protéines de fusion GST-Ets2 et GST-Erg sur le promoteur (§ 4.1, figure 4, c et d). Cette coopération entre sites EBS voisins suggère la liaison simultanée de deux molécules GST-Ets2 ou GST-Erg sur l'ADN. Etant donné que Erg inhibe l'activité du promoteur de la stromélysine-1 induite par Ets2 (§ 4.1, figure 1), nous avons postulé que Ets2 et Erg pourraient lier l'ADN en formant un complexe ternaire inactif.

Afin d'argumenter davantage ce modèle d'effet dominant négatif par la formation d'un complexe inactif sur l'ADN, nous avons testé si Ets2 et Erg pourraient coopérer à la liaison au promoteur de la stromélysine-1.

#### **4.3.2. Résultats.**

La figure 12 présente des tests de retard sur gel utilisant des sondes correspondant à un fragment de 170 pb du promoteur de la stromélysine-1. Les sondes présentent le tandem EBS, ou seulement l'un des deux EBS. Dans chaque cas, nous observons que GST-Ets2 et GST-Erg coopèrent à la liaison à l'ADN.

Contrairement à l'une des expériences de retard sur gel présentées dans notre publication (§ 4.1, figure 4, d) qui utilise un tampon TBE de très faible salinité, les expériences présentées ici utilisent un tampon Tris Glycine de force élevée. Ce tampon permet de sélectionner les complexes ayant la plus grande stabilité. Dans ces conditions, le complexe GST-Ets2 / ADN est perdu au début de la migration du gel, comme le montre la traînée (« smear ») au-dessus de la sonde libre (figure 12, A, colonne 2). L'obtention d'une traînée en tampon Tris Glycine avec la protéine GST-Ets2 complète et une sonde stromélysine-1 de 170 pb (-270/-101) ou de 260 pb (-270/-11) est reproductible ; il ne s'agit pas d'un *artefact*. Lorsque la même réaction GST-Ets2 + ADN est analysée parallèlement dans un gel TBE, un retard est observé.

L'incubation simultanée de GST-Ets2 et GST-Erg avec l'ADN conduit à l'observation d'un complexe stable, ce qui indique que Ets2 et Erg coopèrent à la liaison à l'ADN. Cette coopération s'explique vraisemblablement par l'interaction protéique entre Ets2 et Erg, en particulier au niveau de la région de Ets2 contrôlant la liaison à l'ADN (domaines DBID1, DBD et DBID2).

Des résultats semblables sont obtenus avec des délétants GST-Ets2 correspondants aux domaines DBID1, DBD et DBID2 (figure 12, B) ou DBD et DBID2 (C). L'interaction de Erg

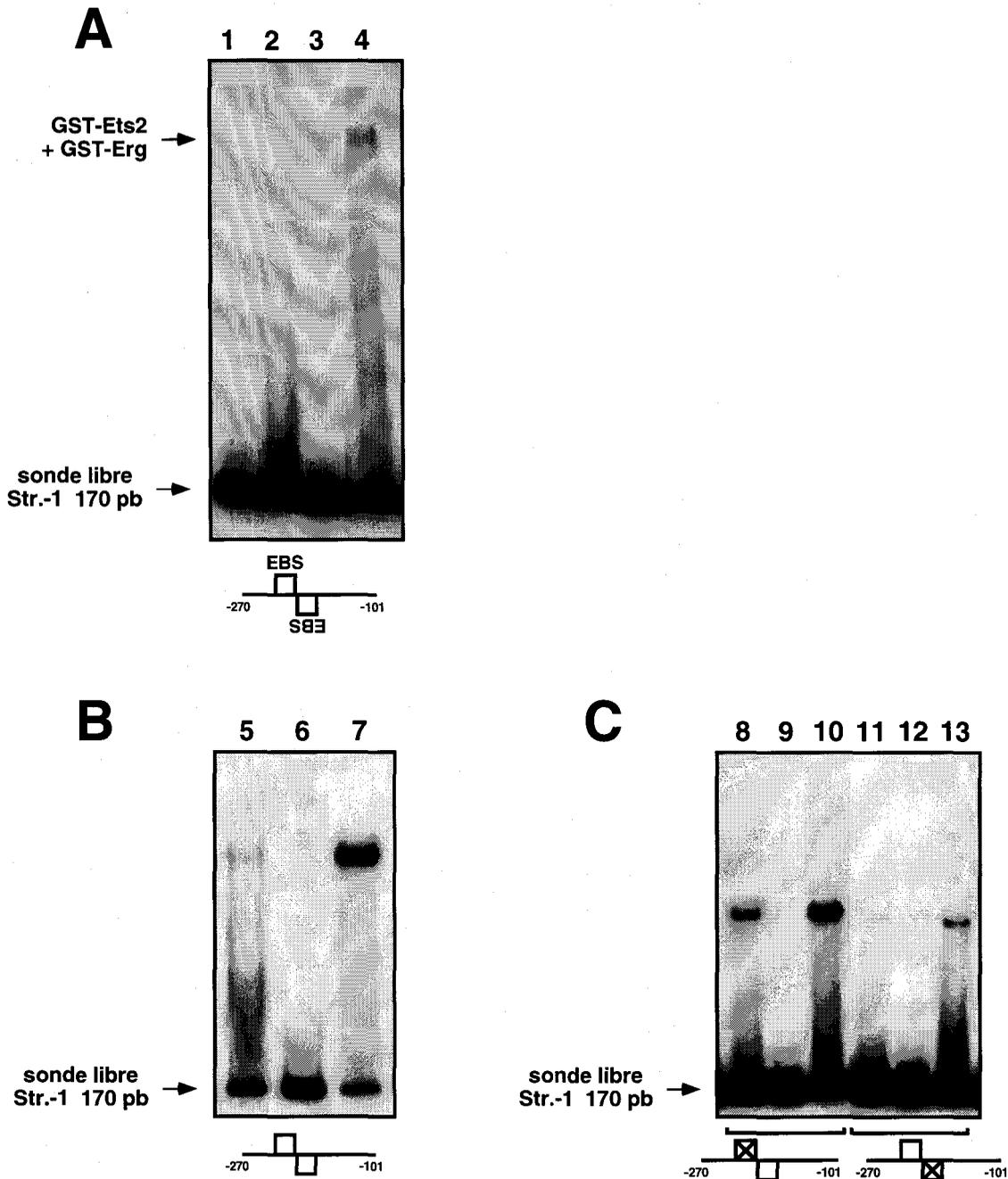
avec la région de Ets2 contrôlant la liaison à l'ADN est suffisante à une coopération entre Ets2 et Erg pour la liaison au promoteur de la stromélysine-1.

Nos résultats précédents avaient montré que les deux sites EBS sont nécessaires à la liaison de GST-Ets2 au promoteur de la stromélysine-1, ainsi qu'à la liaison de GST-Erg (§ 4.1, figure 4, c et d). Cependant, nous observons ici une activité de liaison à l'ADN sur un seul site EBS (figure 12, C), lorsqu'une sonde mutée est incubée simultanément avec GST-Ets2(359-469) et GST-Erg. Ce résultat suggère que l'interaction protéique entre GST-Ets2 et GST-Erg suffit à conférer à l'un des partenaires la capacité à lier un site EBS isolé du promoteur de la stromélysine-1. Il confirme l'existence d'une interaction protéique entre Ets2 et Erg et souligne la fonctionnalité de cette interaction dans la régulation de la liaison à l'ADN.

#### **4.3.3. Conclusion.**

Les protéines Ets2 et Erg interagissent physiquement. Cette interaction semble trouver sa signification dans la régulation transcriptionnelle du promoteur de la stromélysine-1, étudiée en test de transcription en culture cellulaire. Ets2 induit la transcription *via* un tandem inversé de sites EBS. Erg inhibe cette induction, ce qui suggère la formation d'un complexe inactif. *In vitro*, l'interaction physique de Ets2 et Erg semble à l'origine de leur coopération à la liaison au tandem EBS. La formation préférentielle d'un complexe ADN / Ets2 / Erg inactif pourrait contribuer à l'effet dominant négatif exercé par Erg sur Ets2.

Nos observations nous conduisent à un modèle moléculaire de régulation du promoteur de la stromélysine-1 par Ets2 et Erg (figure 13). Dans ce modèle, l'interaction de Erg avec la région C-terminale de Ets2 stabiliserait la liaison à l'ADN d'un dimère Ets2 / Erg. L'interaction de Erg avec la région N-terminale de Ets2 masquerait un domaine transactivateur, ce qui inhiberait la capacité de Ets2 à induire le promoteur de la stromélysine-1.



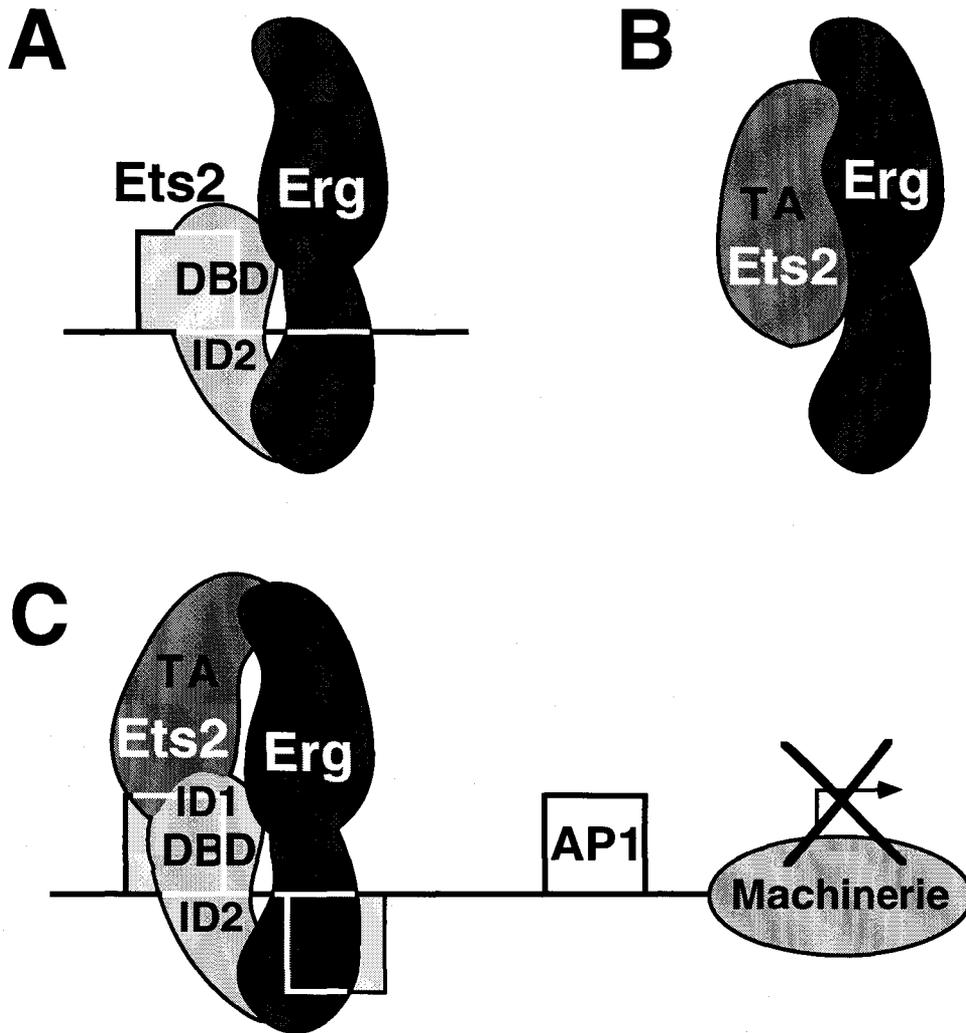
**Figure 12.** Ets2 et Erg coopèrent à la liaison à l'ADN.

Ces expériences de retard sur gel utilisent des sondes constituées d'un fragment de 170 pb du promoteur de la stromélysine-1 (-270/-101) qui présente un tandem inversé de sites EBS (-216, -208). Dans les sondes mutées, le cœur GGAA de l'un des sites EBS est muté en AAAA. Les réactions d'incubation ont été analysées dans des gels préparés avec un tampon Tris Glycine (§ 4.1, materials and methods) qui permet de ne visualiser que les complexes les plus stables.

A) Liaison à l'ADN de GST-Ets2 (colonne 2 ; 8 ng), GST-Erg (colonne 3 ; 50 ng) et leur combinaison (colonne 4). La protéine GST (colonne 1 ; 50 ng) est utilisée en contrôle négatif. Le seul complexe observé est formé en la présence simultanée de GST-Ets2 et GST-Erg.

B) Liaison à l'ADN de GST-Ets2(289-469) (domaines DBID1, DBD et DBID2) (colonne 5 ; 100 ng), GST-Erg (colonne 6 ; 100 ng) et leur combinaison (colonne 7).

C) Liaison à l'ADN de GST-Ets2(359-469) (domaines DBD et DBID2) (colonnes 8, 11 ; 100 ng), GST-Erg (colonnes 9, 12 ; 100 ng) et leur combinaison (colonnes 10, 13).



**Figure 13.** Modèle d'interaction entre Ets2 et Erg dans la régulation du promoteur de la stromélysine-1.

A) Des expériences de retard sur gel montrent que GST-Erg coopère avec un délétant GST-Ets2(359-469) (domaines DBD et DBID2) (figure 12, C) à la liaison d'un fragment de 170 pb du promoteur de la stromélysine-1, présentant seulement l'un des EBS du tandem EBS inversé. Ces résultats suggèrent qu'une interaction protéique entre Erg et la région de Ets2 contrôlant la liaison à l'ADN stabilise la liaison de Ets2 au promoteur. Il serait en effet impossible à Ets2 et Erg de lier simultanément un seul site EBS dans la même molécule d'ADN. Les expériences de coréention protéique précisent que cette interaction protéine-protéine dépend de l'ADN, puisque Erg ne lie pas GST-Ets2(289-469) en présence de BET (§ 4.2, figure 6, B).

B) Une expérience de coréention protéique met en évidence une interaction entre GST-Ets2(1-290) (région contrôlant la capacité transactivatrice) et Erg, en présence de BET (§ 4.2, figure 6, C). Cette observation révèle une interaction protéique indépendante de l'ADN.

C) Considérés ensemble, ces résultats suggèrent un mécanisme possible pour l'effet dominant négatif de Erg sur l'induction du promoteur de la stromélysine-1 par Ets2 (§ 4.1, figure 1). L'interaction protéique dépendante de l'ADN entre Erg et la région de Ets2 contrôlant la liaison à l'ADN pourrait stabiliser la liaison de Ets2 et Erg sur le tandem EBS inversé du promoteur. De plus, l'interaction entre Erg et la région de Ets2 contrôlant sa capacité transactivatrice pourrait masquer cette région (§ 4.2, discussion) et, en conséquence, supprimer la transcription induite par Ets2. Etant donné que cette interaction est indépendante de l'ADN, un hétérodimère Ets2 / Erg pourrait se former avant la liaison sur le promoteur. Au contraire, nous n'avons pas observé d'interaction significative entre GST-Ets2 et Ets2 en test de coréention protéique (donnée non présentée).

## 5. Discussion.

### 5.1. Signification physiologique de la régulation par Ets2 et Erg.

Des tests de transactivation en culture cellulaire mettent en évidence les propriétés spécifiques de différents facteurs de transcription de la famille Ets (Ets2, Erg) et indiquent comment des promoteurs présentant des sites AP-1 et EBS, semblables mais organisés différemment, sont régulés d'une manière différente par les mêmes facteurs de transcription. Ces résultats ont été obtenus avec les promoteurs de la collagénase-1 et de la stromélysine-1, mais les mécanismes mis en évidence sont potentiellement d'un intérêt général.

En ce qui concerne la régulation des MMPs, nous devons nous demander si ces mécanismes transcriptionnels sont susceptibles d'intervenir *in vivo*. Cette question pourrait être abordée en recherchant dans des tumeurs l'expression de Ets2 et Erg, de la collagénase-1 et de la stromélysine-1, par hybridation *in situ* et par immunohistochimie. Une telle étude pourrait indiquer si l'expression de la collagénase-1 ou de la stromélysine-1 est corrélée à un profil d'expression particulier des facteurs Ets2 et Erg.

D'autres facteurs peuvent réguler diversement les MMPs et une telle étude peut sembler difficile. Cependant, des cas de corrélation entre l'expression d'un facteur de transcription et de protéases extracellulaires ou membranaires ont déjà été rapportés. Il s'agit du facteur *ets1*, de la collagénase-1, de la stromélysine-1 et de l'uPA, induits par des interactions entre cellules néoplasiques et fibroblastes (§ 1.7.5.2-3) ou exprimés par des cellules endothéliales (§ 1.8.2.2).

L'établissement de souris transgéniques *erg* est en projet dans notre laboratoire. Il serait particulièrement intéressant d'examiner l'expression de la collagénase-1 et de la stromélysine-1 dans ces souris, et en particulier dans les tumeurs qu'elles pourraient développer.

### 5.2. La régulation des MMPs et les protéines CBP et p300.

#### 5.2.1. Présentation.

Le « coactivateur » CBP et son homologue p300 ne sont pas des facteurs de transcription. Ils interagissent avec plusieurs composants du complexe d'initiation de la transcription (la machinerie transcriptionnelle générale) et ont été caractérisés comme des cofacteurs de c-Fos, c-Jun, JunB et d'un membre de la famille Ets appelé Sap1a. En particulier, CBP et p300 sont impliqués dans la régulation transcriptionnelle de la collagénase-1. Nous présentons un résultat expérimental *in vitro* qui montre que p300 interagit physiquement avec Ets2, mais pas avec Erg.

De plus, CBP et p300, ainsi que le PCAF (« facteur associé à p300/CBP »), sont des histone acétyltransférases. L'acétylation des histones active la chromatine, vraisemblablement

par une déstabilisation des nucléosomes qui favoriserait l'accès des facteurs régulateurs à l'ADN (Ogryzko, et al., 1996).

### 5.2.2. CBP, p300 et la machinerie transcriptionnelle.

La protéine CREB (§ 2.2.2, § 2.10.5.2), phosphorylée par la PKA en réponse à un stimulus, est capable de lier une protéine nucléaire de 265 kDa appelée **CBP** (« protéine liant CREB »). CBP ne lie pas l'ADN mais la fusion d'un DBD hétérologue à la région N-terminale de CBP permet d'obtenir un facteur de transcription artificiel régulé par la PKA (Chrivia, et al., 1993). CBP augmente l'induction par CREB de gènes régulés par l'AMPc. Il interagit physiquement avec le facteur d'initiation de la transcription **TFIIB** (Kwok, et al., 1994) de la machinerie transcriptionnelle générale (§ 2.9.1). La région N-terminale de CBP lie la **TBP** et contient l'un des domaines transactivateurs de CBP. Cette région est suffisante pour stimuler la transcription induite par CREB (Swope, et al., 1996). CBP n'est pas considéré comme un facteur de transcription mais comme un *coactivateur*.

Le contrôle de la croissance cellulaire par les protéines **E1A** nécessite des interactions avec les protéines cellulaires Rb, p107, p130 et **p300**. Le clonage de p300 a révélé qu'elle est un homologue de CBP (Arany, et al., 1994, Eckner, et al., 1994). Comme CBP, p300 est un coactivateur qui interagit avec différents facteurs de transcription et avec la machinerie transcriptionnelle (Abraham, et al., 1993, Lundblad, et al., 1995, Janknecht et Hunter, 1996, Dallas, et al., 1997).

L'injection d'anticorps anti-CBP inhibe l'induction de promoteurs *via* des sites CRE (promoteur du peptide intestinal vasoactif), AP-1 (collagénase-1) ou SRE (*c-fos*) (Arias, et al., 1994).

Par des interactions compétitives avec différentes familles de facteurs de transcription et avec les facteurs généraux de transcription, les coactivateurs CBP et p300 pourraient coupler plusieurs voies de signalisation.

### 5.2.3. CBP et p300 sont des cofacteurs d'AP-1 ciblés par E1A.

#### 5.2.3.1. Interaction de CBP/p300 avec *c-Fos* et *c-Jun*.

La région (1-80) de la protéine E1A de l'adénovirus de type 5 (Ad5 E1A) inhibe la transcription induite par les complexes *c-Fos* / *c-Jun* et *c-Jun* / *c-Jun* en inhibant leur liaison à l'ADN (§ 1.9.2.7.3). Un autre mécanisme inhibiteur a été mis en évidence : E1A cible la protéine CBP, ou son homologue p300, qui sont des cofacteurs du complexe AP-1.

Une analyse de la protéine Ad2 E1A par délétion a montré que les résidus (**1-25**) et (**61-85**) de E1A sont nécessaires à la liaison de p300, mais pas les résidus (26-35). Le seul résidu N-terminal connu ayant un rôle essentiel est l'**Arg<sup>2</sup>**, dont le changement en Gly supprime l'activité transformante de E1A et son interaction physique avec p300 (Wang, et al., 1993). Un autre groupe montre que la délétion de la région CR1(41-80) d'Ad5 E1A supprime sa liaison à

p300 (Wong et Ziff, 1994) et à CBP (Bannister et Kouzarides, 1995). Cette cartographie rappelle les régions d'Ad5 E1A impliquées dans l'inhibition de la transcription de la collagénase-1 (§ 1.9.2.7.2).

CBP lie la protéine **c-Fos**, par la région CBP2(1621-1877). Cette liaison nécessite simultanément les modules activateurs FAM4(250-316) et FAM5(314-380) de c-Fos. Elle est indépendante de l'état de phosphorylation de c-Fos. L'induction de la transcription d'un gène rapporteur par la protéine de fusion GAL4-c-Fos est inhibée par Ad5 E1A. Cette inhibition nécessite la région CR1 de E1A. D'un point de vue cartographique, la capacité de E1A à lier CBP coïncide donc avec sa capacité à inhiber l'activité transcriptionnelle de c-Fos. De plus, CBP stimule (x 3) l'induction d'un promoteur de la **collagénase-1** minimal (-73/+63) par les complexes c-Fos / c-Jun et c-Jun / c-Jun (Bannister et Kouzarides, 1995).

CBP lie également le facteur **c-Jun** phosphorylé sur les résidus **Ser**<sup>63</sup> et **Ser**<sup>73</sup>. La liaison dépend de cette phosphorylation spécifique. CBP ne lie pas une protéine c-Jun phosphorylée *in vitro* par la caséine kinase sur les résidus **Thr**<sup>231</sup> et **Ser**<sup>249</sup>. CBP augmente l'activité (x 3.5) d'un promoteur induit par c-Jun, mais pas par un mutant c-Jun Ala<sup>63</sup>-Ala<sup>73</sup>. Ces observations suggèrent que l'interaction spécifique de CBP et de c-Jun est fonctionnelle (Arias, et al., 1994).

CBP n'augmente pas l'activité de c-Jun dans tous les types cellulaires, peut-être par manque d'autres facteurs interagissant avec elle (Arias, et al., 1994). Les coactivateurs caractérisés de CBP sont le suppresseur de tumeur p53 et le facteur p/CIP de la famille p160. p/CIP forme un complexe *in vivo* avec CBP et est nécessaire à l'induction de la transcription par les récepteurs nucléaires RARs/RXRs, ER, TR et PR (§ 1.9.2.3.1) *via* leurs sites respectifs, par les facteurs Stat *via* le site GAS (§ 2.10.3), et par les facteurs CREB *via* le site CRE (§ 2.10.5.2). Les deux autres membres de la famille p160, NCoA-1/SRC-1 et NCoA-2/TIF-2, sont des coactivateurs spécifiques de ces mêmes récepteurs nucléaires (Torchia, et al., 1997). CBP interagit directement avec les récepteurs nucléaires et également indirectement par l'intermédiaire de SRC-1 (Kamei, et al., 1996). Le suppresseur de tumeur p53 augmente l'activité transcriptionnelle d'une construction GAL4-CBP(1678-2441) et inversement CBP augmente l'activité d'un promoteur induit par p53 (Gu, et al., 1997).

Nous avons également mentionné que l'inhibition d'AP-1 par des récepteurs nucléaires peut procéder par une liaison compétitive à CBP (§ 1.9.2.3.5).

Ces résultats montrent que CBP est un cofacteur qui lie c-Fos et c-Jun et qui coopère avec eux dans l'induction de la transcription. Ils suggèrent que E1A inhibe la transcription induite par c-Fos et/ou c-Jun en se liant à CBP, ou à son homologue p300, hypothèse qui est confirmée par d'autres travaux.

### 5.2.3.2. Ciblage de CBP/p300 par E1A.

Ad5 E1A inhibe l'activité du promoteur de la **collagénase-1** (-517/+63) induite par **c-Jun** ou par **JunB** dans les cellules HeLa (lignée de carcinome du col de l'utérus). Ad5 E1A

inhibe également l'activité d'un gène rapporteur contrôlé par 5 sites GAL4 induit par des protéines de fusion GAL4-c-Jun ou GAL4-JunB, dans les cellules U2OS (lignée d'ostéosarcome). Cette inhibition par E1A nécessite sa région de liaison à p300. La coexpression de p300, ou d'un mutant p300 sans domaine d'interaction avec E1A, restaure et même stimule l'activité de GAL4-c-Jun (x 10-15) et celle de GAL4-JunB (x 2.5-4). La coexpression de CBP restaure l'activité de GAL4-c-Jun, sans induction supplémentaire. CBP a un effet très faible contre l'inhibition de GAL4-JunB par E1A. Des tests de corétention protéique *in vitro* montrent que p300 et CBP lient c-Jun et JunB. Ces résultats indiquent que p300 est un cofacteur de c-Jun et de JunB et qu'il est ciblé par E1A (Lee, et al., 1996). Dans ce modèle de régulation transcriptionnelle particulièrement artificiel, CBP semble être un faible cofacteur de c-Jun, contrairement à p300.

Une autre étude montre également que Ad5 E1A inhibe (: 100) l'activité du promoteur de la **collagénase-1** (-517/+63) induite par c-Jun, dans les cellules HeLa. Au contraire, un mutant ponctuel de E1A (Arg<sup>2</sup> --> Gly) incapable de lier p300 réprime beaucoup plus faiblement l'induction (: 2). La surexpression de CBP, de p300 ou d'un délétant p300 ne liant pas E1A supprime l'inhibition par E1A. CBP et p300 semblent redondants fonctionnellement. Toutefois, quand la quantité de E1A augmente, l'efficacité de CBP à restaurer l'activité décroît plus vite que celle de p300. En l'absence de E1A, la surexpression de p300 ne stimule pas le promoteur de la collagénase-1, avec ou sans coexpression de c-Jun. Ces résultats montrent que p300, ou CBP, est un cofacteur nécessaire à la transcription de la collagénase-1, basale ou induite par c-Jun. p300 ou CBP est constitutivement exprimé à un niveau non limitatif, mais est inhibé par une interaction physique avec E1A (Smits, et al., 1996).

Une interaction directe avec p300 et CBP a également été rapportée dans le cas de la protéine Ad12 E1A (Dorsman, et al., 1997). Ad12 E1A inhibe l'activité d'un gène rapporteur contrôlé par un site AP-1 et induit par c-Jun. La liaison de c-Jun sur le promoteur et son interaction physique avec la TBP ne sont pas inhibées par E1A. L'inhibition de l'activité est due à une inhibition de la phosphorylation de c-Jun (Brockmann, et al., 1995). Ce mécanisme d'inhibition par Ad12 E1A pourrait impliquer indirectement CBP, dans la mesure où CBP est le seul coactivateur connu reconnaissant spécifiquement la forme phosphorylée de c-Jun (ci-dessus et § 2.9.2).

#### 5.2.4. Interaction de CBP avec des facteurs Ets.

##### 5.2.4.1. Régulation du gène MSR.

Nous avons vu que le gène du « *macrophage scavenger receptor* » (MSR) est inductible *via* un site AP-1 like et 2 paires **EBS-AP-1 like**. Ces éléments mixtes sont reconnus *in vivo* par c-Jun, JunB et, vraisemblablement, par Ets2. c-Jun et Ets2 coopèrent à l'induction du promoteur du MSR (§ 3.7.2.2.7).

Une étude récente montre que l'IFN- $\gamma$  inhibe l'induction du MSR, vraisemblablement *via* un élément EBS-AP-1 like. L'activité induite par le TPA d'un gène rapporteur contrôlé par la répétition d'une paire EBS-AP-1 like du promoteur du MSR est inhibée par l'IFN- $\gamma$ . CBP restaure cette activité. CBP interagit physiquement avec **Stat1**, un facteur de transcription qui reconnaît le site GAS, élément inductible par l'IFN- $\gamma$  (Stat est présenté en § 2.10.3). CBP augmente l'induction par l'IFN- $\gamma$  d'un gène rapporteur contrôlé par des sites GAS. Ces observations suggèrent que CBP est un cofacteur fonctionnel de Stat1 et que l'interaction de CBP avec Stat1 est antagoniste de l'induction de la transcription *via* des éléments EBS-AP-1 like. Cette hypothèse est confirmée par le fait que l'inhibition par l'IFN- $\gamma$  de la transcription induite *via* des éléments EBS-AP-1 like n'est pas observée dans des cellules déficientes en Stat1 (Horvai, et al., 1997).

Ces résultats nous indiquent que CBP est un coactivateur impliqué dans l'induction de la transcription *via* un élément EBS-AP-1 like du promoteur du MSR. Cet élément est induit coopérativement par c-Jun et Ets2. CBP, ou son homologue p300, pourrait être un intégrateur des signalisations passant par les facteurs Fos-Jun et Ets et un intermédiaire dans l'induction de la transcription. Il intégrerait également le signal passant par Stat1, signal qui conduit à la suppression de l'induction.

#### 5.2.4.2. Induction de *c-fos*.

**Sap1a** est un facteur Ets du groupe Elk. Nous avons vu qu'il forme avec le SRF et le site **SRE** du promoteur de *c-fos* un complexe ternaire transactivateur, ce qui caractérise Sap1a comme un TCF. CBP interagit physiquement avec Sap1a, indépendamment l'état de phosphorylation de ce dernier. La phosphorylation d'un TCF permet son recrutement sur le site SRE (montré dans le cas de Elk1) et permet la coopération au niveau transcriptionnel entre CBP et Sap1a. Dans la régulation transcriptionnelle de *c-fos*, CBP est un intégrateur de l'induction par Sap1a *via* le SRE (§ 2.10.5.1.1) et par CREB *via* le CRE (§ 2.10.5.2) (Janknecht et Nordheim, 1996).

Ces résultats montrent que CBP est un coactivateur de Sap1a avec lequel il interagit physiquement d'une manière constitutive. Nous suggérons que CBP ou p300 pourraient interagir avec d'autres facteurs de la famille Ets et servir d'intégrateurs dans l'induction des MMPs par des facteurs Fos-Jun et Ets.

#### 5.2.5. Ets2, mais pas Erg, interagit physiquement avec p300.

##### 5.2.5.1. Présentation.

Erg induit le promoteur de la collagénase-1 sur lequel il est recruté par un facteur AP-1. Au contraire, Erg n'induit pas le promoteur de la stromélysine-1 et supprime son induction par Ets2 (§ 4.1). Erg interagit physiquement avec Ets2 (§ 4.2). Il est connu que CBP est un coactivateur de c-Fos, c-Jun et JunB dans l'induction de la collagénase-1 (§ 5.2.3). Nous

avons réalisé un test préliminaire d'interaction protéique *in vitro* pour déterminer si p300, un facteur structurellement et fonctionnellement homologue de CBP, interagirait différemment avec Ets2 et Erg. Notre intention était d'obtenir une base moléculaire simple qui puisse motiver une étude de CBP et p300 considérés comme des cibles potentielles des facteurs Ets2 et Erg et comme des intégrateurs potentiels de la régulation transcriptionnelle de la collagénase-1 et de la stromélysine-1.

#### 5.2.5.2. Résultats.

Notre test de corétention protéique utilise la protéine GST en contrôle négatif et la protéine GST-ERM en contrôle positif. Nous savions en effet que ERM (« molécule apparentée à Ets ») interagit physiquement avec CBP et p300 (Jean Luc BAERT, communication personnelle). Nous montrons ici que Ets2 et ERM interagissent significativement avec p300, mais pas Erg (6.2 et 5.1% de liaison, contre 1.1%) (figure 12).

L'interaction de Ets2 avec p300 est médiée par la région transactivatrice N-terminale Ets2(1-290). Ets2 et Erg interagissent avec les délétants p300, autant ou davantage qu'avec la protéine p300 complète. Ces interactions pourraient impliquer des domaines de p300 qui ne sont pas exposés à la surface de la protéine complète, ou dont la conformation est artificiellement modifiée par la délétion. Une telle interaction est également observée entre la région C-terminale de p300 et la région C-terminale de Ets2 qui, comme Erg, n'interagit pas significativement avec la p300 complète.

En conclusion, ce test met en évidence que Ets2, mais pas Erg, interagit physiquement *via* sa région N-terminale transactivatrice avec la protéine p300. Des délétants p300 font apparaître des interactions plus fortes qu'avec la protéine p300 complète, ce qui rend difficile une cartographie de p300 pour l'interaction avec Ets2.

#### 5.2.6. Conclusion.

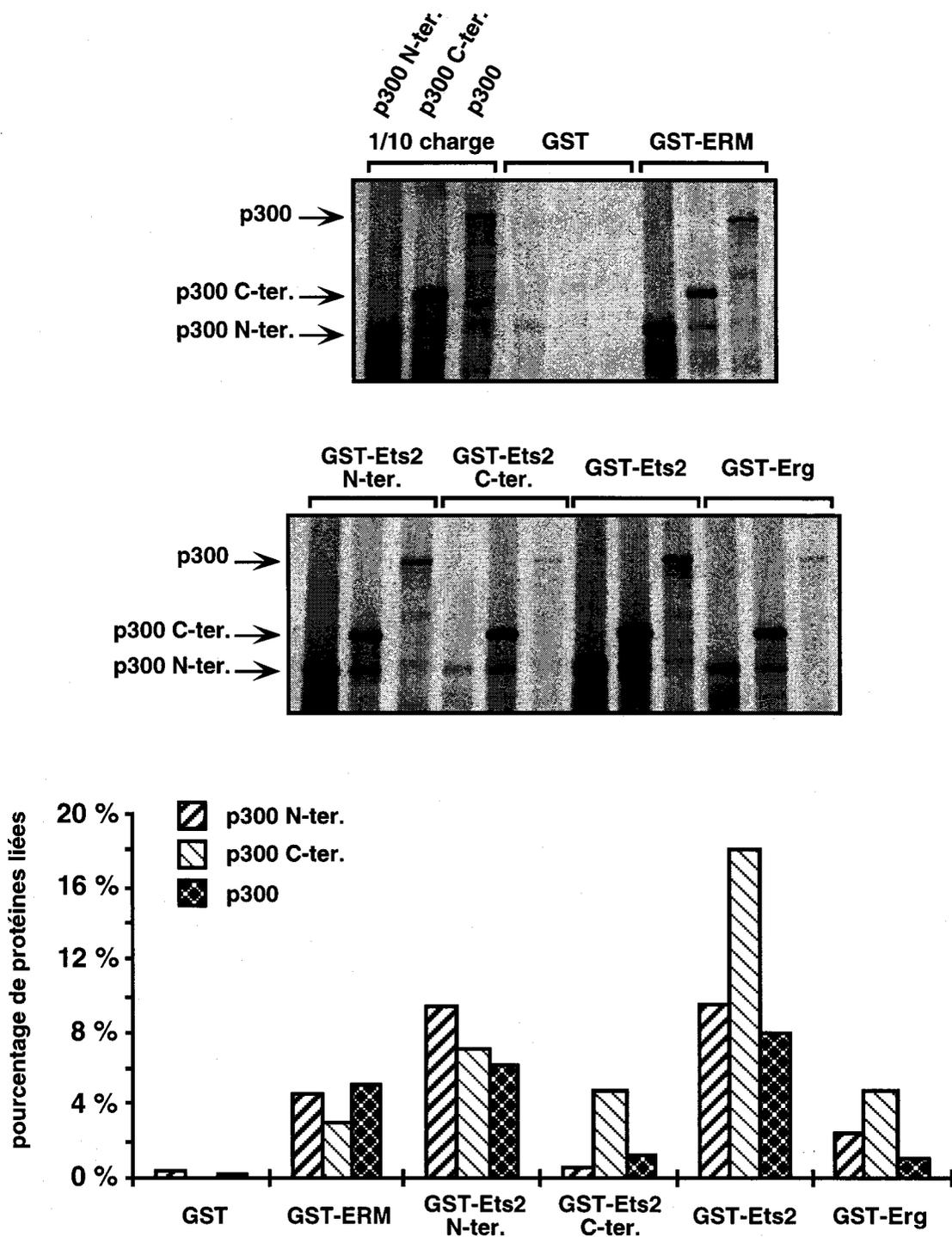
CBP, ou son homologue p300, sont des coactivateurs de c-Fos, c-Jun et JunB qui interagissent avec plusieurs composants de la machinerie transcriptionnelle. Ce sont les coactivateurs de nombreux autres facteurs de transcription. Ils sont capables d'intégrer des signaux passant par plusieurs facteurs, comme CREB et Sap1a dans la régulation du gène *c-fos*, ou Ets, AP-1 et Stat1 dans la régulation du gène du « *macrophage scavenger receptor* ».

Nous montrons que p300 interagit physiquement avec Ets2, mais pas avec Erg. CBP ou p300 pourraient être des effecteurs de la régulation différentielle de la collagénase-1 et de la stromélysine-1 par Ets2, Erg et leur combinaison, régulation qui fait intervenir également une activité AP-1 endogène. Ces coactivateurs pourraient interagir avec un complexe Fos / Jun / Erg positionné sur la paire EBS-AP-1 du promoteur de la collagénase-1, mais pas avec Erg positionné sur le promoteur de la stromélysine-1. Erg lie à la fois les régions N- et C-terminales de Ets2 et pourrait en particulier masquer la région N-terminale de Ets2 qui interagit *in vitro* avec p300. La formation d'un complexe Ets2 / Erg n'interagissant pas avec

CBP ou p300 pourrait constituer la base moléculaire de l'effet dominant négatif de Erg sur Ets2 dans l'induction de la stromélysine-1.

#### **5.2.7. Remerciements.**

L'expérience présentée figure 14 utilise des clones codant la protéine p300 complète et des délétants correspondants aux moitiés N- et C-terminales de p300, aimablement fournis par David M. LIVINGSTON (Eckner, et al., 1994). Le clone GST-Ets2 a été construit à partir du plasmide pSVK3 Ets2, lui-même construit par Giovanna BUTTICE et ses collaborateurs à partir d'un clone *ets2* fourni par Denis K. WATSON (Watson, et al., 1988). Le clone Erg codant la p55 (§ 3.8.4) a été fourni par Martine DUTERQUE-COQUILLAUD et le clone ERM par Yvan de LAUNOIT (Monté, et al., 1994).



**Figure 14.** Les protéines Ets2, Erg et ERM interagissent différemment avec la p300.

Dans ce test d'interaction protéique *in vitro*, une même quantité (62 pmol) de protéines GST, GST-ERM, GST-Ets2, GST-Erg, du délétant N-terminal GST-Ets2(1-290) ou du délétant C-terminal GST-Ets2(289-469) a été immobilisée sur des billes sépharose-glutathion et incubée avec une protéine p300 marquée au  $^{35}\text{S}$  synthétisée *in vitro* ou avec des délétants représentant la moitié N-terminale ou C-terminale de p300. Les protéines p300 liées aux protéines GST ont été analysées sur gel d'acrylamide SDS, puis visualisées et quantifiées avec un PhosphorImager. Un dixième de la quantité totale des produits p300 mise en incubation est présentée. Elle permet le calcul du pourcentage de liaison aux constructions GST, illustré par l'histogramme.

## 6. Références bibliographiques.

**S. E. Abraham, S. Lobo, P. Yaciuk, H. G. Wang and E. Moran (1993).** p300, and p300-associated proteins, are components of TATA-binding protein (TBP) complexes. *Oncogene*, 8 : 1639-1647.

**S. Akira, H. Isshiki, T. Sugita, O. Tanabe, S. Kinoshita, Y. Nishio, T. Nakajima, T. Hirano and T. Kishimoto (1990).** A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family. *The EMBO Journal*, 9 : 1897-1906.

**S. Akira, Y. Nishio, M. Inoue, X. J. Wang, S. Wei, T. Matsusaka, K. Yoshida, T. Sudo, M. Naruto and T. Kishimoto (1994).** Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway. *Cell*, 77 : 63-71.

**O. Albagli, N. Soudant, E. Ferreira, P. Dhordain, F. Dewitte, A. Begue, A. Flourens, D. Stéhelin and D. Leprince (1994).** A model for gene evolution of the ets-1/ets-2 transcription factors based on structural and functional homologies. *Oncogene*, 9 : 3259-3271.

**A. Albini, G. Fontanini, L. Masiello, C. Tacchetti, D. Bigini, P. Luzzi, D. M. Noonan and S. W. Stetler (1994).** Angiogenic potential *in vivo* by Kaposi's sarcoma cell-free supernatants and HIV-1 tat product : inhibition of KS-like lesions by tissue inhibitor of metalloproteinase-2. *Aids*, 8 : 1237-1244.

**C. M. Alexander, E. J. Hansell, O. Behrendtsen, M. L. Flannery, N. S. Kishnani, S. P. Hawkes and Z. Werb (1996).** Expression and function of matrix metalloproteinases and their inhibitors at the maternal-embryonic boundary during mouse embryo implantation. *Development*, 122 : 1723-1736.

**J. A. Allan, R. M. Hembry, S. Angal, J. J. Reynolds and G. Murphy (1991).** Binding of latent and high Mr active forms of stromelysin to collagen is mediated by the C-terminal domain. *Journal of Cell Science*, 99 : 789-795.

**P. Angel, K. Hattori, T. Smeal and M. Karin (1988).** The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1. *Cell*, 55 : 875-885.

**P. Angel, M. Imagawa, R. Chiu, B. Stein, R. J. Imbra, H. J. Rahmsdorf, C. Jonat, P. Herrlich and M. Karin (1987).** Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell*, 49 : 729-739.

**P. Anglard, T. Melot, E. Guerin, G. Thomas and P. Basset (1995).** Structure and promoter characterization of the human stromelysin-3 gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 270 : 20337-20344.

**G. Apodaca, J. T. Rutka, K. Bouhana, M. E. Berens, J. R. Giblin, M. L. Rosenblum, J. H. McKerrow and M. J. Banda (1990).** Expression of metalloproteinases and metalloproteinase inhibitors by fetal astrocytes and glioma cells. *Cancer Research*, 50 : 2322-2329.

**Z. Arany, W. R. Sellers, D. M. Livingston and R. Eckner (1994).** E1A-associated p300 and CREB-associated CBP belong to a conserved family of coactivators. *Cell*, 77 : 799-800.

**J. Arias, A. S. Alberts, P. Brindle, F. X. Claret, T. Smeal, M. Karin, J. Feramisco and M. Montminy (1994).** Activation of cAMP and mitogen responsive genes relies on a common nuclear factor. *Nature*, 370 : 226-229.

**H. Asaoka, A. Matsumoto, H. Itakura and T. Kodama (1993).** Structural and function of the human macrophage scavenger receptor. *Nippon Rinsho*, 51 : 1677-1683.

**D. T. Auble and C. E. Brinckerhoff (1991).** The AP1 sequence is necessary but not sufficient for phorbol induction of collagenase in fibroblasts. *Biochemistry*, 30 : 4629-4635.

**J. Auwerx and P. Sassone-Corsi (1991).** IP-1 : a dominant inhibitor of Fos/Jun whose activity is modulated by phosphorylation. *Cell*, 64 : 983-993.

**H. S. Azzam, G. Arand, M. E. Lippman and E. W. Thompson (1993).** Association of MMP-2 activation potential with metastatic progression in human breast cancer cell lines independent of MMP-2 production. *Journal of the National Cancer Institute*, 85 : 1758-1764.

**W. Azzo and J. F. Woessner, Jr (1986).** Purification and characterization of an acid metalloproteinase from human articular cartilage. *The Journal of Biological Chemistry*, 261 : 5434-5441.

**S. J. Baker, T. K. Kerppola, D. Luk, M. T. Vandenberg, D. R. Marshak, T. Curran and C. Abate (1992).** Jun is phosphorylated by several protein kinases at the same sites that are modified in serum-stimulated fibroblasts. *Molecular and Cellular Biology*, 12 : 4694-4705.

**M. J. Banda, E. W. Howard, G. S. Herron and G. Apodaca (1992).** Secreted inhibitors of metalloproteinases (IMPs) that are distinct from TIMP. *Matrix. Supplement*, 1 : 294-298.

**A. J. Bannister and T. Kouzarides (1995).** CBP-induced stimulation of c-Fos activity is abrogated by E1A. *The EMBO Journal*, 14 : 4758-4762.

**E. Baramova and J. M. Foidart (1995).** Matrix metalloproteinase family. *Cell Biology International*, 19 : 239-242.

**E. N. Baramova, K. Bajou, A. Remacle, C. L'Hoir, H. W. Krell, U. H. Weidle, A. Noel and J. M. Foidart (1997).** Involvement of PA/plasmin system in the processing of pro-MMP-9 and in the second step of pro-MMP-2 activation. *FEBS Letters*, 405 : 157-162.

**P. Basset, J. P. Bellocq, C. Wolf, I. Stoll, P. Hutin, J. M. Limacher, O. L. Podhajcer, M. P. Chenard, M. C. Rio and P. Chambon (1990).** A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature*, 1990 : 699-704.

**P. Basset, C. Wolf, N. Rouyer, J. P. Bellocq, M. C. Rio and P. Chambon (1994).** Stromelysin-3 in stromal tissue as a control factor in breast cancer behavior. *Cancer*, 74 : 1045-1049.

**A. G. Bassuk, R. T. Anandappa and J. M. Leiden (1997).** Physical interactions between Ets and NF-kappaB/NFAT proteins play an important role in their cooperative activation of the human immunodeficiency virus enhancer in T cells. *Journal of Virology*, 71 : 3563-3573.

**A. G. Bassuk and J. M. Leiden (1995).** A Direct Physical Association between ETS and AP-1 Transcription Factors in Normal Human T Cells. *Immunity*, 3 : 223-237.

**H. Baumann, K. K. Morella, G. P. Jahreis and S. Marinkovic (1990).** Distinct regulation of the interleukin-1 and interleukin-6 response elements of the rat haptoglobin gene in rat and human hepatoma cells. *Molecular and Cellular Biology*, 10 : 5967-5976.

**U. Benbow, G. Buttice, H. Nagase and M. Kurkinen (1996).** Characterization of the 46-kDa intermediates of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1) obtained by site-directed mutation of phenylalanine 83. *The Journal of Biological Chemistry*, 271 : 10715-10722.

**D. M. Benbrook and N. C. Jones (1990).** Heterodimer formation between CREB and JUN proteins. *Oncogene*, 5 : 295-302.

**R. Benelli, R. Adatia, B. Ensoli, W. G. Stetler-Stevenson, L. Santi and A. Albini (1994).** Inhibition of AIDS-Kaposi's sarcoma cell induced endothelial cell

invasion by TIMP-2 and a synthetic peptide from the metalloproteinase propeptide : implications for an anti-angiogenic therapy. *Oncology Research*, 6 : 251-257.

**I. Berger and Y. Shaul (1994)**. The human junD gene is positively and selectively autoregulated. *DNA and Cell Biology*, 13 : 249-255.

**G. Bergers, P. Graninger, S. Braselmann, C. Wrighton and M. Busslinger (1995)**. Transcriptional activation of the fra-1 gene by AP-1 is mediated by regulatory sequences in the first intron. *Molecular and Cellular Biology*, 15 : 3748-3758.

**B. Bertaux, W. Hornebeck, A. Courtalon, C. Lebreton and L. Dubertret (1990)**. Stimulation of epidermal growth in equivalent skin by tissue inhibitor of metalloproteases. *Pathologie Biologie*, 38 : 1029-1033.

**B. Bertaux, W. Hornebeck, A. Z. Eisen and L. Dubertret (1991)**. Growth stimulation of human keratinocytes by tissue inhibitor of metalloproteinases. *Journal of Investigative Dermatology*, 97 : 679-685.

**J. Berthelsen, J. Vandekerkhove and F. Blasi (1996)**. Purification and characterization of UEF3, a novel factor involved in the regulation of the urokinase and other AP-1 controlled promoters. *The Journal of Biological Chemistry*, 271 : 3822-3830.

**H. F. Bigg and T. E. Cawston (1996)**. Effect of retinoic acid in combination with platelet-derived growth factor-BB or transforming growth factor-beta on tissue inhibitor of metalloproteinases and collagenase secretion from human skin and synovial fibroblasts. *Journal of Cellular Physiology*, 166 : 84-93.

**H. F. Bigg, Y. E. Shi, Y. E. Liu, B. Steffensen and C. M. Overall (1997)**. Specific, high affinity binding of tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (TIMP-4) to the COOH-terminal hemopexin-like domain of human gelatinase A. TIMP-4 binds progelatinase A and the COOH-terminal domain in a similar manner to TIMP-2. *The Journal of Biological Chemistry*, 272 : 15496-15500.

**C. Biswas, Y. Zhang, R. DeCastro, H. Guo, T. Nakamura, H. Kataoka and K. Nabeshima (1995)**. The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily. *Cancer Research*, 55 : 434-439.

**C. J. Biswas (1984)**. Collagenase stimulation in cocultures of human fibroblasts and human tumor cells. *Cancer Letters*, 24 : 201-207.

**J. B. Bjarnason and J. W. Fox (1995)**. Snake venom metalloendopeptidases : reprotolysins. *Methods in Enzymology*, 248 : 345-368.

**J. M. Blanchard (1992).** Le proto-oncogène c-fos : un "entremetteur" cellulaire. *Médecine / Sciences*, 8 : 455-470.

**L. H. Boise, B. Petryniak, X. Mao, C. H. June, C. Y. Wang, T. Lindsten, R. Bravo, K. Kovary, J. M. Leiden and C. B. Thompson (1993).** The NFAT-1 DNA binding complex in activated T cells contains Fra-1 and JunB. *Molecular and Cellular Biology*, 13 : 1911-1919.

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

**T. C. Boone, M. J. Johnson, Y. A. DeClerck and K. E. Langley (1990).** cDNA cloning and expression of a metalloproteinase inhibitor related to tissue inhibitor of metalloproteinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 87 : 2800-2804.

**A. H. Borchers, M. B. Powell, N. E. Fusenig and G. T. Bowden (1994).** Paracrine factor and cell-cell contact-mediated induction of protease and *c-ets* gene expression in malignant keratinocyte/dermal fibroblast cocultures. *Experimental Cell Research*, 213 : 143-147.

**A. P. Bradford, C. Wasylyk, B. Wasylyk and A. Gutierrez-Hartmann (1997).** Interaction of Ets-1 and the POU-homeodomain protein GHF-1/Pit-1 reconstitutes pituitary-specific gene expression. *Molecular and Cellular Biology*, 17 : 1065-1074.

**B. S. Braun, R. Frieden, S. L. Lessnick, W. A. May and C. T. Denny (1995).** Identification of target genes for the Ewing's sarcoma EWS/FLI fusion protein by representational difference analysis. *Molecular and Cellular Biology*, 15 : 4623-4630.

**C. E. Brinckerhoff, K. Suzuki, T. I. Mitchell, F. Oram, C. I. Coon, R. D. Palmiter and H. Nagase (1990).** Rabbit procollagenase synthesised and secreted by a high-yield mammalian expression vector requires stromelysin (matrix-metalloproteinase-3) for maximal activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 265 : 22262-22269.

**D. Brockmann, C. Bury, G. Kroner, H. C. Kirch and H. Esche (1995).** Repression of the c-Jun trans-activation function by the adenovirus type 12 E1A 52R protein correlates with the inhibition of phosphorylation of the c-Jun activation domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 270 : 10754-10763.

**P. C. Brooks, S. Stromblad, L. C. Sanders, T. L. von Schalscha, R. T. Aimes, W. G. Stetler-Stevenson, J. P. Quigley and D. A. Cheresh (1996).**

Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. *Cell*, 85 : 683-693.

**J. C. Brown and R. Timpl (1995)**. The collagen superfamily. *International Archives of Allergy and Immunology*, 107 : 484-490.

**R. T. Brown, I. Z. Ades and R. P. Nordan (1995)**. An acute phase response factor/NF-kappa B site downstream of the junB gene that mediates responsiveness to interleukin-6 in a murine plasmacytoma. *The Journal of Biological Chemistry*, 270 : 31129-31135.

**T. A. Brown and S. L. McKnight (1992)**. Specificities of protein-protein and protein-DNA interaction of GABP $\alpha$  and two newly defined *ets*-related proteins. *Genes and Development*, 6 : 2502-2512.

**K. L. Bruner, W. H. Rodgers, L. I. Gold, M. Korc, J. T. Hargrove, L. M. Matrisian and K. G. Osteen (1995)**. Transforming growth factor beta mediates the progesterone suppression of an epithelial metalloproteinase by adjacent stroma in the human endometrium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 92 : 7362-7366.

**M. R. Buck, D. G. Karustis, N. A. Day, K. V. Honn and B. F. Sloane (1992)**. Degradation of extracellular-matrix proteins by human cathepsin B from normal and tumour tissues. *Biochemical Journal*, 282 : 273-278.

**M. Budihna, J. Skrk, B. Zakotnik, D. Gabrijelcic and J. Lindtner (1995)**. Prognostic value of total cathepsin B in invasive ductal carcinoma of the breast. *European Journal of Cancer*, 31A : 661-664.

**J. A. Buras, W. R. Reenstra and M. J. Fenton (1995)**. NF beta A, a factor required for maximal interleukin-1 beta gene expression is identical to the *ets* family member PU.1. Evidence for structural alteration following LPS activation. *Molecular Immunology*, 32 : 541-554.

**K. J. Busam, A. B. Roberts and M. B. Sporn (1992)**. Inhibition of mitogen-induced *c-fos* expression in melanoma cells by retinoic acid involves the serum response element. *The Journal of Biological Chemistry*, 267 : 19971-19977.

**S. J. Busch and P. Sassone-Corsi (1990a)**. Dimers, leucine zippers and DNA-binding domains. *Trends In Genetics*, 6 : 36-40.

**S. J. Busch and P. Sassone-Corsi (1990b)**. Fos, Jun and CREB basic-domain peptides have intrinsic DNA-binding activity enhanced by a novel stabilizing factor. *Oncogene*, 5 : 1549-1556.

**D. F. Busiek, V. Baragi, L. C. Nehring, W. C. Parks and H. G. Welgus (1995).** Matrilysin expression by human mononuclear phagocytes and its regulation by cytokines and hormones. *Journal of Immunology*, 154 : 6484-6491.

**G. Butticè and M. Kurkinen (1993).** A Polyomavirus Enhancer A-binding protein-3 site and Ets-2 protein have a major role in the 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate response of the human stromelysin gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 268 : 7196-7204.

**G. Butticè and M. Kurkinen (1994).** Oncogenes control stromelysin and collagenase gene expression. *Contributions to Nephrology*, 107 : 101-107.

**G. Butticè, S. Quinones and M. Kurkinen (1991).** The AP-1 site is required for basal expression but is not necessary for TPA-response of the human stromelysin gene. *Nucleic Acids Research*, 19 : 3723-3731.

**T. P. Calmels, V. Mattot, N. Wernert, B. Vandebunder and D. Stéhelin (1995).** Invasive tumors induce *c-ets1* transcription factor expression in adjacent stroma. *Biology of the Cell*, 84 : 53-61.

**J. Cao, H. Sato, T. Takino and M. Seiki (1995).** The C-terminal region of membrane type matrix metalloproteinase is a functional transmembrane domain required for pro-gelatinase A activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 270 : 801-805.

**X. Cao, A. Tay, G. R. Guy and Y. H. Tan (1996).** Activation and association of Stat3 with Src in v-Src-transformed cell lines. *Molecular and Cellular Biology*, 16 : 1595-1603.

**D. F. Carmichael, A. Sommer, R. C. Thompson, D. C. Anderson, C. G. Smith, H. G. Welgus and G. P. Stricklin (1986).** Primary structure and cDNA cloning of human fibroblast collagenase inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 83 : 2407-2411.

**J. P. Caron, G. Tardif, J. Martel-Pelletier, J. A. DiBattista, C. Geng and J. P. Pelletier (1996).** Modulation of matrix metalloprotease 13 (collagenase 3) gene expression in equine chondrocytes by interleukin 1 and corticosteroids. *American Journal of Veterinary Research*, 57 : 1631-1634.

**A. C. Cato and E. Wade (1996).** Molecular mechanisms of anti-inflammatory action of glucocorticoids. *Bioessays*, 18 : 371-378.

**M. Cavigelli, F. Dolfi, F. X. Claret and M. Karin (1995).** Induction of c-fos expression through JNK-mediated TCF/Elk-1 phosphorylation. *The EMBO Journal*, 14 : 5957-5964.

**T. E. Cawston (1986).** Protein inhibitors of metallo-proteinases. in "Proteinase Inhibitors", 589-610. Ed. A. J. Barrett and G. Salvesen. Amsterdam : Elsevier.

**T. E. Cawston, V. A. Curry, I. M. Clark and B. L. Hazleman (1990).** Identification of a new metalloproteinase inhibitor that forms tight-binding complexes with collagenase. *Biochemical Journal*, 269 : 183-187.

**H. A. Chapman, Jr and O. L. Stone (1984).** Co-operation between plasmin and elastase in elastin degradation by intact murine macrophages. *Biochemical Journal*, 222 : 721-728.

**B. Chatton, J. L. Bocco, J. Goetz, M. Gaire, Y. Lutz and C. Kedingner (1994).** Jun and Fos heterodimerize with ATF $\alpha$ , a member of the ATF/CREB family and modulate its transcriptional activity. *Oncogene*, 9 : 375-385.

**J. H. Chen, S. Jeha and T. Oka (1993a).** Negative regulatory elements in the human ETS1 gene promoter. *Oncogene*, 8 : 133-139.

**J. H. Chen and C. D. Wright (1993).** PEA3, Oct 1 and Oct 2 positively regulate the human ETS1 promoter. *Oncogene*, 8 : 3375-3383.

**R. H. Chen, C. Abate and J. Blenis (1993b).** Phosphorylation of the c-Fos transrepression domain by mitogen-activated protein kinase and 90-kDa ribosomal S6 kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 90 : 10952-10956.

**M. P. Chenard, L. O'Siorain, S. Shering, N. Rouyer, Y. Lutz, C. Wolf, P. Basset, J. P. Bellocq and M. J. Duffy (1996).** High levels of stromelysin-3 correlate with poor prognosis in patients with breast carcinoma. *International Journal of Cancer*, 69 : 448-451.

**L. Chesler, D. W. Golde, N. Bersch and M. D. Johnson (1995).** Metalloproteinase inhibition and erythroid potentiation are independent activities of tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *Blood*, 86 : 4506-4515.

**J. C. Chrivia, R. P. Kwok, N. Lamb, M. Hagiwara, M. R. Montminy and R. H. Goodman (1993).** Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature*, 365 : 855-859.

**C. C. Chua and B. H. Chua (1990).** Tumor necrosis factor-alpha induces mRNA for collagenase and TIMP in human skin fibroblasts. *Connective Tissue Research*, 25 : 161-170.

**S. Chubinskaya, K. Huch, K. Mikecz, G. Cs-Szabo, K. A. Hasty, K. E. Kuettner and A. A. Cole (1996).** Chondrocyte matrix metalloproteinase-8 : up-regulation of neutrophil collagenase by interleukin-1 beta in human cartilage from knee and ankle joints. *Laboratory Investigation*, 74 : 232-240.

**A. M. Chumakov, D. L. Chen and E. A. Chumakova (1993).** Localization of the c-ets-2 transactivation domain. *Journal of Virology*, 67 : 2421-2425.

**P. Coffe, M. de Jonge, A. Mettouchi, B. Binetruy, J. Ghysdael and W. Kruijer (1994).** junB promoter regulation : Ras mediated transactivation by c-Ets-1 and c-Ets-2. *Oncogene*, 9 : 911-921.

**P. Coffe, C. Luticken, A. van Puijenbroek, M. Klop de Jonge, F. Horn and W. Kruijer (1995).** Transcriptional regulation of the junB promoter : analysis of STAT-mediated signal transduction. *Oncogene*, 10 : 985-994.

**D. R. Cohen, P. C. Ferreira, R. Gantz, B. R. Franza, Jr and T. Curran (1989).** The product of a fos-related gene, fra-1, binds cooperatively to the AP-1 site with Jun : transcription factor AP-1 is comprised of multiple protein complexes. *Genes and Development*, 3 : 173-184.

**M. Conese and F. Blasi (1995).** The urokinase/urokinase-receptor system and cancer invasion. *Baillieres Clinical Haematology*, 8 : 365-389.

**T. J. Connolly, J. C. Clohisy, J. S. Shilt, K. D. Bergman, N. C. Partridge and C. O. Quinn (1994).** Retinoic acid stimulates interstitial collagenase messenger ribonucleic acid in osteosarcoma cells. *Endocrinology*, 135 : 2542-2548.

**J. Cossins, T. J. Dudgeon, G. Catlin, A. J. Gearing and J. M. Clements (1996).** Identification of MMP-18, a putative novel human matrix metalloproteinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 228 : 494-498.

**L. M. Coussens and Z. Werb (1996).** Matrix metalloproteinases and the development of cancer. *Chemistry and Biology*, 3 : 895-904.

**T. Crabbe, J. P. O'Connell, B. J. Smith and A. J. Docherty (1994a).** Reciprocated matrix metalloproteinase activation : a process. *Biochemistry*, 33 : 14419-14425.

**T. Crabbe, B. Smith, J. O'Connell and A. Docherty (1994b).** Human progelatinase A can be activated by matrilysin. *FEBS Letters*, 345 : 14-16.

**P. Crépieux, J. Coll and D. Stéhelin (1994).** The Ets Family of Proteins : Weak Modulators of Gene Expression in Quest for Transcriptional Partners. *Critical Reviews in Oncogenesis*, 5 : 615-638.

**T. Curran and P. K. Vogt (1992).** in "Transcriptional Regulation", 797-831. Ed. S. L. McKnight and K. R. Yamamoto. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press.

**V. A. Curry, I. M. Clark, H. Bigg and T. E. Cawston (1992).** Large inhibitor of metalloproteinases (LIMP) contains tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2 bound to 72,000-M(r) progelatinase. *Biochemical Journal*, 285 : 143-147.

**V. Dalet-Fumeron, N. Guinec and M. Pagano (1993).** In vitro activation of pro-cathepsin B by three serine proteinases : leucocyte elastase, cathepsin G, and the urokinase-type plasminogen activator. *FEBS Letters*, 332 : 251-254.

**P. B. Dallas, P. Yaciuk and E. Moran (1997).** Characterization of monoclonal antibodies raised against p300 : both p300 and CBP are present in intracellular TBP complexes. *Journal of Virology*, 71 : 1726-1731.

**C. Damsky, P. Tremble and Z. Werb (1992).** Signal transduction via the fibronectin receptor : do integrins regulate matrix remodeling? *Matrix. Supplement*, 1 : 184-191.

**J. E. Darnell, Jr, I. M. Kerr and G. R. Stark (1994).** Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*, 264 : 1415-1421.

**D. de Cesare, D. Vallone, A. Caracciolo, P. Sassone-Corsi, C. Nerlov and P. Verde (1995).** Heterodimerization of c-Jun with ATF-2 and c-Fos is required for positive and negative regulation of the human urokinase enhancer. *Oncogene*, 11 : 365-376.

**R. P. de Groot, J. Auwerx, M. Karperien, B. Staels and W. Kruijer (1991a).** Activation of junB by PKC and PKA signal transduction through a novel cis-acting element. *Nucleic Acids Research*, 19 : 775-781.

**R. P. de Groot, M. Karperien, C. Pals and W. Kruijer (1991b).** Characterization of the mouse junD promoter--high basal level activity due to an octamer motif. *The EMBO Journal*, 10 : 2523-2532.

**Y. A. DeClerck, M. I. Darville, Y. Eeckhout and G. G. Rousseau (1994).** Characterization of the promoter of the gene encoding human tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2). *Gene*, 139 : 185-191.

**Y. A. DeClerck and S. Imren (1994).** Protease inhibitors : role and potential therapeutic use in human cancer. *European Journal of Cancer*, 30A : 2170-2180.

**Y. A. DeClerck and W. E. Laug (1996).** Cooperation between matrix metalloproteinases and the plasminogen activator-plasmin system in tumor progression. *Enzyme and Protein*, 49 : 72-84.

**T. Deng and M. Karin (1993).** JunB differs from c-Jun in its DNA-binding and dimerization domains, and represses c-Jun by formation of inactive heterodimers. *Genes and Development*, 7 : 479-490.

**T. Deng and M. Karin (1994).** c-Fos transcriptional activity stimulated by H-Ras-activated protein kinase distinct from JNK and ERK. *Nature*, 371 : 171-175.

**D. T. Denhardt, B. Feng, D. R. Edwards, E. T. Cocuzzi and U. M. Malyankar (1993).** Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP, aka EPA) : structure, control of expression and biological functions. *Pharmacology and Therapeutics*, 59 : 329-341.

**B. Derijard, M. Hibi, I. H. Wu, T. Barrett, B. Su, T. Deng, M. Karin and R. J. Davis (1994).** JNK1 : a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell*, 76 : 1025-1037.

**P. J. Deutsch, J. P. Hoeffler, J. L. Jameson and J. F. Habener (1988).** Cyclic AMP and phorbol ester-stimulated transcription mediated by similar DNA elements that bind distinct proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 85 : 7922-7926.

**P. Dhordain, F. Dewitte, X. Desbiens, D. Stéhelin and M. Duterque-Coquillaud (1995).** Mesodermal expression of the chicken *erg* gene associated with precartilaginous condensation and cartilage differentiation. *Mechanisms of Development*, 50 : 17-28.

**J. A. DiBattista, J. P. Pelletier, M. Zafarullah, N. Fujimoto, K. Obata and J. Martel-Pelletier (1995).** Coordinate regulation of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinase expression in human synovial fibroblasts. *Journal of Rheumatology. Supplement*, 43 : 123-128.

**P. Dobrazanski, T. Noguchi, K. Kovary, C. A. Rizzo, P. S. Lazo and R. Bravo (1991).** Both products of the *fosB* gene, FosB and its short form, FosB/SF, are transcriptional activators in fibroblasts. *Molecular and Cellular Biology*, 11 : 5470-5478.

**A. J. Docherty, A. Lyons, B. J. Smith, E. M. Wright, P. E. Stephens, T. J. Harris, G. Murphy and J. J. Reynolds (1985).** Sequence of human tissue

inhibitor of metalloproteinases and its identity to erythroid-potentiating activity. *Nature*, 318 : 66-69.

**L. W. Donaldson, J. M. Petersen, B. J. Graves and L. P. McIntosh (1996).** Solution structure of the ETS domain from murine Ets-1 : a winged helix-turn-helix DNA binding motif. *The EMBO Journal*, 15 : 125-134.

**J. C. Dorsman, B. M. Hagmeyer, J. Veenstra, P. Elfferich, N. Nabben, A. Zantema and A. J. van der Eb (1995).** The N-terminal region of the adenovirus type 5 E1A proteins can repress expression of cellular genes via two distinct but overlapping domains. *Journal of Virology*, 69 : 2962-2967.

**J. C. Dorsman, A. F. Teunisse, A. Zantema and A. J. van der Eb (1997).** The adenovirus 12 E1A proteins can bind directly to proteins of the p300 transcription co-activator family, including the CREB-binding protein CBP and p300. *Journal of General Virology*, 78 : 423-426.

**M. Duchesne, F. Schweighoffer, F. Parker, F. Clerc, Y. Frobort, M. N. Thang and B. Tocque (1993).** Identification of the SH3 domain of GAP as an essential sequence for Ras-GAP-mediated signaling. *Science*, 259 : 525-528.

**H. Dudek, R. V. Tantravahi, V. N. Rao, E. S. P. Reddy and E. P. Reddy (1992).** Myb and Ets proteins cooperate in transcriptional activation of the mim-1 promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 89 : 1291-1295.

**M. R. Duncan and B. Berman (1989).** Differential regulation of collagen, glycosaminoglycan, fibronectin, and collagenase activity production in cultured human adult dermal fibroblasts by interleukin 1-alpha and beta and tumor necrosis factor-alpha and beta. *Journal of Investigative Dermatology*, 92 : 699-706.

**M. Duterque-Coquillaud, C. Niel, S. Plaza and D. Stéhelin (1993).** New human erg isoforms generated by alternative splicing are transcriptional activators. *Oncogene*, 8 : 1865-1873.

**H. F. Dvorak (1986).** Tumors : wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *New England Journal of Medicine*, 315 : 1650-1659.

**W. S. Dynan and R. Tjian (1983).** The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell*, 35 : 79-87.

**R. Eckner, M. E. Ewen, D. Newsome, M. Gerdes, J. A. DeCaprio, J. B. Lawrence and D. M. Livingston (1994).** Molecular cloning and functional analysis of

the adenovirus E1A-associated 300-kD protein (p300) reveals a protein with properties of a transcriptional adaptor. *Genes and Development*, 8 : 869-884.

**D. R. Edwards, K. J. Leco, P. P. Beaudry, P. W. Atadja, C. Veillette and K. T. Riabowol (1996).** Differential effects of transforming growth factor-beta 1 on the expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in young and old human fibroblasts. *Experimental Gerontology*, 31 : 207-223.

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

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

**Y. Eeckhout and G. Vaes (1977).** Further studies on the activation of procollagenase, the latent precursor of bone collagenase. Effects of lysosomal cathepsin B, plasmin and kallikrein, and spontaneous activation. *Biochemical Journal*, 166 : 21-31.

**M. Emi, T. Katagiri, Y. Harada, H. Saito, J. Inazawa, I. Ito, F. Kasumi and Y. Nakamura (1993).** A novel metalloprotease/disintegrin-like gene at 17q21.3 is somatically rearranged in two primary breast cancers. *Nature Genetics*, 5 : 151-157.

**M. R. Emmert-Buck, M. J. Roth, Z. Zhuang, E. Campo, J. Rozhin, B. F. Sloane, L. A. Liotta and W. G. Stetler-Stevenson (1994).** Increased gelatinase A (MMP-2) and cathepsin B activity in invasive tumor regions of human colon cancer samples. *American Journal of Pathology*, 145 : 1285-1290.

**G. Engel, K. Heselmeyer, G. Auer, M. Backdahl, E. Eriksson and S. Linder (1994).** Correlation between stromelysin-3 mRNA level and outcome of human breast cancer. *International Journal of Cancer*, 58 : 830-835.

**K. Engeland, N. C. Andrews and B. Mathey-Prevot (1995).** Multiple proteins interact with the nuclear inhibitory protein repressor element in the human interleukin-3 promoter. *The Journal of Biological Chemistry*, 270 : 24572-24579.

**B. Ensoli, R. Gendelman, P. Markham, V. Fiorelli, S. Colombini, M. Raffeld, A. Cafaro, H. K. Chang, J. N. Brady and R. C. Gallo (1994).** Synergy between basic fibroblast growth factor and HIV-1 Tat protein in induction of Kaposi's sarcoma. *Nature*, 371 : 674-680.

**C. Fisher, S. Gilbertson-Beadling, E. A. Powers, G. Petzold, R. Poorman and M. A. Mitchell (1994).** Interstitial collagenase is required for angiogenesis in vitro. *Developmental Biology*, 162 : 499-510.

**R. J. Fisher, S. Koizumi, A. Kondoh, J. M. Mariano, G. Mavrothalassitis, N. K. Bhat and T. S. Papas (1992).** Human ETS1 oncoprotein. *The Journal of Biological Chemistry*, 267 : 17957-17965.

**R. J. Fisher, G. Mavrothalassitis, A. Kondoh and T. S. Papas (1991).** High-affinity DNA-protein interactions of the cellular Ets-1 protein : the determination of the ETS binding motif. *Oncogene*, 6 : 2249-2254.

**D. A. Fishman, L. M. Bafetti and M. S. Stack (1996).** Membrane-type matrix metalloproteinase expression and matrix metalloproteinase-2 activation in primary human ovarian epithelial carcinoma cells. *Invasion Metastasis*, 16 : 150-159.

**D. Fitzsimmons, W. Hodsdon, W. Wheat, S. M. Maira, B. Wasylyk and J. Hagman (1996).** Pax-5 (BSAP) recruits Ets proto-oncogene family proteins to form functional ternary complexes on a B-cell-specific promoter. *Genes and Development*, 10 : 2198-2211.

**R. Flaumenhaft, M. Abe, P. Mignatti and D. B. Rifkin (1992).** Basic fibroblast growth factor-induced activation of latent transforming growth factor beta in endothelial cells : regulation of plasminogen activator activity. *Journal of Cellular Biochemistry*, 118 : 901-909.

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

**N. S. Foulkes, B. M. Laoide, F. Schlotter and P. Sassone-Corsi (1991).** Transcriptional antagonist cAMP-responsive element modulator (CREM) down-regulates c-fos cAMP-induced expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 88 : 5448-5452.

**J. W. Fox and J. B. Bjarnason (1995).** The reprotlysins : a family of metalloproteinases defined by snake venom and mammalian metalloproteinases. in "Zinc Metalloproteases in Health and Disease", Ed. N. Hooper. : Ellis Horwood / Simon & Schuster International Group, West Sussex, England.

**C. C. Franklin, A. V. McCulloch and A. S. Kraft (1995).** In vitro association between the Jun protein family and the general transcription factors, TBP and TFIIB. *Biochemical Journal*, 305 : 967-974.

**R. Fridman, M. Toth, D. Pena and S. Mobashery (1995).** Activation of progelatinase B (MMP-9) by gelatinase A (MMP-2). *Cancer Research*, 55 : 2548-2555.

**S. M. Frisch and J. H. Morisaki (1990).** Positive and negative transcriptional elements of the human type IV collagenase gene. *Molecular and Cellular Biology*, 10 : 6524-6532.

**S. M. Frisch, R. Reich, I. E. Collier, L. T. Genrich, G. Martin and G. I. Goldberg (1990).** Adenovirus E1A represses protease gene expression and inhibits metastasis of human tumor cells. *Oncogene*, 5 : 75-83.

**S. M. Frisch and H. E. Ruley (1987).** Transcription from the stromelysin promoter is induced by interleukin-1 and repressed by dexamethasone. *The Journal of Biological Chemistry*, 262 : 16300-16304.

**Y. Fujimura, H. Yamamoto, F. Hamazato and M. Nozaki (1994).** One of two Ets-binding sites in the cytokeratin EndoA enhancer is essential for enhancer activity and binds to Ets-2 related proteins. *Nucleic Acids Research*, 22 : 613-618.

**S. Fujiwara, R. Fisher, N. K. Bhat, S. Moreno Diaz de la Espina and T. S. Papas (1988).** A short-lived nuclear phosphoprotein encoded by the human *ets-2* proto-oncogene is stabilized by activation of protein kinase C. *Molecular and Cellular Biology*, 8 : 4700-4706.

**S. Gack, R. Vallon, J. Schmidt, A. Grigoriadis, J. Tuckermann, J. Schenkel, H. Weiher, E. F. Wagner and P. Angel (1995).** Expression of interstitial collagenase during skeletal development of the mouse is restricted to osteoblast-like cells and hypertrophic chondrocytes. *Cell Growth and Differentiation*, 6 : 759-767.

**M. Gaire, Z. Magbanua, S. McDonnell, L. McNeil, D. H. Lovett and L. M. Matrisian (1994).** Structure and expression of the human gene for the matrix metalloproteinase matrilysin. *The Journal of Biological Chemistry*, 269 : 2032-2040.

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

**A. N. Garratt and M. J. Humphries (1995).** Recent insights into ligand binding, activation and signalling by integrin adhesion receptors. *Acta Anatomica*, 154 : 34-45.

**J. C. Gasson, D. W. Golde, S. E. Kaufman, C. A. Westbrook, R. M. Hewick, R. J. Kaufman, G. G. Wong, P. A. Temple, A. C. Leary, E. L.**

**Brown et al. (1985).** Molecular characterization and expression of the gene encoding human erythroid-potentiating activity. *Nature*, 315 : 768-771.

**J. M. Gauthier, B. Bourachot, V. Doucas, M. Yaniv and F. Moreau-Gachelin (1993).** Functional interference between the Spi-1/PU.1 oncoprotein and steroid hormone or vitamin receptors. *The EMBO Journal*, 12 : 5089-5096.

**C. Gauthier-Rouviere, M. Basset, N. J. Lamb and A. Fernandez (1992).** Role of fos-AP-1 binding sequence (FAP) in the induction of c-fos expression by purified C-kinase and in c-fos down-regulation following serum induction. *Oncogene*, 7 : 363-369.

**A. J. Gearing, P. Beckett, M. Christodoulou, M. Churchill, J. Clements, A. H. Davidson, A. H. Drummond, W. A. Galloway, R. Gilbert, J. L. Gordon et al. (1994).** Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases. *Nature*, 370 : 555-557.

**A. J. Gearing, P. Beckett, M. Christodoulou, M. Churchill, J. M. Clements, M. Crimmin, A. H. Davidson, A. H. Drummond, W. A. Galloway, R. Gilbert et al. (1995).** Matrix metalloproteinases and processing of pro-TNF-alpha. *Journal of Leukocyte Biology*, 57 : 774-777.

**A. Gégonne, R. Bosselut, R. A. Bailly and J. Ghysdael (1993).** Synergistic activation of the HTLV1 LTR Ets-responsive region by transactivation factors Ets1 and Sp1. *The EMBO Journal*, 12 : 1169-1178.

**R. Gentz, F. J. 3d Rauscher, C. Abate and T. Curran (1989).** Parallel association of Fos and Jun leucine zippers juxtaposes DNA binding domains. *Science*, 243 : 1695-1699.

**J. Ghysdael, A. Gégonne, P. Pognonec, D. Dernis, D. Leprince and D. Stéhelin (1986).** Identification and preferential expression in thymic and bursal lymphocytes of a c-ets oncogene-encoded Mr 54,000 cytoplasmic protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 83 : 1714-1718.

**N. S. Gibran, F. F. Isik, D. M. Heimbach and D. Gordon (1994).** Basic fibroblast growth factor in the early human burn wound. *Journal of Surgical Research*, 56 : 226-234.

**K. Giese, C. Kingsley, J. R. Kirschner and R. Grosschedl (1995).** Assembly and function of a TCR $\alpha$  enhancer complex is dependant on LEF-1-induced DNA bending and multiple protein-protein interactions. *Genes and Development*, 9 : 995-1008.

**H. Gille, M. Kortenjann, O. Thomae, C. Moomaw, C. Slaughter, M. H. Cobb and P. E. Shaw (1995).** ERK phosphorylation potentiates Elk-1-mediated ternary complex formation and transactivation. *The EMBO Journal*, 14 : 951-962.

**F. Gilles, M. B. Raes, D. Stéhelin, B. Vandebunder and V. Fafeur (1996).** The c-ets-1 proto-oncogene is a new early-response gene differentially regulated by cytokines and growth factors in human fibroblasts. *Experimental Cell Research*, 222 : 370-378.

**D. Gius, X. M. Cao, F. J. 3d Rauscher, D. R. Cohen, T. Curran and V. P. Sukhatme (1990).** Transcriptional activation and repression by Fos are independent functions : the C terminus represses immediate-early gene expression via CArG elements. *Molecular and Cellular Biology*, 10 : 4243-4255.

**J. N. Glover and S. C. Harrison (1995).** Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-c-Jun bound to DNA. *Nature*, 373 : 257-261.

**K. Gohji, N. Fujimoto, A. Fujii, T. Komiyama, J. Okawa and M. Nakajima (1996).** Prognostic significance of circulating matrix metalloproteinase-2 to tissue inhibitor of metalloproteinases-2 ratio in recurrence of urothelial cancer after complete resection. *Cancer Research*, 56 : 3196-3198.

**G. I. Goldberg, A. Strongin, I. E. Collier, L. T. Genrich and B. L. Marmer (1992).** Interaction of 92-kDa type IV collagenase with the tissue inhibitor of metalloproteinases prevents dimerization, complex formation with interstitial collagenase, and activation of the proenzyme with stromelysine. *The Journal of Biological Chemistry*, 267 : 4583-4591.

**Y. Goldberg, M. Treier, J. Ghysdael and D. Bohmann (1994).** Repression of AP-1-stimulated transcription by c-Ets-1. *The Journal of Biological Chemistry*, 269 : 16566-16573.

**C. H. Graham (1997).** Effect of transforming growth factor-beta on the plasminogen activator system in cultured first trimester human cytotrophoblasts. *Placenta*, 18 : 137-143.

**P. A. Grant, C. B. Thompson and S. Pettersson (1995).** IgM receptor-mediated transactivation of the IgH 3' enhancer couples a novel Elf-1-AP-1 protein complex to the developmental control of enhancer function. *The EMBO Journal*, 14 : 4501-4513.

**T. Graubert, J. Johnston and N. Berliner (1993).** Cloning and expression of the cDNA encoding mouse neutrophil gelatinase : demonstration of coordinate secondary granule protein gene expression during terminal neutrophil maturation. *Blood*, 82 : 3192-3197.

**M. E. Greenberg, M. A. Thompson and M. Sheng (1992).** Calcium regulation of immediate early gene transcription. *Journal of Physiology, Paris*, 86 : 99-108.

**J. Greene, M. Wang, Y. E. Liu, L. A. Raymond, C. Rosen and Y. E. Shi (1996).** Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4. *The Journal of Biological Chemistry*, 271 : 30375-30380.

**F. Grinnell (1994).** Fibroblasts, myofibroblasts, and wound contraction. *The Journal of Cell Biology*, 124 : 401-404.

**J. Gross and C. M. Lapière (1962).** Collagenolytic activity in amphibian tissues : a tissue culture assay. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 54 : 1197-1204.

**W. Gu, X. L. Shi and R. G. Roeder (1997).** Synergistic activation of transcription by CBP and p53. *Nature*, 387 : 819-823.

**T. Gudi, I. Huvar, M. Meinecke, S. M. Lohmann, G. R. Boss and R. B. Pilz (1996).** Regulation of gene expression by cGMP-dependent protein kinase. Transactivation of the c-fos promoter. *The Journal of Biological Chemistry*, 271 : 4597-4600.

**E. Guerin, M. G. Ludwig, P. Basset and P. Anglard (1997).** Stromelysin-3 induction and interstitial collagenase repression by retinoic acid. Therapeutical implication of receptor-selective retinoids dissociating transactivation and AP-1-mediated transrepression. *The Journal of Biological Chemistry*, 272 : 11088-11095.

**N. Guinec, V. Dalet-Fumeron and M. Pagano (1993).** "In vitro" study of basement membrane degradation by the cysteine proteinases, cathepsins B, B-like and L. Digestion of collagen IV, laminin, fibronectin, and release of gelatinase activities from basement membrane fibronectin. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, 374 : 1135-1146.

**R. Gum, E. Lengyel, J. Juarez, J. H. Chen, H. Sato, M. Seiki and D. Boyd (1996).** Stimulation of 92-kDa gelatinase B promoter activity by ras is mitogen-activated protein kinase kinase 1-independent and requires multiple transcription factor binding sites including closely spaced PEA3/ets and AP-1 sequences. *The Journal of Biological Chemistry*, 271 : 10672-10680.

**S. Gupta, D. Campbell, B. Derijard and R. J. Davis (1995).** Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science*, 267 : 389-393.

**A. Gutman and B. Wasylyk (1990).** The collagenase gene promoter contains a TPA and oncogene-responsive unit encompassing the PEA3 and AP1 binding sites. *The EMBO Journal*, 9 : 2241-2246.

**A. Gutman and B. Wasylyk (1991).** Nuclear targets for transcription regulation by oncogenes. *Trends In Genetics*, 7 : 49-54.

**C. Hagemeier, A. J. Bannister, A. Cook and T. Kouzarides (1993).** The activation domain of transcription factor PU.1 binds the retinoblastoma (RB) protein and the transcription factor TFIID *in vitro* : RB shows sequence similarity to TFIID and TFIIB. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 90 : 1580-1584.

**J. Hagman and R. Grosschedl (1992).** An inhibitory carboxy-terminal domain in Ets-1 and Ets-2 mediates differential binding of ETS family factors to promoter sequences of mb-1 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 89 : 8889-8893.

**B. M. Hagemeyer, H. Konig, I. Herr, R. Offringa, A. Zantema, A. J. van der Eb, P. Herrlich and P. Angel (1993).** Adenovirus E1A negatively and positively modulates transcription of AP-1 dependent genes by dimer-specific regulation of the DNA binding and transactivation activities of Jun. *The EMBO Journal*, 12 : 3559-3572.

**E. Hahnel, J. M. Harvey, R. Joyce, P. D. Robbins, G. F. Sterrett and R. Hahnel (1993).** Stromelysin-3 expression in breast cancer biopsies : clinico-pathological correlations. *International Journal of Cancer*, 55 : 771-774.

**T. Hai and T. Curran (1991).** Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 88 : 3720-3724.

**J. A. Hamilton, D. S. Piccoli, T. Leizer, D. M. Butler, M. Croatto and A. K. Royston (1991).** Transforming growth factor beta stimulates urokinase-type plasminogen activator and DNA synthesis, but not prostaglandin E2 production, in human synovial fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 88 : 7180-7184.

**A. L. Hampton, A. R. Butt, S. C. Riley and L. A. Salamonsen (1995).** Tissue inhibitors of metalloproteinases in endometrium of ovariectomized steroid-treated ewes and during the estrous cycle and early pregnancy. *Biology of Reproduction*, 53 : 302-311.

**R. Hanemaaijer, P. Koolwijk, L. le Clercq, W. J. de Vree and V. W. van Hinsbergh (1993).** Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vein and microvascular endothelial cells. Effects of tumour necrosis factor alpha, interleukin 1 and phorbol ester. *Biochemical Journal*, 296 : 803-809.

**K. L. Hawker, J. K. Vass and B. W. Ozanne (1996).** Isolation of novel, transcriptionally active AP-1 binding sites : implications for cellular transformation. *Oncogene*, 13 : 283-292.

**T. Hayakawa, J. Kishi and Y. Nakanishi (1992a).** Salivary gland morphogenesis : possible involvement of collagenase. *Matrix. Supplement*, 1 : 344-351.

**T. Hayakawa, K. Yamashita, K. Tanzawa, E. Uchijima and K. Iwata (1992b).** Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells. A possible new growth factor in serum. *FEBS Letters*, 298 : 29-32.

**C. S. HE, S. M. Wilhelm, A. P. Pentland, B. L. Marmer, G. A. Grant, A. Z. Eisen and G. I. Goldberg (1989).** Tissue cooperation in a proteolytic cascade activating human interstitial collagenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 86 : 2632-2636.

**J. Heino (1996).** Biology of tumor cell invasion : interplay of cell adhesion and matrix degradation. *International Journal of Cancer*, 65 : 717-722.

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

**K. Helin, E. D. Harlow and A. Fattaey (1993).** Inhibition of E2F-1 transactivation by direct binding of the retinoblastoma protein. *Molecular and Cellular Biology*, 13 : 6501-6508.

**R. M. Hembry, G. Murphy, T. E. Cawston, J. T. Dingle and J. J. Reynolds (1986).** Characterization of a specific antiserum for mammalian collagenase from several species : immunolocalization of collagenase in rabbit chondrocytes and uterus. *Journal of Cell Science*, 81 : 105-123.

**K. J. Heppner, L. M. Matrisian, R. A. Jensen and W. H. Rodgers (1996).** Expression of most matrix metalloproteinase family members in breast cancer represents a tumor-induced host response. *American Journal of Pathology*, 49 : 273-282.

**H. R. Herschman (1991).** Primary response genes induced by growth factors and tumor promoters. *Annual Review of Biochemistry*, 60 : 281-319.

**L. Herszenyi, M. Plebani, P. Carraro, M. De Paoli, G. Roveroni, M. Rugge, R. Cardin, R. Naccarato and F. Farinati (1995).** Role and behavior of cathepsin B and cathepsin L in gastric cancer. *Orvosi Hetilap*, 136 : 1315-1318.

**F. Higashino, K. Yoshida, T. Noumi, M. Seiki and K. Fujinaga (1995).** Ets-related protein E1A-F can activate three different matrix metalloproteinase gene promoters. *Oncogene*, 10 : 1461-1463.

**B. P. Himelstein and R. J. Muschel (1996).** Induction of matrix metalloproteinase 9 expression in breast carcinoma cells by a soluble factor from fibroblasts. *Clinical and Experimental Metastasis*, 14 : 197-208.

**D. R. Hodge, L. Robinson, D. Watson, J. Lautenberger, X. K. Zhang, M. Venanzoni and A. Seth (1996).** Interaction of ETS-1 and ERGB/FLI-1 proteins with DNA is modulated by spacing between multiple binding sites as well as phosphorylation. *Oncogene*, 12 : 11-18.

**N. M. Hooper (1994).** Families of zinc metalloproteases. *FEBS Letters*, 354 : 1-6.

**A. E. Horvai, L. Xu, E. Korzus, G. Brard, D. Kalafus, T. M. Mullen, D. W. Rose, M. G. Rosenfeld and C. K. Glass (1997).** Nuclear integration of JAK/STAT and Ras/AP-1 signaling by CBP and p300. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 94 : 1074-1079.

**K. A. Houck, D. W. Leung, A. M. Rowland, J. Winer and N. Ferrara (1992).** Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *The Journal of Biological Chemistry*, 267 : 26031-26037.

**E. W. Howard and M. J. Banda (1991).** Binding of tissue inhibitor of metalloproteinases 2 to two distinct sites on human 72-kDa gelatinase. Identification of a stabilization site. *The Journal of Biological Chemistry*, 266 : 17972-17977.

**E. W. Howard, E. C. Bullen and M. J. Banda (1991).** Regulation of the autoactivation of human 72-kDa progelatinase by tissue inhibitor of metalloproteinases-2. *The Journal of Biological Chemistry*, 266 : 13064-13069.

**J. C. Hsu, D. E. Cressman and R. Taub (1993).** Promoter-specific trans-activation and inhibition mediated by JunB. *Cancer Research*, 53 : 3789-3794.

**W. Hsu, T. K. Kerppola, P. L. Chen, T. Curran and K. S. Chen (1994).** Fos and Jun repress transcription activation by NF-IL6 through association at the basic zipper region. *Molecular and Cellular Biology*, 14 : 268-276.

**D. A. Hughes, I. P. Fraser and S. Gordon (1995).** Murine macrophage scavenger receptor : in vivo expression and function as receptor for macrophage adhesion in lymphoid and non-lymphoid organs. *European Journal of Immunology*, 25 : 466-473.

**P. Huhtala, L. T. Chow and K. Tryggvason (1990).** Structure of the human type IV collagenase gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 265 : 11077-11082.

**P. Huhtala, M. J. Humphries, J. B. McCarthy, P. M. Tremble, Z. Werb and C. H. Damsky (1995).** Cooperative signaling by alpha 5 beta 1 and alpha 4 beta 1 integrins regulates metalloproteinase gene expression in fibroblasts adhering to fibronectin. *The Journal of Cell Biology*, 129 : 867-879.

**K. Imada, A. Ito, Y. Itoh, H. Nagase and Y. Mori (1994).** Progesterone increases the production of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 in rabbit uterine cervical fibroblasts. *FEBS Letters*, 341 : 109-112.

**K. Imai, E. Ohuchi, T. Aoki, H. Nomura, Y. Fujii, H. Sato, M. Seiki and Y. Okada (1996).** Membrane-type matrix metalloproteinase 1 is a gelatinolytic enzyme and is secreted in a complex with tissue inhibitor of metalloproteinases 2. *Cancer Research*, 56 : 2707-2710.

**K. Imai, Y. Yokohama, I. Nakanishi, E. Ohuchi, Y. Fujii, N. Nakai and Y. Okada (1995).** Matrix metalloproteinase 7 (matrilysin) from human rectal carcinoma cells. Activation of the precursor, interaction with other metalloproteinases and enzymatic properties. *The Journal of Biological Chemistry*, 270 : 6691-6697.

**M. Ishibashi, A. Ito, K. Sakyo and Y. Mori (1987).** Procollagenase activator produced by rabbit uterine cervical fibroblasts. *Biochemical Journal*, 241 : 527-534.

**N. Ishiguro, T. Ito, K. Obata, N. Fujimoto and H. Iwata (1996).** Determination of stromelysin-1, 72 and 92 kDa type IV collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1), and TIMP-2 in synovial fluid and serum from patients with rheumatoid arthritis. *Journal of Rheumatology*, 23 : 1599-1604.

**Y. Itoh, S. Binner and H. Nagase (1995).** Steps involved in activation of the complex of pro-matrix metalloproteinase 2 (progelatinase A) and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2 by 4-aminophenylmercuric acetate. *Biochemical Journal*, 308 : 645-651.

**Y. Itoh and H. Nagase (1995).** Preferential inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 that is bound to the precursor of matrix metalloproteinase 9 (progelatinase B) by human neutrophil elastase. *The Journal of Biological Chemistry*, 270 : 16518-16521.

**C. Iwasaka, K. Tanaka, M. Abe and Y. Sato (1996).** Ets-1 regulates angiogenesis by inducing the expression of urokinase-type plasminogen activator and matrix metalloproteinase-1 and the migration of vascular endothelial cells. *Journal of Cellular Physiology*, 169 : 522-531.

**H. Iwata, S. Kobayashi, H. Iwase, A. Masaoka, N. Fujimoto and Y. Okada (1996).** Production of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human breast carcinomas. *Japanese Journal of Cancer Research*, 87 : 602-611.

**J. Jain, P. G. McCaffrey, Z. Miner, T. K. Kerppola, J. N. Lambert, G. L. Verdine, T. Curran and A. Rao (1993).** The T-cell transcription factor NFATp is a substrate for calcineurin and interacts with Fos and Jun. *Nature*, 365 : 352-355.

**R. Janknecht and T. Hunter (1996).** Versatile molecular glue. *Current Biology*, 6 : 951-954.

**R. Janknecht and T. Hunter (1997).** Activation of the Sap-1a transcription factor by the c-Jun N-terminal kinase (JNK) mitogen-activated protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 272 : 4219-4224.

**R. Janknecht and A. Nordheim (1996).** Regulation of the c-fos promoter by the ternary complex factor Sap-1a and its coactivator CBP. *Oncogene*, 12 : 1961-1969.

**J. J. Jeffrey, W. T. Roswit and L. S. Ehlich (1990).** Regulation of collagenase production by steroids in uterine smooth muscle cells: an enzymatic and immunologic study. *Journal of Cellular Physiology*, 143 : 396-403.

**E. Jendraschak and E. H. Sage (1996).** Regulation of angiogenesis by SPARC and angiostatin: implications for tumor cell biology. *Seminars in Cancer Biology*, 7 : 139-146.

**W. Jiang and J. S. Bond (1992).** Families of metalloendopeptidases and their relationships. *FEBS Letters*, 312 : 110-114.

**N. Johansson, J. Westermarck, S. Leppa, L. Hakkinen, L. Koivisto, C. Lopez-Otin, J. Peltonen, J. Heino and V. M. Kahari (1997).** Collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression by HaCaT keratinocytes is enhanced by tumor necrosis factor alpha and transforming growth factor beta. *Cell Growth and Differentiation*, 8 : 243-250.

**C. Jonat, B. Stein, H. Ponta, P. Herrlich and H. J. Rahmsdorf (1992).** Positive and negative regulation of collagenase gene expression. *Matrix. Supplement*, 1 : 145-155.

**M. D. Jonsen, J. M. Petersen, Q. P. Xu and B. J. Graves (1996).** Characterization of the cooperative function of inhibitory sequences in Ets-1. *Molecular and Cellular Biology*, 16 : 2065-2073.

**C. L. Jorcyk, L. J. Garrett, I. G. Maroulakou, D. K. Watson and J. E. Green (1997).** Multiple regulatory regions control the expression of Ets-1 in the developing mouse : vascular expression conferred by intron I. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-grand)*, 43 : 211-222.

**J. Jouanneau, S. Bellusci, G. Moens and J. P. Thiery (1995).** Aspects moléculaires de l'invasion et de la métastase. *Pathologie Biologie*, 43 : 181-187.

**C. Jousset, C. Carron, A. Boureux, C. T. Quang, C. Oury, I. Dusanter-Fourt, M. Charon, J. Levin, O. Bernard and J. Ghysdael (1997).** A domain of TEL conserved in a subset of ETS proteins defines a specific oligomerization interface essential to the mitogenic properties of the TEL-PDGFR beta oncoprotein. *The EMBO Journal*, 16 : 69-82.

**T. Kallunki, T. Deng, M. Hibi and M. Karin (1996).** c-Jun can recruit JNK to phosphorylate dimerization partners via specific docking interactions. *Cell*, 87 : 929-939.

**T. Kallunki, B. Su, I. Tsigelny, H. K. Sluss, B. Derijard, G. Moore, R. Davis and M. Karin (1994).** JNK2 contains a specificity-determining region responsible for efficient c-Jun binding and phosphorylation. *Genes and Development*, 8 : 2996-3007.

**Y. Kamei, L. Xu, T. Heinzel, J. Torchia, R. Kurokawa, B. Gloss, S. C. Lin, R. A. Heyman, D. W. Rose, C. K. Glass and M. G. Rosenfeld (1996).** A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell*, 85 : 403-414.

**N. Karagianni and N. Tsawdaroglou (1994).** The c-fos serum response element (SRE) confers negative response to glucocorticoids. *Oncogene*, 9 : 2327-2334.

**M. Karin (1995).** The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *The Journal of Biological Chemistry*, 270 : 16483-16486.

**H. Kataoka, R. DeCastro, S. Zucker and C. Biswas (1993).** Tumor cell-derived collagenase-stimulatory factor increases expression of interstitial collagenase, stromelysin, and 72-kDa gelatinase. *Cancer Research*, 53 : 3154-3158.

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

**D. Keppler and B. F. Sloane (1996).** Cathepsin B : multiple enzyme forms from a single gene and their relation to cancer. *Enzyme and Protein*, 49 : 94-105.

**T. K. Kerppola (1996).** Fos and Jun bend the AP-1 site : effects of probe geometry on the detection of protein-induced DNA bending. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 93 : 10117-10122.

**T. M. Kerppola and T. Curran (1993).** Selective DNA bending by a variety of bZIP proteins. *Molecular and Cellular Biology*, 13 : 5479-5489.

**L. D. Kerr, D. B. Miller and L. M. Matrisian (1990).** TGF- $\beta$ 1 inhibition of transin/stromelysin gene expression is mediated through a Fos binding sequence. *Cell*, 61 : 267-278.

**L. D. Kerr, N. E. Olashaw and L. M. Matrisian (1988).** Transforming growth factor beta 1 and cAMP inhibit transcription of epidermal growth factor- and oncogene-induced transin RNA. *The Journal of Biological Chemistry*, 263 : 16999-17005.

**O. J. Keski, J. Lohi, A. Tuuttila, K. Tryggvason and T. Vartio (1992).** Proteolytic processing of the 72,000-Da type IV collagenase by urokinase plasminogen activator. *Experimental Cell Research*, 202 : 471-476.

**R. Khokha (1994).** Suppression of the tumorigenic and metastatic abilities of murine B16-F10 melanoma cells in vivo by the overexpression of the tissue inhibitor of the metalloproteinases-1. *Journal of the National Cancer Institute*, 86 : 299-304.

**R. Khokha and D. T. Denhardt (1989).** Matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases : a review of their role in tumorigenesis and tissue invasion. *Invasion Metastasis*, 9 : 391-405.

**H. Kikuchi, W. Shimada, T. Nonaka, S. Ueshima and S. Tanaka (1996).** Significance of serine proteinase and matrix metalloproteinase systems in the destruction of human articular cartilage. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 23 : 885-889.

**H. Kinoh, H. Sato, Y. Tsunozuka, T. Takino, A. Kawashima, Y. Okada and M. Seiki (1996).** MT-MMP, the cell surface activator of proMMP-2 (pro-gelatinase A), is expressed with its substrate in mouse tissue during embryogenesis. *Journal of Cell Science*, 109 : 953-959.

**T. Kinoshita, H. Sato, T. Takino, M. Itoh, T. Akizawa and M. Seiki (1996).** Processing of a precursor of 72-kilodalton type IV collagenase/gelatinase A by a recombinant membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *Cancer Research*, 56 : 2535-2538.

**M. Kirstein, L. Sanz, S. Quinones, J. Moscat, M. T. Diaz Meco and J. Saus (1996).** Cross-talk between different enhancer elements during mitogenic induction of the human stromelysin-1 gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 271 : 18231-18236.

**N. S. Kishnani, P. W. Staskus, T. T. Yang, F. R. Masiarz and S. P. Hawkes (1995).** Identification and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase-3 and detection of three additional metalloproteinase inhibitor activities in extracellular matrix. *Matrix Biology*, 14 : 479-488.

**I. Kitabayashi, Z. Kawakami, T. Matsuoka, R. Chiu, G. Gachelin and K. Yokoyama (1993).** Two cis-regulatory elements that mediate different signaling pathways for serum-dependent activation of the junB gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 268 : 14482-14489.

**D. E. Kleiner, Jr and W. G. Stetler-Stevenson (1993).** Structural biochemistry and activation of matrix metalloproteases. *Current Opinions in Cell Biology*, 5 : 891-897.

**D. E. Kleiner, Jr, A. Tuuttila, K. Tryggvason and W. G. Stetler-Stevenson (1993).** Stability analysis of latent and active 72-kDa type IV collagenase : the role of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2). *Biochemistry*, 32 : 1583-1592.

**V. Knauper, S. Cowell, B. Smith, C. Lopez-Otin, M. O'Shea, H. Morris, L. Zardi and G. Murphy (1997).** The Role of the C-terminal Domain of Human Collagenase-3 (MMP-13) in the Activation of Procollagenase-3, Substrate Specificity, and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase Interaction. *The Journal of Biological Chemistry*, 272 : 7608-7616.

**V. Knauper, G. Murphy and H. Tschesche (1996a).** Activation of human neutrophil procollagenase by stromelysin 2. *European Journal of Biochemistry*, 235 : 187-191.

**V. Knauper, S. M. Wilhelm, P. K. Seperack, Y. A. DeClerck, K. E. Langley, A. Osthues and H. Tschesche (1996b).** Direct activation of human neutrophil procollagenase by recombinant stromelysin. *Biochemistry*, 295 : 581-586.

**V. Knauper, H. Will, C. Lopez Otin, B. Smith, S. J. Atkinson, H. Stanton, R. M. Hembry and G. Murphy (1996c).** Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13) activation. Evidence that MT1-MMP (MMP-14) and gelatinase A (MMP-2) are able to generate active enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*, 271 : 17124-17131.

**H. Kolkenbrock, A. Hecker-Kia, D. Orgel, N. Ulbrich and H. Will (1997).** Activation of progelatinase A and progelatinase A / TIMP-2 complex by membrane type 2-matrix metalloproteinase. *Biological Chemistry*, 378 : 71-76.

**H. Kolkenbrock, D. Orgel, A. Hecker-Kia, W. Noack and N. Ulbrich (1991).** The complex between a tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-2) and 72-kDa progelatinase is a metalloproteinase inhibitor. *European Journal of Biochemistry*, 198 : 775-781.

**H. Konig, H. Ponta, H. J. Rahmsdorf and P. Herrlich (1992).** Interference between pathway-specific transcription factors : glucocorticoids antagonize phorbol ester-induced AP-1 activity without altering AP-1 site occupation in vivo. *The EMBO Journal*, 11 : 2241-2246.

**H. Konig, H. Ponta, U. Rahmsdorf, M. Buscher, A. Schonthal, H. J. Rahmsdorf and P. Herrlich (1989).** Autoregulation of fos : the dyad symmetry element as the major target of repression. *The EMBO Journal*, 8 : 2559-2566.

**B. Kramer, K. Wiegmann and M. Kronke (1995).** Regulation of the human TNF promoter by the transcription factor Ets. *The Journal of Biological Chemistry*, 270 : 6577-6583.

**S. Kubota, R. Fridman and Y. Yamada (1991).** Transforming growth factor-beta suppresses the invasiveness of human fibrosarcoma cells in vitro by increasing expression of tissue inhibitor of metalloprotease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 176 : 129-136.

**R. P. Kwok, J. R. Lundblad, J. C. Chrivia, J. P. Richards, H. P. Bachinger, R. G. Brennan, S. G. Roberts, M. R. Green and R. H. Goodman (1994).** Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature*, 370 : 223-226.

**M. Kylmaniemi, A. Oikarinen, K. Oikarinen and T. Salo (1996).** Effects of dexamethasone and cell proliferation on the expression of matrix metalloproteinases in human mucosal normal and malignant cells. *Journal of Dental Research*, 75 : 919-926.

**M. P. Laget, I. Callebaut, Y. de Launoit, D. Stéhelin and J. P. Mornon (1993).** Predicted common structural features of DNA-binding domains from Ets, Myb and HMG transcription factors. *Nucleic Acids Research*, 21 : 5987-5996.

**J. S. Lai and W. Herr (1992).** Ethidium bromide provides a simple tool for identifying genuine DNA-independent protein associations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 89 : 6958-6962.

**E. Lalli, J. S. Lee, M. Lamas, K. Tamai, E. Zazopoulos, F. Nantel, L. Penna, N. S. Foulkes and P. Sassone-Corsi (1996).** The nuclear response to cAMP : role of transcription factor CREM. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B : Biological Sciences*, 351 : 201-209.

**M. Lamas, L. Monaco, E. Zazopoulos, E. Lalli, K. Tamai, L. Penna, C. Mazzucchelli, F. Nantel, N. S. Foulkes and P. Sassone-Corsi (1996).** CREM : a master-switch in the transcriptional response to cAMP. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B : Biological Sciences*, 351 : 561-567.

**D. Landsman and M. Bustin (1993).** A signature for the HMG-1 box DNA-binding proteins. *Bioessays*, 15 : 539-546.

**T. F. Lane and E. H. Sage (1994).** The biology of SPARC, a protein that modulates cell-matrix interactions. *FASEB Journal*, 8 : 163-173.

**S. J. Langer, D. M. Bortner, M. F. Roussel, C. J. Sherr and M. C. Ostrowski (1992).** Mitogenic signaling by colony-stimulating factor 1 and ras is suppressed by the ets-2 DNA-binding domain and restored by myc overexpression. *Molecular and Cellular Biology*, 12 : 5355-5362.

**B. M. Laoide, N. S. Foulkes, F. Schlotter and P. Sassone-Corsi (1993).** The functional versatility of CREM is determined by its modular structure. *The EMBO Journal*, 12 : 1179-1191.

**H. Larjava, J. G. Lyons, T. Salo, M. Makela, L. Koivisto, H. Birkedal-Hansen, S. K. Akiyama, K. M. Yamada and J. Heino (1993).** Anti-integrin antibodies induce type IV collagenase expression in keratinocytes. *Journal of Cellular Physiology*, 157 : 190-200.

**V. Laudet, C. Niel, M. Duterque-Coquillaud, D. Leprince and D. Stéhelin (1993).** Evolution of the ets gene family. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 190 : 8-14.

**P. S. Lazo, K. Dorfman, T. Noguchi, M. G. Mattei and R. Bravo (1992).** Structure and mapping of the fosB gene. FosB downregulates the activity of the fosB promoter. *Nucleic Acids Research*, 20 : 343-350.

**D. W. Leaman, S. Pisharody, T. W. Flickinger, M. A. Commene, J. Schlessinger, I. M. Kerr, D. E. Levy and G. R. Stark (1996).** Roles of JAKs in activation of STATs and stimulation of c-fos gene expression by epidermal growth factor. *Molecular and Cellular Biology*, 16 : 369-375.

**P. Lécine, M. Algarté, P. Rameil, C. Beadling, P. Bucher, M. Nabholz and J. Imbert (1996).** Elf-1 and Stat5 bind to a critical element in a new enhancer of the human interleukin-2 receptor alpha gene (erratum : M.C.B. 17 : 2351). *Molecular and Cellular Biology*, 16 : 6829-6840.

**K. J. Leco, D. R. Edwards and G. A. Schultz (1996).** Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 is the major metalloproteinase inhibitor in the decidualizing murine uterus. *Molecular Reproduction and Development*, 45 : 458-465.

**J. S. Lee, R. H. See, T. Deng and Y. Shi (1996).** Adenovirus E1A downregulates cJun- and JunB-mediated transcription by targeting their coactivator p300. *Molecular and Cellular Biology*, 16 : 4312-4326.

**M. Lees, D. J. Taylor and D. E. Woolley (1994).** Mast cell proteinases activate precursor forms of collagenase. *European Journal of Biochemistry*, 223 : 171-177.

**O. Lefebvre, C. Regnier, M. P. Chenard, C. Wendling, P. Chambon, P. Basset and M. C. Rio (1995).** Developmental expression of mouse stromelysin-3 mRNA. *Development*, 121 : 947-955.

**V. Lefebvre, C. Peeters-Joris and G. Vaes (1990).** Modulation by interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha of production of collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinases and collagen types in differentiated and dedifferentiated articular chondrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1052 : 366-378.

**B. Lelongt, G. Trugnan, G. Murphy and P. M. Ronco (1997).** Matrix metalloproteinases MMP2 and MMP9 are produced in early stages of kidney morphogenesis but only MMP9 is required for renal organogenesis in vitro. *Journal of Cellular Biochemistry*, 136 : 1363-1373.

**E. Lengyel, R. Gum, J. Juarez, G. Clayman, M. Seiki, H. Sato and D. Boyd (1995).** Induction of M(r) 92,000 type IV collagenase expression in a squamous cell carcinoma cell line by fibroblasts. *Cancer Research*, 55 : 963-967.

**D. Leprince, M. Duterque-Coquillaud, R. P. Li, C. Henry, A. Flourens, B. Debuire and D. Stéhelin (1988).** Alternative splicing within the chicken c-ets-1 locus : implications for transduction within the E26 retrovirus of the c-ets proto-oncogene. *Journal of Virology*, 62 : 3233-3241.

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

**J. M. Lewalle, C. Munaut, B. Pichot, D. Cataldo, E. Baramova and J. M. Foidart (1995).** Plasma membrane-dependent activation of gelatinase A in human vascular endothelial cells. *Journal of Cellular Physiology*, 165 : 475-483.

**A. Lichte, H. Kolkenbrock and H. Tschesche (1996).** The recombinant catalytic domain of membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) induces activation of progelatinase A and progelatinase A complexed with TIMP-2. *FEBS Letters*, 397 : 277-282.

**F. Lim, N. Kraut, J. Frampton and T. Graf (1992).** DNA binding by c-Ets-1, but not v-Ets, is repressed by an intermolecular mechanism. *The EMBO Journal*, 11 : 643-652.

**C. Liu, E. Adamson and D. Mercola (1996a).** Transcription factor EGR-1 suppresses the growth and transformation of human HT-1080 fibrosarcoma cells by induction of transforming growth factor beta 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 93 : 11831-11836.

**C. Liu, A. Calogero, G. Ragona, E. Adamson and D. Mercola (1996b).** EGR-1, the reluctant suppression factor : EGR-1 is known to function in the regulation of growth, differentiation, and also has significant tumor suppressor activity and a mechanism involving the induction of TGF-beta1 is postulated to account for this suppressor activity. *Critical Reviews in Oncogenesis*, 7 : 101-125.

**S. K. Logan, M. J. Garabedian, C. E. Campbell and Z. Werb (1996).** Synergistic Transcriptional Activation of the Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 Promoter via Functional Interaction of AP-1 and Ets-1 Transcription Factors. *The Journal of Biological Chemistry*, 271 : 774-782.

**J. Lohi, K. Lehti, J. Westermarck, V. M. Kahari and J. Keski-Oja (1996).** Regulation of membrane-type matrix metalloproteinase-1 expression by growth factors and phorbol 12-myristate 13-acetate. *European Journal of Biochemistry*, 239 : 239-247.

**F. C. Lucibello, C. Lowag, M. Neuberg and R. Muller (1989).** Trans-repression of the mouse c-fos promoter : a novel mechanism of Fos-mediated trans-regulation. *Cell*, 59 : 999-1007.

**J. R. Lundblad, R. P. Kwok, M. E. Lurance, M. L. Harter and R. H. Goodman (1995).** Adenoviral E1A-associated protein p300 as a functional homologue of the transcriptional co-activator CBP. *Nature*, 374 : 85-88.

**J. R. MacDougall and L. M. Matrisian (1995).** Contributions of tumor and stromal matrix metalloproteinases to tumor progression, invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Review*, 14 : 351-362.

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

**K. MacLeod, D. Leprince and D. Stéhelin (1992).** The ets gene family. *Trends In Biochemical Sciences*, 17 : 251-256.

**K. L. MacNaul, N. Chartrain, M. Lark, M. J. Tocci and N. I. Hutchinson (1990).** Discoordinate expression of stromelysin, collagenase, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in rheumatoid human synovial fibroblasts. Synergistic effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha on stromelysin expression. *The Journal of Biological Chemistry*, 265 : 17238-17245.

**J. L. Magnaghi, H. Masutani, P. Robin, M. Lipinski and B. A. Harel (1996).** SRE elements are binding sites for the fusion protein EWS-FLI-1. *Nucleic Acids Research*, 24 : 1052-1058.

**S. M. Maira, J. M. Wurtz and B. Wasyluk (1996).** Net (ERP/SAP2) one of the Ras-inducible TCFs, has a novel inhibitory domain with resemblance to the helix-loop-helix motif. *The EMBO Journal*, 15 : 5849-5865.

**R. Makarewicz and G. Drewa (1996).** A possible application of cathepsin B activity determination for estimating the spread of the cervix uteri carcinoma. *Acta Biochimica Polonica*, 43 : 521-524.

**E. Maltepe, J. V. Schmidt, D. Baunoch, C. A. Bradfield and M. C. Simon (1997).** Abnormal angiogenesis and responses to glucose and oxygen deprivation in mice lacking the protein ARNT. *Nature*, 386 : 403-407.

**D. J. Mangelsdorf, C. Thummel, M. Beato, P. Herrlich, G. Schutz, K. Umesono, B. Blumberg, P. Kastner, M. Mark, P. Chambon and R. M. Evans (1995).** The nuclear receptor superfamily : the second decade. *Cell*, 83 : 835-839.

**E. Marbaix, I. Kokorine, P. Henriët, J. Donnez, P. J. Courtoy and Y. Eeckhout (1995).** The expression of interstitial collagenase in human endometrium is controlled by progesterone and by oestradiol and is related to menstruation. *Biochemical Journal*, 305 : 1027-1030.

**P. A. Marcotte, I. M. Kozan, S. A. Dorwin and J. M. Ryan (1992).** The matrix metalloproteinase pump-1 catalyzes formation of low molecular weight (pro)urokinase in cultures of normal human kidney cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 267 : 13803-13806.

**M. L. Martin, P. M. Lieberman and T. Curran (1996).** Fos-Jun dimerization promotes interaction of the basic region with TFIIE-34 and TFIIF. *Molecular and Cellular Biology*, 16 : 2110-2118.

**D. Masquillier and P. Sassone-Corsi (1992).** Transcriptional cross-talk : nuclear factors CREM and CREB bind to AP-1 sites and inhibit activation by Jun. *The Journal of Biological Chemistry*, 267 : 22460-22466.

**B. Mathey-Prevot, N. C. Andrews, H. S. Murphy, S. G. Kreissman and D. G. Nathan (1990).** Positive and negative elements regulate human interleukin 3 expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 87 : 5046-5050.

**L. M. Matrisian (1990).** Metalloproteinases and their inhibitors in the matrix remodeling. *Trends In Genetics*, 6 : 121-125.

**L. M. Matrisian (1994).** Matrix metalloproteinase gene expression. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 732 : 42-50.

**V. Mattot, M. B. Raes, P. Henriet, Y. Eeckhout, D. Stéhelin, B. Vandebunder and X. Desbiens (1995).** Expression of interstitial collagenase is restricted to skeletal tissue during mouse embryogenesis. *Journal of Cell Science*, 108 : 529-535.

**A. Mauviel (1993).** Cytokine regulation of Metalloproteinase gene expression. *Journal of Cellular Biochemistry*, 53 : 288-295.

**A. Mauviel, K. Y. Chung, A. Agarwal, K. Tamai and J. Uitto (1996).** Cell-specific induction of distinct oncogenes of the Jun family is responsible for differential regulation of collagenase gene expression by transforming growth factor-beta in fibroblasts and keratinocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 271 : 10917-10923.

**G. J. Mavrothalassitis and T. S. Papas (1991).** Positive and negative factors regulate the transcription of the ETS2 gene via an oncogene-responsive-like unit within the ETS2 promoter region. *Cell Growth and Differentiation*, 2 : 215-224.

**G. J. Mavrothalassitis, D. K. Watson and T. S. Papas (1990).** Molecular and functional characterization of the promoter of ETS2, the human c-ets-2 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 87 : 1047-1051.

**W. A. May, M. L. Gishizky, S. L. Lessnick, L. B. Lunsford, B. C. Lewis, O. Delattre, J. Zucman, G. Thomas and C. T. Denny (1993).** Ewing sarcoma 11 ;22 translocation produces a chimeric transcription factor that requires the

DNA-binding domain encoded by FLI1 for transformation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 90 : 5752-5756.

**L. R. McCabe, C. Banerjee, R. Kundu, R. J. Harrison, P. R. Dobner, J. L. Stein, J. B. Lian and G. S. Stein (1996).** Developmental expression and activities of specific fos and jun proteins are functionally related to osteoblast maturation : role of Fra-2 and Jun D during differentiation. *Endocrinology*, 137 : 4398-4408.

**S. A. McCarthy, D. Chen, B. S. Yang, R. Garcia, J. J., H. Cherwinski, X. R. Chen, M. Klagsbrun, C. A. Hauser, M. C. Ostrowski and M. McMahon (1997).** Rapid phosphorylation of Ets-2 accompanies mitogen-activated protein kinase activation and the induction of heparin-binding epidermal growth factor gene expression by oncogenic Raf-1. *Molecular and Cellular Biology*, 17 : 2401-2412.

**S. McDonnell and L. M. Matrisian (1990).** Stromelysin in tumor progression and metastasis. *Cancer Metastasis Review*, 9 : 305-319.

**B. McLaughlin and J. B. Weiss (1996).** Endothelial-cell-stimulating angiogenesis factor (ESAF) activates progelatinase A (72 kDa type IV collagenase), prostromelysin 1 and procollagenase and reactivates their complexes with tissue inhibitors of metalloproteinases : a role for ESAF in non-inflammatory angiogenesis. *Biochemical Journal*, 317 : 739-745.

**M. C. Meikle, S. Bord, R. M. Hembry and J. J. Reynolds (1995).** The synthesis of collagenase, gelatinase-A (72 kDa) and -B (95 kDa), and TIMP-1 and -2 by human osteoblasts from normal and arthritic bone. *Bone*, 17 : 255-260.

**R. Metz, A. J. Bannister, J. A. Sutherland, C. Hagemeyer, E. C. O'Rourke, A. Cook, R. Bravo and T. Kouzarides (1994a).** c-Fos-induced activation of a TATA-box-containing promoter involves direct contact with TATA-box-binding protein. *Molecular and Cellular Biology*, 14 : 6021-6029.

**R. Metz, T. Kouzarides and R. Bravo (1994b).** A C-terminal domain in FosB, absent in FosB/SF and Fra-1, which is able to interact with the TATA binding protein, is required for altered cell growth. *The EMBO Journal*, 13 : 3832-3842.

**K. Migita, K. Eguchi, Y. Kawabe, Y. Ichinose, T. Tsukada, T. Aoyagi, H. Nakamura and S. Nagataki (1996).** TNF-alpha-mediated expression of membrane-type matrix metalloproteinase in rheumatoid synovial fibroblasts. *Immunology*, 89 : 553-557.

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

**P. Mignatti and D. B. Rifkin (1996).** Plasminogen activators and matrix metalloproteinases in angiogenesis. *Enzyme and Protein*, 49 : 117-137.

**H. Y. Min, L. V. Doyle, C. R. Vitt, C. L. Zandonella, J. R. Stratton-Thomas, M. A. Shuman and S. Rosenberg (1996a).** Urokinase receptor antagonists inhibit angiogenesis and primary tumor growth in syngeneic mice. *Cancer Research*, 56 : 2428-2433.

**W. Min, S. Ghosh and P. Lengyel (1996b).** The interferon-inducible p202 protein as a modulator of transcription : inhibition of NF- $\kappa$ B, c-Fos and c-Jun activities. *Molecular and Cellular Biology*, 16 : 359-368.

**A. Minden, A. Lin, M. McMahon, C. Lange-Carter, B. Derijard, R. J. Davis, G. L. Johnson and M. Karin (1994a).** Differential activation of ERK and JNK mitogen-activated protein kinases by Raf-1 and MEKK. *Science*, 266 : 1719-1723.

**A. Minden, A. Lin, T. Smeal, B. Derijard, M. Cobb, R. Davis and M. Karin (1994b).** c-Jun N-terminal phosphorylation correlates with activation of the JNK subgroup but not the ERK subgroup of mitogen-activated protein kinases. *Molecular and Cellular Biology*, 14 : 6683-6688.

**S. Mink, U. Kerber and K. H. Klempnauer (1996).** Interaction of C/EBP $\beta$  and v-Myb is required for synergistic activation of the *mim-1* gene. *Molecular and Cellular Biology*, 16 : 1316-1325.

**W. L. Monsky, T. Kelly, C. Y. Lin, Y. Yeh, W. G. Stetler-Stevenson, S. C. Mueller and W. T. Chen (1993).** Binding and localization of M(r) 72,000 matrix metalloproteinase at cell surface invadopodia. *Cancer Research*, 53 : 3159-3164.

**D. Monté, J. L. Baert, P. A. Defossez, Y. de Launoit and D. Stéhelin (1994).** Molecular cloning and characterization of human ERM, a new member of the Ets family closely related to mouse PEA3 and ER81 transcription factors. *Oncogene*, 9 : 1397-1406.

**I. M. Morgan and G. D. Birnie (1992).** The serum response element and an AP-1/ATF sequence immediately downstream co-operate in the regulation of c-fos transcription. *Cell Proliferation*, 25 : 205-215.

**M. A. Moses, M. Marikovsky, J. W. Harper, P. Vogt, E. Eriksson, M. Klagsbrun and R. Langer (1996).** Temporal study of the activity of matrix metalloproteinases and their endogenous inhibitors during wound healing. *Journal of Cellular Biochemistry*, 60 : 379-386.

**K. S. Moulton, K. Semple, H. Wu and C. K. Glass (1994).** Cell-specific expression of the macrophage scavenger receptor gene is dependent on PU.1 and a composite AP-1/ets motif. *Molecular and Cellular Biology*, 14 : 4408-4418.

**J. M. Muller, H. W. Ziegler-Heitbrock and P. A. Baeuerle (1993).** Nuclear factor kappa B, a mediator of lipopolysaccharide effects. *Immunobiology*, 187 : 233-256.

**D. Mumberg, F. C. Lucibello, M. Schuermann and R. Muller (1991).** Alternative splicing of fosB transcripts results in differentially expressed mRNAs encoding functionally antagonistic proteins. *Genes and Development*, 5 : 1212-1223.

**K. Muraoka, K. Nabeshima, T. Murayama, C. Biswas and M. Kono (1993).** Enhanced expression of a tumor-cell-derived collagenase-stimulatory factor in urothelial carcinoma : its usefulness as a tumor marker for bladder cancers. *International Journal of Cancer*, 55 : 19-26.

**T. Murate, K. Yamashita, H. Ohashi, Y. Kagami, K. Tsushita, T. Kinoshita, T. Hotta, H. Saito, S. Yoshida, K. J. Mori et al. (1993).** Erythroid potentiating activity of tissue inhibitor of metalloproteinases on the differentiation of erythropoietin-responsive mouse erythroleukemia cell line, ELM-I-1-3, is closely related to its cell growth potentiating activity. *Experimental Hematology*, 21 : 169-176.

**A. N. Murphy, E. J. Unsworth and W. G. Stetler-Stevenson (1993).** Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 inhibits bFGF-induced human microvascular endothelial cell proliferation. *Journal of Cellular Physiology*, 157 : 351-358.

**G. Murphy, S. Atkinson, R. Ward, J. Gavrilovic and J. J. Reynolds (1992a).** The role of plasminogen activators in the regulation of connective tissue metalloproteinases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 667 : 1-12.

**G. Murphy, M. I. Cocket, P. E. Stephens, B. J. Smith and A. J. P. Docherty (1987).** Stromelysin is an activator of procollagenase. A study with natural and recombinant enzymes. *Biochemical Journal*, 248 : 265-268.

**G. Murphy, R. Ward, J. Gavrilovic and S. Atkinson (1992b).** Physiological mechanisms for metalloproteinase activation. *Matrix. Supplement*, 1 : 224-230.

**G. I. Murray, M. E. Duncan, P. O'Neil, W. T. Melvin and J. E. Fothergill (1996).** Matrix metalloproteinase-1 is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *Nature Medicine*, 2 : 461-462.

**K. Nabeshima, J. Kishi, T. Kurogi, N. Komada, H. Kataoka, Y. Okada and M. Kono (1994).** Stimulation of TIMP-1 and metalloproteinase production in co-cultures of human tumor cells and human fibroblasts. *Cancer Letters*, 78 : 133-140.

**Y. Nakabeppu and D. Nathans (1991).** A naturally occurring truncated form of FosB that inhibits Fos/Jun transcriptional activity. *Cell*, 64 : 751-759.

**K. Nakae, K. Nakajima, J. Inazawa, T. Kitaoka and T. Hirano (1995).** ERM, a PEA3 subfamily of Ets transcription factors, can cooperate with c-Jun. *The Journal of Biological Chemistry*, 270 : 23795-23800.

**K. Nakajima, T. Kusafuka, T. Takeda, Y. Fujitani, K. Nakae and T. Hirano (1993).** Identification of a novel interleukin-6 response element containing an Ets-binding site and a CRE-like site in the junB promoter. *Molecular and Cellular Biology*, 13 : 3027-3041.

**A. Nakano, E. Tani, K. Miyazaki, J. Furuyama and T. Matsumoto (1993).** Expressions of matrilysin and stromelysin in human glioma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 192 : 999-1003.

**T. Nakano and P. G. Scott (1987).** Partial purification and characterization of a neutral proteinase with collagen telopeptidase activity produced by human gingival fibroblasts. *Biochemistry and Cell Biology*, 65 : 286-292.

**H. Nakatsukasa, K. Ashida, T. Higashi, S. Ohguchi, S. Tsuboi, N. Hino, K. Nouso, Y. Urabe, N. Kinugasa, K. Yoshida, S. Uematsu, M. Ishizaki, Y. Kobayashi and T. Tsuji (1996).** Cellular distribution of transcripts for tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 in human hepatocellular carcinomas. *Hepatology*, 24 : 82-88.

**A. C. Newby, K. M. Southgate and M. Davies (1994).** Extracellular matrix degrading metalloproteinases in the pathogenesis of arteriosclerosis. *Basic Research in Cardiology*, 1 : 59-70.

**K. J. Newell, J. P. Witty, W. H. Rodgers and L. M. Matrisian (1994).** Expression and localization of matrix-degrading metalloproteinases during colorectal tumorigenesis. *Molecular Carcinogenesis*, 10 : 199-206.

**R. C. Nicholson, S. Mader, S. Nagpal, M. Leid, C. Rochette-Egly and P. Chambon (1990).** Negative regulation of the rat stromelysin gene promoter by retinoic acid is mediated by an AP1 binding site. *The EMBO Journal*, 9 : 4443-4454.

**A. Nirula, D. J. Moore and R. B. Gaynor (1997).** Constitutive binding of the transcription factor interleukin-2 (IL-2) enhancer binding factor to the IL-2 promoter. *The Journal of Biological Chemistry*, 272 : 7736-7745.

**N. N. Nissen, P. J. Polverini, R. L. Gamelli and L. A. DiPietro (1996).** Basic fibroblast growth factor mediates angiogenic activity in early surgical wounds. *Surgery*, 119 : 457-465.

**A. Noel, H. Emonard, M. Polette, P. Birembaut and J. M. Foidart (1994).** Role of matrix, fibroblasts and type IV collagenases in tumor progression and invasion. *Pathology, Research and Practice*, 190 : 934-941.

**A. Noel, M. Santavicca, I. Stoll, C. L'Hoir, A. Staub, G. Murphy, M. C. Rio and P. Basset (1995).** Identification of structural determinants controlling human and mouse stromelysin-3 proteolytic activities. *The Journal of Biological Chemistry*, 270 : 22866-22872.

**H. Nomura, N. Fujimoto, M. Seiki, M. Mai and Y. Okada (1996).** Enhanced production of matrix metalloproteinases and activation of matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A) in human gastric carcinomas. *International Journal of Cancer*, 69 : 9-16.

**H. Nomura, H. Sato, M. Seiki, M. Mai and Y. Okada (1995).** Expression of membrane-type matrix metalloproteinase in human gastric carcinomas. *Cancer Research*, 55 : 3263-3266.

**J. D. Noti, C. Reinemann and M. N. Petrus (1996).** Regulation of the leukocyte integrin gene CD11c is mediated by AP1 and Ets transcription factors. *Molecular Immunology*, 33 : 115-127.

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

**G. J. Nuovo, P. B. MacConnell, A. Simsir, F. Valea and D. L. French (1995).** Correlation of the in situ detection of polymerase chain reaction-amplified metalloproteinase complementary DNAs and their inhibitors with prognosis in cervical carcinoma. *Cancer Research*, 55 : 267-275.

**J. A. Nye, J. M. Petersen, C. V. Gunther, M. D. Jonsen and B. J. Graves (1992).** Interaction of Murine Ets-1 with GGA-Binding Sites Establishes the ETS Domain as a New DNA-Binding Motif. *Genes and Development*, 6 : 975-990.

**M. O'Shea, F. Willenbrock, R. A. Williamson, M. I. Cockett, R. B. Freedman, J. J. Reynolds, A. J. Docherty and G. Murphy (1992).** Site-directed

mutations that alter the inhibitory activity of the tissue inhibitor of metalloproteinases-1 : importance of the N-terminal region between cysteine 3 and cysteine 13. *Biochemistry*, 31 : 10146-10152.

**R. Offringa, S. Gebel, D. H. van, M. Timmers, A. Smits, R. Zwart, B. Stein, J. L. Bos, A. J. van der Eb and P. Herrlich (1990).** A novel function of the transforming domain of E1a : repression of AP-1 activity. *Cell*, 62 : 527-538.

**R. Offringa, A. M. Smits, A. Houweling, J. L. Bos and A. J. van der Eb (1988).** Similar effects of adenovirus E1A and glucocorticoid hormones on the expression of the metalloprotease stromelysin. *Nucleic Acids Research*, 16 : 10973-10984.

**R. Ofir, V. J. Dwarki, D. Rashid and I. M. Verma (1990).** Phosphorylation of the C terminus of Fos protein is required for transcriptional transrepression of the c-fos promoter. *Nature*, 348 : 80-82.

**Y. Ogata, J. J. Enghild and H. Nagase (1992).** Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) activates the precursor for the human matrix metalloproteinase 9. *The Journal of Biological Chemistry*, 267 : 3581-3584.

**Y. Ogata, Y. Itoh and H. Nagase (1995).** Steps involved in activation of the pro-matrix metalloproteinase 9 (progelatinase B)-tissue inhibitor of metalloproteinases-1 complex by 4-aminophenylmercuric acetate and proteinases. *The Journal of Biological Chemistry*, 270 : 18506-18511.

**V. V. Ogryzko, R. L. Schiltz, V. Russanova, B. H. Howard and Y. Nakatani (1996).** The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell*, 87 : 953-959.

**E. Ohuchi, K. Imai, Y. Fujii, H. Sato, M. Seiki and Y. Okada (1997).** Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *The Journal of Biological Chemistry*, 272 : 2446-2451.

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

**A. Okada, J. P. Bellocq, N. Rouyer, M. P. Chenard, M. C. Rio, P. Chambon and P. Basset (1995).** Membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) gene is expressed in stromal cells of human colon, breast, and head and neck carcinomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 92 : 2730-2734.

**A. Okada, C. Tomasetto, Y. Lutz, J. P. Bellocq, M. C. Rio and P. Basset (1997).** Expression of matrix metalloproteinases during rat skin wound healing :

evidence that membrane type-1 matrix metalloproteinase is a stromal activator of pro-gelatinase A. *The Journal of Cell Biology*, 137 : 67-77.

**Y. Okada, N. Nagase and E. D. Harris, Jr (1986).** A metalloproteinase from human rheumatoid synovial fibroblasts that digests connective tissue matrix-components. *The Journal of Biological Chemistry*, 261 : 14245-14255.

**K. Okazaki and N. Sagata (1995).** The Mos/MAP kinase pathway stabilizes c-Fos by phosphorylation and augments its transforming activity in NIH 3T3 cells. *The EMBO Journal*, 14 : 5048-5059.

**Y. Okumura, H. Sato, M. Seiki and H. Kido (1997).** Proteolytic activation of the precursor of membrane type 1 matrix metalloproteinase by human plasmin. A possible cell surface activator. *FEBS Letters*, 402 : 181-184.

**K. G. Osteen, W. H. Rodgers, M. Gaire, J. T. Hargrove, F. Gorstein and L. M. Matrisian (1994).** Stromal-epithelial interaction mediates steroidal regulation of metalloproteinase expression in human endometrium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 91 : 10129-10133.

**Y. Otani, S. Quinones, J. Saus, M. Kurkinen and E. D. Harris, Jr (1990).** Cycloheximide induces stromelysin mRNA in cultured human fibroblasts. *European Journal of Biochemistry*, 192 : 75-79.

**C. M. Overall (1995).** Repression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase expression by all-trans-retinoic acid in rat bone cell populations : comparison with transforming growth factor-beta 1. *Journal of Cellular Physiology*, 164 : 17-25.

**C. M. Overall, J. L. Wrana and J. Sodek (1991).** Transcriptional and post-transcriptional regulation of 72-kDa gelatinase/type IV collagenase by transforming growth factor-beta 1 in human fibroblasts. Comparisons with collagenase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase gene expression. *The Journal of Biological Chemistry*, 266 : 14064-14071.

**R. D. Owen and M. C. Ostrowski (1990).** Transcriptional activation of a conserved sequence element by ras requires a nuclear factor distinct from c-fos or c-jun. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 87 : 3866-3870.

**L. Pan, S. H. Chamberlain, D. T. Auble and C. E. Brinckerhoff (1992).** Differential regulation of collagenase gene expression by retinoic acid receptors--alpha, beta and gamma. *Nucleic Acids Research*, 20 : 3105-3111.

**L. Pan, C. Eckhoff and C. E. Brinckerhoff (1995).** Suppression of collagenase gene expression by all-trans and 9-cis retinoic acid is ligand dependent and requires both RARs and RXRs. *Journal of Cellular Biochemistry*, 57 : 575-589.

**S. Park, X. Liu, T. Pawson and R. Jove (1992).** Activated Src tyrosine kinase phosphorylates Tyr-457 of bovine GTPase-activating protein (GAP) in vitro and the corresponding residue of rat GAP in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*, 267 : 17194-17200.

**D. Pei, G. Majmudar and S. J. Weiss (1994).** Hydrolytic inactivation of a breast carcinoma cell-derived serpin by human stromelysin-3. *The Journal of Biological Chemistry*, 269 : 25849-25855.

**D. Pei and S. J. Weiss (1995).** Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. *Nature*, 375 : 244-247.

**D. Pei and S. J. Weiss (1996).** Transmembrane-deletion mutants of the membrane-type matrix metalloproteinase-1 process progelatinase A and express intrinsic matrix-degrading activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 271 : 9135-9140.

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

**A. M. Pendas, V. Knauper, X. S. Puente, E. Llano, M. G. Mattei, S. Apte, G. Murphy and C. Lopez-Otin (1997).** Identification and characterization of a novel human matrix metalloproteinase with unique structural characteristics, chromosomal location, and tissue distribution. *The Journal of Biological Chemistry*, 272 : 4281-4286.

**M. S. Pepper, A. P. Sappino, R. Stocklin, R. Montesano, L. Orci and J. D. Vassalli (1993).** Upregulation of urokinase receptor expression on migrating endothelial cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 122 : 673-684.

**E. D. Perez-Albuerne, G. Schatteman, L. K. Sanders and D. Nathans (1993).** Transcriptional regulatory elements downstream of the JunB gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 90 : 11960-11964.

**J. M. Petersen, J. J. Skalicky, L. W. Donaldson, L. P. McIntosh, T. Alber and B. J. Graves (1995).** Modulation of transcription factor Ets-1 DNA binding : DNA-induced unfolding of an alpha helix. *Science*, 269 : 1866-1869.

**M. J. Petersen, D. T. Woodley, G. P. Stricklin and E. J. O'Keefe (1990).** Enhanced synthesis of collagenase by human keratinocytes cultured on type I or type IV collagen. *Journal of Investigative Dermatology*, 94 : 341-346.

**M. Pfahl (1993).** Nuclear receptor/AP-1 interaction. *Endocrine Reviews*, 14 : 651-658.

**C. M. Pfarr, F. Mechta, G. Spyrou, D. Lallemand, S. Carillo and M. Yaniv (1994).** Mouse JunD negatively regulates fibroblast growth and antagonizes transformation by ras. *Cell*, 76 : 747-760.

**P. M. Pil, C. S. Chow and S. J. Lippard (1993).** High-mobility-group 1 protein mediates DNA bending as determined by ring closures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 90 : 9465-9469.

**N. Platt, H. Suzuki, Y. Kurihara, T. Kodama and S. Gordon (1996).** Role for the class A macrophage scavenger receptor in the phagocytosis of apoptotic thymocytes in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 93 : 12456-12460.

**E. F. Plow, T. Herren, A. Redlitz, L. A. Miles and J. L. Hoover-Plow (1995).** The cell biology of the plasminogen system. *The FASEB Journal*, 9 : 939-945.

**P. Pognonec, K. E. Boulukos, R. Bosselut, C. Boyer, A. M. Schmitt-Verhulst and J. Ghysdael (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.

**M. Polette, C. Gilles, V. Marchand, M. Lorenzato, B. Toole, J. M. Tournier, S. Zucker and P. Birembaut (1997a).** Tumor collagenase stimulatory factor (TCSF) expression and localization in human lung and breast cancers. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 45 : 703-709.

**M. Polette, C. Gilles, V. Marchand, M. Seiki, J. M. Tournier and P. Birembaut (1997b).** Induction of membrane-type matrix metalloproteinase 1 (MT1-MMP) expression in human fibroblasts by breast adenocarcinoma cells. *Clinical and Experimental Metastasis*, 15 : 157-163.

**H. Porte, E. Chastre, S. Prevot, B. Nordlinger, S. Empereur, P. Basset, P. Chambon and C. Gespach (1995).** Neoplastic progression of human colorectal cancer is associated with overexpression of the stromelysin-3 and BM-40/SPARC genes. *International Journal of Cancer*, 64 : 70-75.

**W. C. Powell and L. M. Matrisian (1996).** Complex roles of matrix metalloproteinases in tumor progression. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 213 : 1-21.

**C. Powers, H. Krutzsch and K. Gardner (1996).** Modulation of JunD/AP-1 DNA binding activity by AP-1-associated factor 1 (AF-1). *The Journal of Biological Chemistry*, 271 : 30089-30095.

**D. D. Prasad, V. N. Rao, L. Lee and E. S. Reddy (1994).** Differentially spliced erg-3 product functions as a transcriptional activator. *Oncogene*, 9 : 669-673.

**M. A. Price, F. H. Cruzalegui and R. Treisman (1996).** The p38 and ERK MAP kinase pathways cooperate to activate Ternary Complex Factors and c-fos transcription in response to UV light. *The EMBO Journal*, 15 : 6552-6563.

**M. A. Price, A. E. Rogers and R. Treisman (1995).** Comparative analysis of the ternary complex factors Elk-1, SAP-1a and SAP-2 (ERP/NET). *The EMBO Journal*, 14 : 2589-2601.

**X. S. Puente, A. M. Pendas, E. Llano, G. Velasco and C. Lopez-Otin (1996).** Molecular cloning of a novel membrane-type matrix metalloproteinase from a human breast carcinoma. *Cancer Research*, 56 : 944-949.

**S. Quinones, G. Buttice and M. Kurkinen (1994).** Promoter elements in the transcriptional activation of the human stromelysin-1 gene by the inflammatory cytokine, interleukin 1. *Biochemical Journal*, 302 : 471-477.

**S. Quinones, J. Saus, Y. Otani, J. E. D. Harris and M. Kurkinen (1989).** Transcriptional regulation of human stromelysin. *The Journal of Biological Chemistry*, 264 : 8339-8344.

**B. Rabault and J. Ghysdael (1994).** Calcium-induced phosphorylation of ETS1 inhibits its specific DNA binding activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 269 : 28143-28151.

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

**M. Rajabi, S. Solomon and A. R. Poole (1991).** Hormonal regulation of interstitial collagenase in the uterine cervix of the pregnant guinea pig. *Endocrinology*, 128 : 863-871.

**M. R. Rajabi, S. Solomon and A. R. Poole (1992).** Activation of protein kinase C stimulates collagenase production by cultured cells of the cervix of the pregnant guinea pig. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 167 : 194-200.

**L. J. Ransone, L. D. Kerr, M. J. Schmitt, P. Wamsley and I. M. Verma (1993).** The bZIP domains of Fos and Jun mediate a physical association with the TATA box-binding protein. *Gene Expression*, 3 : 37-48.



**V. N. Rao, T. S. Papas and E. S. P. Reddy (1987).** *erg*, a human ets-related gene on chromosome 21 : alternative splicing, polyadenylation, and translation. *Science*, 237 : 635-638.

**F. J. 3d Rauscher, P. J. Voulalas, B. R. Franza, Jr and T. Curran (1988).** Fos and Jun bind cooperatively to the AP-1 site : reconstitution in vitro. *Genes and Development*, 2 : 1687-1699.

**J. M. Ray and S. W. Stetler (1994).** The role of matrix metalloproteases and their inhibitors in tumour invasion, metastasis and angiogenesis. *European Respiratory Journal*, 7 : 2062-2072.

**M. J. Reed and E. H. Sage (1996).** SPARC and the extracellular matrix : implications for cancer and wound repair. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 213 : 81-94.

**P. Reponen, I. Leivo, C. Sahlberg, S. S. Apte, B. R. Olsen, I. Thesleff and K. Tryggvason (1995).** 92-kDa type IV collagenase and TIMP-3, but not 72-kDa type IV collagenase or TIMP-1 or TIMP-2, are highly expressed during mouse embryo implantation. *Developmental Dynamics*, 202 : 388-396.

**T. Riikonen, J. Westermarck, L. Koivisto, A. Broberg, V. M. Kahari and J. Heino (1995).** Integrin alpha 2 beta 1 is a positive regulator of collagenase (MMP-1) and collagen alpha 1(I) gene expression. *Biological Chemistry*, 270 : 13548-13552.

**V. M. Rivera, M. Sheng and M. E. Greenberg (1990).** The inner core of the serum response element mediates both the rapid induction and subsequent repression of c-fos transcription following serum stimulation. *Genes and Development*, 4 : 255-268.

**W. H. Rodgers, L. M. Matrisian, L. C. Giudice, B. Dsupin, P. Cannon, C. Svitek, F. Gorstein and K. G. Osteen (1994).** Patterns of matrix metalloproteinase expression in cycling endometrium imply differential functions and regulation by steroid hormones. *Journal of Clinical Investigation*, 94 : 946-953.

**R. G. Roeder (1996).** The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends In Biochemical Sciences*, 21 : 327-335.

**J. W. Rooney, Y. L. Sun, L. H. Glimcher and T. Hoey (1995).** Novel NFAT sites that mediate activation of the interleukin-2 promoter in response to T-cell receptor stimulation. *Molecular and Cellular Biology*, 15 : 6299-6310.

**N. Rouyer, C. Wolf, M. P. Chenard, M. C. Rio, P. Chambon, J. P. Belloq and P. Basset (1994).** Stromelysin-3 gene expression in human cancer : an overview. *Invasion Metastasis*, 14 : 269-275.

**D. Rozek and G. P. Pfeifer (1993).** In vivo protein-DNA interactions at the c-jun promoter : preformed complexes mediate the UV response. *Molecular and Cellular Biology*, 13 : 5490-5499.

**R. G. Russell, M. K. McGuire, J. E. Meats, N. M. Ebsworth and J. Beresford (1981).** Intercellular messengers in joint tissues in rheumatoid arthritis. How disturbed control mechanisms may contribute to tissue destruction and repair. *Scandinavian Journal of Rheumatology. Supplement*, 40 : 75-87.

**M. N. Rutherford, A. Kumar, S. J. Haque, J. Ghysdael and B. R. Williams (1997).** Specific binding of the ETS-domain protein to the interferon-stimulated response element. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 17 : 1-10.

**M. E. Ryan, S. Ramamurthy and L. M. Golub (1996).** Matrix metalloproteinases and their inhibition in periodontal treatment. *Current Opinions in Periodontology*, 3 : 85-96.

**S. Rydziel, S. Varghese and E. Canalis (1997).** Transforming growth factor beta1 inhibits collagenase 3 expression by transcriptional and post-transcriptional mechanisms in osteoblast cultures. *Journal of Cellular Physiology*, 170 : 145-152.

**R. P. Ryseck and R. Bravo (1991).** c-Jun, JunB, and JunD differ in their binding affinities to AP-1 and CRE consensus sequences : effect of Fos protein. *Oncogene*, 6 : 533-542.

**U. K. Saarialho-Kere, E. S. Chang, H. G. Welgus and W. C. Parks (1992).** Distinct localization of collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases expression in wound healing associated with ulcerative pyogenic granuloma. *Journal of Clinical Investigation*, 90 : 1952-1957.

**U. K. Saarialho-Kere, S. O. Kovacs, A. P. Pentland, J. E. Olerud, H. G. Welgus and W. C. Parks (1993).** Cell-matrix interactions modulate interstitial collagenase expression by human keratinocytes actively involved in wound healing. *Journal of Clinical Investigation*, 92 : 2858-2866.

**O. Saksela, D. Moscatelli and D. B. Rifkin (1987).** The opposing effects of basic fibroblast growth factor and transforming growth factor beta on the regulation of plasminogen activator activity in capillary endothelial cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 105 : 957-963.

**O. Saksela and D. B. Rifkin (1990).** Release of basic fibroblast growth factor-heparan sulfate complexes from endothelial cells by plasminogen activator-mediated proteolytic activity. *Journal of Cellular Biochemistry*, 110 : 767-775.

**T. Salo, J. G. Lyons, F. Rahemtulla, H. Birkedal-Hansen and H. Larjava (1991).** Transforming growth factor-beta 1 up-regulates type IV collagenase expression in cultured human keratinocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 266 : 11436-11441.

**T. Salo, M. Makela, M. Kylmaniemi, H. Autio-Harminen and H. Larjava (1994).** Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 during early human wound healing. *Laboratory Investigation*, 70 : 176-182.

**M. Santavicca, A. Noel, H. Angliker, I. Stoll, J. P. Segain, P. Anglard, M. Chretien, N. Seidah and P. Basset (1996).** Characterization of structural determinants and molecular mechanisms involved in pro-stromelysin-3 activation by 4-aminophenylmercuric acetate and furin-type convertases. *Biochemical Journal*, 315 : 953-958.

**L. Sanz, E. Berra, M. M. Municio, I. Dominguez, J. Lozano, T. Johansen, J. Moscat and M. T. Diaz-Meco (1994).** Zeta PKC plays a critical role during stromelysin promoter activation by platelet-derived growth factor through a novel palindromic element. *The Journal of Biological Chemistry*, 269 : 10044-10049.

**L. Sanz, J. Moscat and M. M. Diaz (1995).** Molecular characterization of a novel transcription factor that controls stromelysin expression. *Molecular and Cellular Biology*, 15 : 3164-3170.

**H. Sato, T. Kinoshita, T. Takino, K. Nakayama and M. Seiki (1996a).** Activation of a recombinant membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) by furin and its interaction with tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2. *FEBS Letters*, 393 : 101-104.

**H. Sato, M. Kita and M. Seiki (1993).** v-Src activates the expression of 92-kDa type IV collagenase gene through the AP-1 site and the GT box homologous to retinoblastoma control elements. A mechanism regulating gene expression independent of that by inflammatory cytokines. *The Journal of Biological Chemistry*, 268 : 23460-23468.

**H. Sato and M. Seiki (1993).** Regulatory mechanism of 92 kDa type IV collagenase gene expression which is associated with invasiveness of tumor cells. *Oncogene*, 8 : 395-405.

**H. Sato, T. Takino, T. Kinoshita, K. Imai, Y. Okada, W. G. Stetler Stevenson and M. Seiki (1996b).** Cell surface binding and activation of gelatinase A induced by expression of membrane-type-1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP). *FEBS Letters*, 385 : 238-240.

**H. Sato, T. Takino, Y. Okada, J. Cao, A. Shinagawa, E. Yamamoto and M. Seiki (1994).** A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor cells. *Nature*, 370 : 61-65.

**T. Sato, A. Ito, Y. Mori, K. Yamashita, T. Hayakawa and H. Nagase (1991).** Hormonal regulation of collagenolysis in uterine cervical fibroblasts. Modulation of synthesis of procollagenase, prostromelysin and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) by progesterone and oestradiol-17 beta. *Biochemical Journal*, 275 : 645-650.

**Y. Sato and D. B. Rifkin (1989).** Inhibition of endothelial cell movement by pericytes and smooth muscle cells : activation of a latent transforming growth factor-beta 1-like molecule by plasmin during co-culture. *Journal of Cellular Biochemistry*, 109 : 309-315.

**Y. Satoh, T. Higashi, K. Nouse, T. Shiota, N. Kinugasa, K. Yoshida, S. Uematsu, H. Nakatsukasa, Y. Nishimura and T. Tsuji (1996).** Cathepsin B in the growth of colorectal cancer : increased activity of cathepsin B in human colorectal cancer. *Acta Medica Okayama*, 50 : 305-311.

**F. Schatz, C. Papp, E. Toth-Pal and C. J. Lockwood (1994).** Ovarian steroid-modulated stromelysin-1 expression in human endometrial stromal and decidual cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 78 : 1467-1472.

**S. C. Schiavi, C. L. Wellington, A. B. Shyu, C. Y. Chen, M. E. Greenberg and J. G. Belasco (1994).** Multiple elements in the c-fos protein-coding region facilitate mRNA deadenylation and decay by a mechanism coupled to translation. *The Journal of Biological Chemistry*, 269 : 3441-3448.

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

**J. Schneikert, H. Peterziel, P. A. Defossez, H. Klocker, Y. de Launoit and A. C. Cato (1996).** Androgen receptor-Ets protein interaction is a novel mechanism for steroid hormone-mediated down-modulation of matrix metalloproteinase expression. *The Journal of Biological Chemistry*, 271 : 23907-23913.

**K. E. Schoedel, M. A. Greco, W. G. Stetler-Stevenson, N. P. Otori, S. Goswami, D. Present and G. C. Steiner (1996).** Expression of metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in giant cell tumor of bone : an immunohistochemical study with clinical correlation. *Human Pathology*, 27 : 1144-1148.

**A. Schönthal, P. Herrlich, H. J. Rahmsdorf and H. Ponta (1988).** Requirement for fos gene expression in the transcriptional activation of collagenase by other oncogenes and phorbol esters. *Cell*, 54 : 325-334.

**D. J. Schroen and C. E. Brinckerhoff (1996).** Inhibition of rabbit collagenase (matrix metalloproteinase-1 ; MMP-1) transcription by retinoid receptors : evidence for binding of RARs/RXR $\alpha$ s to the -77 AP-1 site through interactions with c-Jun. *Journal of Cellular Physiology*, 169 : 320-332.

**M. Schuermann, K. Jooss and R. Muller (1991).** fosB is a transforming gene encoding a transcriptional activator. *Oncogene*, 6 : 567-576.

**R. M. Schultz, S. Silberman, B. Persky, A. S. Bajkowski and D. F. Carmichael (1988).** Inhibition by human recombinant tissue inhibitor of metalloproteinases of human amnion invasion and lung colonization by murine B16-F10 melanoma cells. *Cancer Research*, 48 : 5539-5545.

**J. Schutte, J. Viallet, M. Nau, S. Segal, J. Fedorko and J. Minna (1989).** jun-B inhibits and c-fos stimulates the transforming and trans-activating activities of c-jun. *Cell*, 59 : 987-997.

**R. A. Schwartz (1996).** Kaposi's sarcoma : advances and perspectives. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 34 : 804-814.

**R. E. Seftor, E. A. Seftor, K. R. Gehlsen, W. G. Stetler-Stevenson, P. D. Brown, E. Ruoslahti and M. J. Hendrix (1992).** Role of the  $\alpha$  v  $\beta$  3 integrin in human melanoma cell invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 89 : 1557-1561.

**J. P. Segain, J. Harb, M. Gregoire, K. Meflah and J. Menanteau (1996).** Induction of fibroblast gelatinase B expression by direct contact with cell lines derived from primary tumor but not from metastases. *Cancer Research*, 56 : 5506-5512.

**N. G. Seidah, M. Chretien and R. Day (1994).** The family of subtilisin/kexin like pro-protein and pro-hormone convertases : divergent or shared functions. *Biochimie*, 76 : 197-209.

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

**D. N. Sgouras, M. A. Athanasiou, G. J. Beal, Jr, R. J. Fisher, D. G. Blair and G. J. Mavrothalassitis (1995).** ERF : an ETS domain protein with strong transcriptional repressor activity, can suppress ets-associated tumorigenesis and is regulated by

phosphorylation during cell cycle and mitogenic stimulation. *The EMBO Journal*, 14 : 4781-4793.

**L. H. Shapiro (1995)**. Myb and Ets proteins cooperate to transactivate an early myeloid gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 270 : 8763-8771.

**S. Shapiro, J. C. Fliszar, T. J. Broekelmann, R. P. Mecham, R. M. Senior and W. G. Welgus (1995)**. Activation of the 92-kDa Gelatinase by Stromelysin and 4-Aminophenylmercuric Acetate. *The Journal of Biological Chemistry*, 270 : 6351-6356.

**S. D. Shapiro, E. J. Campbell, D. K. Kobayashi and H. G. Welgus (1991)**. Dexamethasone selectively modulates basal and lipopolysaccharide-induced metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase production by human alveolar macrophages. *Journal of Immunology*, 146 : 2724-2729.

**P. E. Shaw, S. Frasch and A. Nordheim (1989a)**. Repression of c-fos transcription is mediated through p67SRF bound to the SRE. *The EMBO Journal*, 8 : 2567-2574.

**P. E. Shaw, H. Schroter and A. Nordheim (1989b)**. The ability of a ternary complex to form over the serum response element correlates with serum inducibility of the human c-fos promoter. *Cell*, 56 : 563-572.

**S. Shimonovitz, A. Hurwitz, M. Dushnik, E. Anteby, E. T. Geva and S. Yagel (1994)**. Developmental regulation of the expression of 72 and 92 kd type IV collagenases in human trophoblasts : a possible mechanism for control of trophoblast invasion [see comments]. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 171 : 832-838.

**M. Shingu, Y. Nagai, T. Isayama, T. Naono, M. Nobunaga and Y. Nagai (1993)**. The effects of cytokines on metalloproteinase inhibitors (TIMP) and collagenase production by human chondrocytes and TIMP production by synovial cells and endothelial cells. *Clinical and Experimental Immunology*, 94 : 145-149.

**K. I. Shofuda, H. Yasumitsu, A. Nishihashi, K. Miki and K. Miyazaki (1997)**. Expression of Three Membrane-type Matrix Metalloproteinases (MT-MMPs) in Rat Vascular Smooth Muscle Cells and Characterization of MT3-MMPs with and without Transmembrane Domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 272 : 9749-9754.

**P. Shore and A. D. Sharrocks (1994)**. The transcription factors Elk-1 and serum response factor interact by direct protein-protein contacts mediated by a short region of Elk-1. *Molecular and Cellular Biology*, 14 : 3283-3291.

**P. Shore, A. J. Whitmarsh, R. Bhaskaran, R. J. Davis, J. P. Waltho and A. D. Sharrocks (1996).** Determinants of DNA-binding specificity of ETS-domain transcription factors. *Molecular and Cellular Biology*, 16 : 3338-3349.

**M. H. Sieweke, H. Tekotte, J. Frampton and T. Graf (1996).** MafB Is an Interaction Partner and Repressor of Ets-1 That Inhibits Erythroid Differentiation. *Cell*, 85 : 49-60.

**U. I. Sires, G. Murphy, V. M. Baragi, C. J. Fliszar, H. G. Welgus and R. M. Senior (1994).** Matrilysin is much more efficient than other matrix metalloproteinases in the proteolytic inactivation of alpha 1-antitrypsin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 204 : 613-620.

**K. L. Sirum and C. E. Brinckerhoff (1989).** Cloning of the genes for human stromelysin and stromelysin 2 : differential expression in rheumatoid synovial fibroblasts. *Biochemistry*, 28 : 8691-8698.

**K. Sirum-Connolly and C. E. Brinckerhoff (1991).** Interleukin-1 or phorbol induction of the stromelysin promoter requires an element that cooperates with AP-1. *Nucleic Acids Research*, 19 : 335-341.

**A. Sitlani and D. M. Crothers (1996).** Fos and Jun do not bend the AP-1 recognition site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 93 : 3248-3252.

**T. Smeal, P. Angel, J. Meek and M. Karin (1989).** Different requirements for formation of Jun : Jun and Jun : Fos complexes. *Genes and Development*, 3 : 2091-2100.

**T. Smeal, B. Binetruy, D. Mercola, A. Grover-Bardwick, G. Heidecker, U. R. Rapp and M. Karin (1992).** Oncoprotein-mediated signalling cascade stimulates c-Jun activity by phosphorylation of serines 63 and 73. *Molecular and Cellular Biology*, 12 : 3507-3513.

**T. Smeal, B. Binetruy, D. A. Mercola, M. Birrer and M. Karin (1991).** Oncogenic and transcriptional cooperation with Ha-Ras requires phosphorylation of c-Jun on serines 63 and 73. *Nature*, 354 : 494-496.

**P. H. Smits, L. de Wit, A. J. van der Eb and A. Zantema (1996).** The adenovirus E1A-associated 300 kDa adaptor protein counteracts the inhibition of the collagenase promoter by E1A and represses transformation. *Oncogene*, 12 : 1529-1535.

**P. D. Soloway, C. M. Alexander, Z. Werb and R. Jaenisch (1996).** Targeted mutagenesis of Timp-1 reveals that lung tumor invasion is influenced by Timp-1 genotype of the tumor but not by that of the host. *Oncogene*, 13 : 2307-2314.

**K. Somasundaram, G. Jayaraman, T. Williams, E. Moran, S. Frisch and B. Thimmapaya (1996).** Repression of a matrix metalloprotease gene by E1A correlates with its ability to bind to cell type-specific transcription factor AP-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 93 : 3088-3093.

**C. Z. Song, C. J. Tierney, P. M. Loewenstein, R. Puztai, J. S. Symington, Q. Q. Tang, K. Toth, A. Nishikawa, S. T. Bayley and M. Green (1995).** Transcriptional repression by human adenovirus E1A N terminus/conserved domain 1 polypeptides in vivo and in vitro in the absence of protein synthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 270 : 23263-23267.

**M. H. Sonobe, T. Yoshida, M. Murakami, T. Kameda and H. Iba (1995).** fra-2 promoter can respond to serum-stimulation through AP-1 complexes. *Oncogene*, 10 : 689-696.

**E. B. Springman, E. L. Angleton, H. Birkedal Hansen and H. E. Van Wart (1990).** Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase : evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 87 : 364-368.

**C. Stephens and E. Harlow (1987).** Differential splicing yields novel adenovirus 5 E1A mRNAs that encode 30 kd and 35 kd proteins. *The EMBO Journal*, 6 : 2027-2035.

**W. G. Stetler-Stevenson, S. Aznavoorian and L. A. Liotta (1993).** Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annual Review of Cellular Biology*, 9 : 541-573.

**W. G. Stetler-Stevenson, N. Bersch and D. W. Golde (1992).** Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) has erythroid-potentiating activity. *FEBS Letters*, 296 : 231-234.

**W. G. Stetler-Stevenson, H. C. Krutzsch and L. A. Liotta (1989).** Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2). A new member of the metalloproteinase inhibitor family. *The Journal of Biological Chemistry*, 264 : 17374-17378.

**W. Stöcker and W. Bode (1995).** Structural features of a superfamily of zinc-endopeptidases : the metzincins. *Current Opinions in Structural Biology*, 5 : 383-390.

**M. A. Stolow, D. D. Bauzon, J. Li, T. Sedgwick, V. C. Liang, Q. A. Sang and Y. B. Shi (1996).** Identification and characterization of a novel collagenase in *Xenopus laevis* : possible roles during frog development. *Molecular Biology of the Cell*, 7 : 1471-1483.

**G. P. Stricklin, L. Li, V. Jancic, B. A. Wenczak and L. B. Nanney (1993).** Localization of mRNAs representing collagenase and TIMP in sections of healing human burn wounds. *American Journal of Pathology*, 143 : 1657-1666.

**A. Y. Strongin, I. Collier, G. Bannikov, B. L. Marmer, G. A. Grant and G. I. Goldberg (1995).** Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *The Journal of Biological Chemistry*, 270 : 5331-5338.

**S. Su, F. Dehnade and M. Zafarullah (1996).** Regulation of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 gene expression by transforming growth factor-beta and dexamethasone in bovine and human articular chondrocytes. *DNA and Cell Biology*, 15 : 1039-1048.

**K. Suzuki, J. J. Enghild, T. Morodomi, G. Salvesen and H. Nagase (1990).** Mechanisms of activation of tissue procollagenase by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin). *Biochemistry*, 29 : 10261-10270.

**K. Suzuki, M. Lees, G. F. Newlands, H. Nagase and D. E. Woolley (1995).** Activation of precursors for matrix metalloproteinases 1. *Biochemical Journal*, 305 : 301-306.

**T. Suzuki, H. Okuno, T. Yoshida, T. Endo, H. Nishina and H. Iba (1991).** Difference in transcriptional regulatory function between c-Fos and Fra-2. *Nucleic Acids Research*, 19 : 5537-5542.

**D. L. Swope, C. L. Mueller and J. C. Chrivia (1996).** CREB-binding protein activates transcription through multiple domains. *The Journal of Biological Chemistry*, 271 : 28138-28145.

**T. Takino, H. Sato, A. Shinagawa and M. Seiki (1995).** Identification of the second membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP-2) gene from a human placenta cDNA library. MT-MMPs form a unique membrane-type subclass in the MMP family. *The Journal of Biological Chemistry*, 270 : 23013-23020.

**D. C. Talbot and P. D. Brown (1996).** Experimental and clinical studies on the use of matrix metalloproteinase inhibitors for the treatment of cancer. *European Journal of Cancer*, 32A : 2528-2533.

**Y. Tan, J. Rouse, A. Zhang, S. Cariati, P. Cohen and M. J. Comb (1996).** FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38 MAP kinase and MAPKAP kinase-2. *The EMBO Journal*, 15 : 4629-4642.

**K. B. Taylor, L. J. Windsor, N. C. M. Caterina, M. K. Bodden and J. A. Engler (1996).** The mechanism of inhibition of collagenase by TIMP-1. *The Journal of Biological Chemistry*, 271 : 23938-23945.

**S. Teurich and P. Angel (1995).** The glucocorticoid receptor synergizes with Jun homodimers to activate AP-1-regulated promoters lacking GR binding sites. *Chemical Senses*, 20 : 251-255.

**H. J. Thiesen and C. Bach (1990).** Target Detection Assay (TDA) : a versatile procedure to determine DNA binding sites as demonstrated on SP1 protein. *Nucleic Acids Research*, 18 : 3203-3209.

**C. B. Thompson, C. Y. Wang, I. C. Ho, P. R. Bohjanen, B. Petryniak, C. H. June, S. Miesfeldt, L. Zhang, G. J. Nabel, B. Karpinski and M. Leiden (1992).** cis-acting sequences required for inducible interleukin-2 enhancer function bind a novel Ets-related protein, Elf-1. *Molecular and Cellular Biology*, 12 : 1043-1053.

**C. C. Thompson, T. A. Brown and S. L. McKnight (1991).** Convergence of Ets- and notch-related structural motifs in a heteromeric DNA binding complex. *Science*, 253 : 762-768.

**U. P. Thorgeirsson, H. Yoshiji, C. C. Sinha and D. E. Gomez (1996).** Breast cancer ; tumor neovasculature and the effect of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) on angiogenesis. *In Vivo*, 10 : 137-144.

**M. Tokuraku, H. Sato, S. Murakami, Y. Okada, Y. Watanabe and M. Seiki (1995).** Activation of the precursor of gelatinase A/72 kDa type IV collagenase/MMP-2 in lung carcinomas correlates with the expression of membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) and with lymph node metastasis. *International Journal of Cancer*, 64 : 355-359.

**J. Torchia, D. W. Rose, J. Inostroza, Y. Kamei, S. Westin, C. K. Glass and M. G. Rosenfeld (1997).** The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function. *Nature*, 387 : 677-684.

**R. Treisman (1992).** The serum response element. *Trends In Biochemical Sciences*, 17 : 423-426.

**R. Treisman (1994).** Ternary complex factors : growth factor regulated transcriptional activators. *Current Opinion Genetics and Development*, 4 : 96-101.

**R. Treisman (1996).** Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Current Opinions in Cell Biology*, 8 : 205-215.

**P. Tremble, R. Chiquet-Ehrismann and Z. Werb (1994).** The extracellular matrix ligands fibronectin and tenascin collaborate in regulating collagenase gene expression in fibroblasts. *Molecular and Cellular Biology*, 5 : 439-453.

**P. Tremble, C. H. Damsky and Z. Werb (1995).** Components of the nuclear signaling cascade that regulate collagenase gene expression in response to integrin-derived signals. *The Journal of Biological Chemistry*, 129 : 1707-1720.

**P. M. Tremble, T. F. Lane, E. H. Sage and Z. Werb (1993).** SPARC, a secreted protein associated with morphogenesis and tissue remodeling, induces expression of metalloproteinases in fibroblasts through a novel extracellular matrix-dependent pathway. *The Journal of Cell Biology*, 121 : 1433-1444.

**E. Y. Tsai, J. Jain, P. A. Pesavento, A. Rao and A. E. Goldfeld (1996).** Tumor necrosis factor alpha gene regulation in activated T cells involves ATF-2/Jun and NFATp. *Molecular and Cellular Biology*, 16 : 459-467.

**N. Turque, G. Butticè, A. Beuscart, D. Stéhelin, P. Crépieux and X. Desbiens (1997).** Hydrocortisone modulates the expression of c-ets-1 and 72 kDa type IV collagenase in chicken dermis during early feather morphogenesis. *International Journal of Developmental Biology*, 41 : 103-109.

**E. N. Unemori, M. J. Bair, E. A. Bauer and E. P. Amento (1991).** Stromelysin expression regulates collagenase activation in human fibroblasts. Dissociable control of two metalloproteinases by interferon-gamma. *The Journal of Biological Chemistry*, 266 : 23477-23482.

**J. A. Uria, A. A. Ferrando, G. Velasco, J. M. Freije and C. Lopez-Otin (1994).** Structure and expression in breast tumors of human TIMP-3, a new member of the metalloproteinase inhibitor family. *Cancer Research*, 54 : 2091-2094.

**M. Vaalamo, M. Weckroth, P. Puolakkainen, J. Kere, P. Saarinen, J. Lauharanta and U. K. Saarialho-Kere (1996).** Patterns of matrix metalloproteinase and TIMP-1 expression in chronic and normally healing human cutaneous wounds. *British Journal of Dermatology*, 135 : 52-59.

**H. van Dam, M. Duyndam, R. Rottier, A. Bosch, L. de Vries Smits, P. Herrlich, A. Zantema, P. Angel and A. J. van der Eb (1993).** Heterodimer formation of cJun and ATF-2 is responsible for induction of c-jun by the 243 amino acid adenovirus E1A protein. *The EMBO Journal*, 12 : 479-487.

**H. van Dam, R. Offringa, I. Meijer, B. Stein, A. M. Smits, P. Herrlich, J. L. Bos and A. J. van der Eb (1990).** Differential effects of the adenovirus E1A

oncogene on members of the AP-1 transcription factor family. *Molecular and Cellular Biology*, 10 : 5857-5864.

**H. van Dam, R. Offringa, A. M. Smits, J. L. Bos, N. C. Jones and A. J. van der Eb (1989).** The repression of the growth factor-inducible genes JE, c-myc and stromelysin by adenovirus E1A is mediated by conserved region 1. *Oncogene*, 4 : 1207-1212.

**M. van der Rest and R. Garrone (1991).** Collagen family of proteins. *FASEB Journal*, 5 : 2814-2823.

**B. Vandebunder, V. Fafeur, N. Wernert and D. Stéhelin (1994a).** Analyse moléculaire de l'angiogenèse tumorale. *Médecine / Sciences*, 10 : 516-527.

**B. Vandebunder, C. Quéva, X. Desbiens, N. Wernert and D. Stéhelin (1994b).** Expression of the transcription factor c-Ets1 correlates with the occurrence of invasive processes during normal and pathological development. *Invasion Metastasis*, 14 : 198-209.

**S. Varghese, S. Rydziel, J. J. Jeffrey and E. Canalis (1994).** Regulation of interstitial collagenase expression and collagen degradation by retinoic acid in bone cells. *Endocrinology*, 134 : 2438-2444.

**A. Velcich and E. B. Ziff (1990).** Functional analysis of an isolated fos promoter element with AP-1 site homology reveals cell type-specific transcriptional properties. *Molecular and Cellular Biology*, 10 : 6273-6282.

**M. C. Venanzoni, L. R. Robinson, D. R. Hodge, I. Kola and A. Seth (1996).** ETS1 and ETS2 in p53 regulation : spatial separation of ETS binding sites (EBS) modulate protein : DNA interaction. *Oncogene*, 12 : 1199-1204.

**C. P. Verrijzer and R. T. Tjian (1996).** TAFs mediate transcriptional activation and promoter selectivity. *Trends In Biochemical Sciences*, 21 : 338-342.

**J. L. Veyrune, S. Carillo, A. Vie and J. M. Blanchard (1995).** C-fos mRNA instability determinants present within both the coding and the 3' non coding region link the degradation of this mRNA to its translation. *Oncogene*, 11 : 2127-2134.

**M. P. Vincenti, L. A. White, D. J. Schroen, U. Benbow and C. E. Brinckerhoff (1996).** Regulating expression of the gene for matrix metalloproteinase-1 (collagenase) : mechanisms that control enzyme activity, transcription, and mRNA stability. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 6 : 391-411.

**D. W. Visscher, M. Hoyhtya, S. K. Ottosen, C. M. Liang, F. Sarkar, J. D. Crissman and R. Fridman (1994).** Enhanced expression of tissue inhibitor of

metalloproteinase-2 (TIMP-2) in the stroma of breast carcinomas correlates with tumor recurrence. *International Journal of Cancer*, 59 : 339-344.

**D. von der Ahe, C. Nischan, C. Kunz, J. Otte, U. Knies, H. Oderwald and B. Wasylyk (1993).** Ets transcription factor binding site is required for positive and TNF alpha-induced negative promoter regulation. *Nucleic Acids Research*, 21 : 5636-5643.

**B. J. Wagner, T. E. Hayes, C. J. Hoban and B. H. Cochran (1990).** The SIF binding element confers sis/PDGF inducibility onto the c-fos promoter. *The EMBO Journal*, 9 : 4477-4484.

**U. M. Wallon and C. M. Overall (1997).** The hemopexin-like domain (C domain) of human gelatinase A (matrix metalloproteinase-2) requires Ca<sup>2+</sup> for fibronectin and heparin binding. Binding properties of recombinant gelatinase A C domain to extracellular matrix and basement membrane components. *The Journal of Biological Chemistry*, 272 : 7473-7481.

**H. G. Wang, Y. Rikitake, M. C. Carter, P. Yaciuk, S. E. Abraham, B. Zerler and E. Moran (1993).** Identification of specific adenovirus E1A N-terminal residues critical to the binding of cellular proteins and to the control of cell growth. *Journal of Virology*, 67 : 476-488.

**C. Wasylyk and B. Wasylyk (1993).** Oncogenic conversion of Ets affects redox regulation in-vivo and in-vitro. *Nucleic Acids Research*, 21 : 523-529.

**B. Wasylyk, S. L. Hahn and A. Giovane (1993).** The Ets family of transcription factors. *European Journal of Biochemistry*, 211 : 7-18.

**B. Wasylyk, C. Wasylyk, P. Flores, A. Begue, D. Leprince and D. Stéhelin (1990).** The c-ets proto-oncogenes encode transcription factors that cooperate with c-Fos and c-Jun for transcriptional activation. *Nature*, 346 : 191-193.

**C. Wasylyk, J. P. Kerckaert and B. Wasylyk (1992).** A novel modulator domain of Ets transcription factors. *Genes and Development*, 6 : 965-974.

**C. Wasylyk, S. M. Maira, P. Sobieszczuk and B. Wasylyk (1994).** Reversion of Ras transformed cells by Ets transdominant mutants. *Oncogene*, 9 : 3665-3673.

**C. Wasylyk and B. Wasylyk (1992).** Oncogenic conversion alters the transcriptional properties of ets. *Cell Growth and Differentiation*, 3 : 617-625.

**D. K. Watson, M. J. McWilliams, P. Lapis, J. A. Lautenberger, C. W. Schweinfest and T. S. Papas (1988).** Mammalian ets-1 and ets-2 genes encode highly

conserved proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 85 : 7862-7866.

**D. K. Watson, L. Robinson, D. R. Hodge, I. Kola, T. S. Papas and A. Seth (1997).** FLI1 and EWS-FLI1 function as ternary complex factors and ELK1 and SAP1a function as ternary and quaternary complex factors on the Egr1 promoter serum response elements. *Oncogene*, 14 : 213-221.

**J. F. Welter, J. F. Crish, C. Agarwal and R. L. Eckert (1995).** Fos-related antigen (Fra-1), junB, and junD activate human involucrin promoter transcription by binding to proximal and distal AP1 sites to mediate phorbol ester effects on promoter activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 270 : 12614-12622.

**Z. Werb, C. M. Alexander and R. R. Adler (1992).** Expression and function of matrix metalloproteinases in development. *Matrix. Supplement*, 1 : 337-343.

**Z. Werb, P. M. Tremble, O. Behrendtsen, E. Crowley and C. H. Damsky (1989).** Signal transduction through the fibronectin receptor induces collagenase and stromelysin gene expression. *The Journal of Cell Biology*, 109 : 877-889.

**J. Westermarck, A. Seth and V. M. Kahari (1997).** Differential regulation of interstitial collagenase (MMP-1) gene expression by ETS transcription factors. *Oncogene*, 14 : 2651-2660.

**L. A. White and C. E. Brinckerhoff (1995).** Two activator protein-1 elements in the matrix metalloproteinase-1 promoter have different effects on transcription and bind Jun D, c-Fos, and Fra-2. *Matrix Biology*, 14 : 715-725.

**M. Wick, C. Burger, S. Brusselbach, F. C. Lucibello and R. Muller (1994).** A novel member of human tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) gene family is regulated during G1 progression, mitogenic stimulation, differentiation, and senescence. *The Journal of Biological Chemistry*, 269 : 18953-18960.

**M. Wick, R. Haronen, D. Mumberg, C. Burger, B. R. Olsen, M. L. Budarf, S. S. Apte and R. Muller (1995).** Structure of the human TIMP-3 gene and its cell cycle-regulated promoter. *Biochemical Journal*, 311 : 549-554.

**A. F. Wilks, A. G. Harpur, R. R. Kurban, S. J. Ralph, G. Zurcher and A. Ziemiecki (1991).** Two novel protein-tyrosine kinases, each with a second phosphotransferase-related catalytic domain, define a new class of protein kinase. *Molecular and Cellular Biology*, 11 : 2057-2065.

**H. Will, S. J. Atkinson, G. S. Butler, B. Smith and G. Murphy (1996).** The soluble catalytic domain of membrane type 1 matrix metalloproteinase cleaves the

propeptide of progelatinase A and initiates autoproteolytic activation. Regulation by TIMP-2 and TIMP-3. *The Journal of Biological Chemistry*, 271 : 17119-17123.

**H. Will and B. Hinzmann (1995).** cDNA sequence and mRNA tissue distribution of a novel human matrix metalloproteinase with a potential transmembrane segment. *European Journal of Biochemistry*, 231 : 602-608.

**F. Willenbrock, T. Crabbe, P. M. Slocombe, C. W. Sutton, A. J. Docherty, M. I. Cockett, M. O'Shea, K. Brocklehurst, I. R. Phillips and G. Murphy (1993).** The activity of the tissue inhibitors of metalloproteinases is regulated by C-terminal domain interactions: a kinetic analysis of the inhibition of gelatinase A. *Biochemistry*, 32 : 4330-4337.

**J. A. Williams (1992).** Disintegrins: RGD-containing proteins which inhibit cell/matrix interactions (adhesion) and cell/cell interactions (aggregation) via the integrin receptors. *Pathologie Biologie*, 40 : 813-821.

**C. L. Wilson and L. M. Matrisian (1996).** Matrilysin: an epithelial matrix metalloproteinase with potentially novel functions. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 28 : 123-136.

**L. J. Windsor, H. Grenett, B. Birkedal-Hansen, M. K. Bodden, J. A. Engler and H. Birkedal-Hansen (1993).** Cell type-specific regulation of SL-1 and SL-2 genes. Induction of the SL-2 gene but not the SL-1 gene by human keratinocytes in response to cytokines and phorbol esters. *The Journal of Biological Chemistry*, 268 : 17341-17347.

**J. P. Witty, S. McDonnell, K. J. Newell, P. Cannon, M. Navre, R. J. Tressler and L. M. Matrisian (1994).** Modulation of matrilysin levels in colon carcinoma cell lines affects tumorigenicity in vivo. *Cancer Research*, 54 : 4805-4812.

**J. P. Witty, J. H. Wright and L. M. Matrisian (1995).** Matrix metalloproteinases are expressed during ductal and alveolar mammary morphogenesis, and misregulation of stromelysin-1 in transgenic mice induces unscheduled alveolar development. *Molecular and Cellular Biology*, 6 : 1287-1303.

**J. F. Woessner, Jr (1991).** Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB Journal*, 5 : 2145-2154.

**C. Wolf, O. Lefebvre, N. Rouyer, M. P. Chenard, J. P. Bellocq, M. C. Rio, P. Chambon and P. Basset (1994).** Protéases d'origine stromale et progression tumorale. *Médecine / Sciences*, 10 : 507-515.

**G. Wolf (1992).** The molecular basis of the inhibition of collagenase by vitamin A. *Nutrition Reviews*, 50 : 292-294.

**T. G. Wolfsberg, P. Primakoff, D. G. Myles and J. M. White (1995).** ADAM, a novel family of membrane proteins containing A Disintegrin And Metalloprotease domain : multipotential functions in cell-cell and cell-matrix interactions. *The Journal of Biological Chemistry*, 131 : 275-278.

**H. K. Wong and E. B. Ziff (1994).** Complementary functions of E1a conserved region 1 cooperate with conserved region 3 to activate adenovirus serotype 5 early promoters. *Journal of Virology*, 68 : 4910-4920.

**D. B. Woods, J. Ghysdael and M. J. Owen (1992).** Identification of nucleotides preferences in DNA sequence recognised specifically by c-Ets-1 protein. *Nucleic Acids Research*, 20 : 699-704.

**J. H. Wright, S. McDonnell, G. Portella, G. T. Bowden, A. Balmain and L. M. Matrisian (1994).** A switch from stromal to tumor cell expression of stromelysin-1 mRNA associated with the conversion of squamous to spindle carcinomas during mouse skin tumor progression. *Molecular Carcinogenesis*, 10 : 207-215.

**J. K. Wright, T. E. Cawston and B. L. Hazleman (1991).** Transforming growth factor beta stimulates the production of the tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) by human synovial and skin fibroblasts. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1094 : 207-210.

**H. Wu, K. Moulton, A. Horval, S. Parik and C. Glass (1994).** Combinatorial interactions between AP-1 and ets domain proteins contribute to the developmental regulation of the macrophage scavenger receptor gene. *Molecular and Cellular Biology*, 14 : 2129-2139.

**J. Xing, D. D. Ginty and M. E. Greenberg (1996).** Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science*, 273 : 959-963.

**H. Yamamoto, F. Itoh, Y. Hinoda and K. Imai (1995).** Suppression of matrilysin inhibits colon cancer cell invasion *in vitro*. *International Journal of Cancer*, 61 : 218-222.

**M. Yamamoto, S. Mohanam, R. Sawaya, G. N. Fuller, M. Seiki, H. Sato, Z. L. Gokaslan, L. A. Liotta, G. L. Nicolson and J. S. Rao (1996).** Differential expression of membrane-type matrix metalloproteinase and its correlation with gelatinase A activation in human malignant brain tumors *in vivo* and *in vitro*. *Cancer Research*, 56 : 384-392.

**B. S. Yang, C. A. Hauser, G. Henkel, M. S. Colman, B. C. Van, K. J. Stacey, D. A. Hume, R. A. Maki and M. C. Ostrowski (1996).** Ras-mediated

phosphorylation of a conserved threonine residue enhances the transactivation activities of c-Ets1 and c-Ets2. *Molecular and Cellular Biology*, 16 : 538-547.

**M. Yang and M. Kurkinen (1994).** Different mechanisms of regulation of the human stromelysin and collagenase genes. Analysis by a reverse-transcription-coupled-PCR assay. *European Journal of Biochemistry*, 222 : 651-658.

**T. T. Yang and S. P. Hawkes (1992).** Role of the 21-kDa protein TIMP-3 in oncogenic transformation of cultured chicken embryo fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 89 : 10676-10680.

**H. F. Yang-Yen, J. C. Chambard, Y. L. Sun, T. Smeal, T. J. Schmidt, J. Drouin and M. Karin (1990).** Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell*, 62 : 1205-1215.

**J. Yen, R. M. Wisdom, I. Tratner and I. M. Verma (1991).** An alternative spliced form of FosB is a negative regulator of transcriptional activation and transformation by Fos proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 88 : 5077-5081.

**H. Yoshiji, D. E. Gomez and U. P. Thorgeirsson (1996).** Enhanced RNA expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in human breast cancer. *International Journal of Cancer*, 69 : 131-134.

**B. Zelger, R. Frank, G. Kemmler and P. Fritsch (1990).** Retinoid-induced changes of the bones and ligaments. *Hautarzt*, 41 : 537-544.

