

**Université des Sciences et Technologies de Lille**

**THESE**

**Présentée pour l'obtention du grade de  
Docteur de l'Université en Sciences de la Vie et de la Santé**

**par Hélène PELCZAR**

**Mutants conditionnels des facteurs de  
transcription du groupe PEA3 :  
des outils pour caractériser leurs gènes cibles**

Soutenue le 12 décembre 1997 devant la commission d'examen :

|                      |                              |
|----------------------|------------------------------|
| <b>Président :</b>   | <b>Pr Jean-Pierre BOHIN</b>  |
| <b>Rapporteurs :</b> | <b>Pr Marie AUDETTE</b>      |
|                      | <b>Pr Yves MOREL</b>         |
| <b>Examineurs :</b>  | <b>Pr Dominique STEHELIN</b> |
|                      | <b>Pr Yvan de LAUNOIT</b>    |



**Je voudrais remercier,**

*les membres du jury qui ont accepté de juger mon travail de thèse : Jean-Pierre Bohin, dont je souhaitais la participation en tant que président, Marie Audette et Yves Morel, pour leur diligence dans l'exercice de leur fonction de rapporteur. Ensuite, parce que la thèse est une formation pratique par la recherche, je voudrais remercier Dominique Stéhelin pour avoir aussi accepté mon arrivée en thèse et m'avoir permis d'assumer un parcours contrarié par une réorientation thématique. Dans ce parcours, Yvan, sois assuré que ce mémoire est aussi là pour te remercier des trois années et demi que j'ai passées dans ton groupe, dans le confort inestimable de ton soutien.*

*Si la thèse est un apprentissage professionnel, elle vaut aussi en tant que formation humaine.*

*Chacun des membres du laboratoire a apporté un jour ou l'autre sa contribution personnelle à l'un ou l'autre de ces aspects de "ma thèse". C'est un exercice difficile de formuler justement les remerciements qui refléteraient la diversité de leur côté formateur. Merci à la joyeuse équipe des dames de la laverie, pour la constance de leur enthousiasme et leur professionnalisme. Merci encore aux « Incontournables » qui faciliteront longtemps la vie des stagiaires en tout genre de passage au laboratoire : Agnès et ses secrets de "microbio-alchimie", Christian et sa force tranquille, Chantal et son organisation, Brigitte et ses lasers, Thierry et son assurance efficace quant aux relations commerciales extérieures, Nicole et Marie-Christine dont on ne sait jamais où elles cachent leurs réserves de disponibilité et Martin sur la tangente, à part, dont l'abord un peu revêche cache une source d'oxygène pour s'attaquer aux manips récalcitrantes, entre autre. Plus globalement maintenant, merci à tous et à toutes, de m'avoir donné une place dans ce laboratoire.*

*Par exemple, je peux le dire aujourd'hui, j'ai été discrètement fière d'être celle qui n'a pas reçu de surnom dans le groupe. Je n'ai pas pu échapper, en revanche, à l'étiquetage qui décrit l'acquisition en fin de thèse, du "mauvais esprit" dit "de fin de thèse". Avec certains interlocuteurs, cela reste évidemment un trait d'humour. Je suis pourtant mal à l'aise devant le caractère sérieux et définitif de cette étiquette. Et il me reste au moins une question à poser, à ce sujet, à mes pairs expérimentés : comment, si cela s'attrape systématiquement en fin de thèse, cela se perd-il? En fait, je profite des derniers instants de ma "fin de thèse" pour souligner combien il me semble important de rester vigilant à une qualité de dialogue, indispensable à un certain dynamisme intellectuel.*

*Maintenant, je voudrais restreindre l'amplitude de ces remerciements au cercle plus proche des personnes dont la présence et les attentions rendent le quotidien forcément plus léger, forcément plus gai, bref qui tempèrent les fluctuations d'humeur qui auraient sinon plutôt tendance à suivre l'inconstance des résultats expérimentaux.*

*Elisabeth, et le bon sens joyeux ou grave, l'humour et les éclats de rire, la gentillesse. Frédérique, sans complexe, à l'énergie débordante et avec un sens rare des sketch réalistes, tendance ch'ti. Marie, toujours présente pour un coup de main, comme ça, comme par exemple pour une liste d'abréviations (j'avoue). Guillaume, ouvert tout simplement.*

*Zou, voisine de bureau, partenaire de fin de parcours, c'est revigorant d'être le témoin de ta motivation déterminée.*

*Claire et Zou, Zou et Claire, je crois bien que ce mémoire aurait perdu en lisibilité sans votre lecture patiente : je me souviendrais longtemps de vos regards un peu désolés pour me demander "ce que, exactement, je voulais écrire" et m'encourager à le faire...*

*Claire, pour ta disponibilité à toute épreuve, ton enthousiasme têtu, ta fantaisie débridée.*

*Olivier, à l'équilibre des qualités humaines et scientifiques dans l'aide déterminante que tu m'as apportée à l'occasion d'une série de clonages à quatre mains, ou à travers ton don pour une critique constructive et enrichissante.*

*Philippe, merci pour tout ce que tu m'as apporté d'écoute et de discussions (cela m'a aidé à savoir ce que je voulais écrire dans ce mémoire), d'aide à dépasser les hésitations dont tu as sans doute été le seul témoin.*

*Je tiens aussi à faire une place dans ces remerciements à mes amis, à mes parents, à ma famille, pour leur présence constante et rassurante, à mon grand-père dont je recevais comme un cadeau la fierté de me voir grandir.*

## Abréviations

- ADN : Acide Désoxyribonucléique
- ADNc : Acide Désoxyribonucléique complémentaire
- AF1 ou 2 : Activation Function 1 ou 2
- AMP : Adénosine Monophosphate
- ARN : Acide Ribonucléique
- Boîte PU : Séquence riche en purine
- CTD pol.II : C-Terminal Domain polymerase type II
- DLH : Domaine de Liaison de l'Hormone
- ET : Ewing Tumor
- ERE : Estrogene Responsive Element
- FV : Friend Virus
- F-MuLV : Friend Murine Leukaemia Virus
- GABP : GA Binding Protein
- HIV-1 : Human Immuno-deficiency Virus 1
- HSV-1 : Herpes Simplex Virus-1
- HTLV1 : Human T-cell Leukemia Virus type I
- ICAM I : Intercellular Adhesion Molecule I
- IFN : Interféron
- kb : kilobase
- kDa : kiloDalton
- LTR : Long Terminal Repeat
- MMTV : Mouse Mammary Tumor Virus
- pb : paire de bases
- PCR : Polymerase Chain Reaction
- RGG : Séquence peptidique Arginine-Glycine-Glycine

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

RRM : RNA Recognition Motif

SFFV : Spleen Focus Forming Virus

SRE : Serum Responsive Element

SRF : Serum Responsive Factor

Tam : Tamoxifène

TBP : Tata Binding Protein

TCF : Ternary Complex Factor

TDA : Target Detection Assay

TNF $\alpha$  : Tumor Necrosis Factor  $\alpha$

4-OHT : 4 hydroxy-tamoxifène

**Attention**, tout au long du texte de ce mémoire, pour plus de commodités d'écriture en rapport avec le sujet, les abréviations ER et GR ne font pas référence aux récepteurs aux oestrogènes et aux glucocorticoïdes, mais à leur région C-terminale respective qui comporte le domaine de liaison de l'hormone et qui a été utilisée dans la construction de protéines de fusion.

Par convention, les gènes sont notés *en italique*, les protéines commencent par une majuscule. Les noms usuels des gènes ont été préférés aux noms de la nouvelle nomenclature non usitée.

## Présentation du mémoire

La présentation de mon travail de thèse se structure en deux parties, l'introduction et l'exposé des résultats.

Ce travail s'inscrit dans l'étude des facteurs de transcription du groupe PEA3 de la famille Ets. Pour l'introduction, j'ai choisi de présenter tout d'abord les travaux qui ont permis l'isolement des différents gènes qui codent les protéines de la famille Ets. Même si la famille Ets se définit sur des données de structure primaire, la présence d'un motif conservé de 85 acides aminés conservés avec un taux d'identité de séquence supérieur à 30%, c'est aussi une famille homogène d'un point de vue fonctionnel. Les protéines Ets sont des facteurs de transcription spécifiques. Les travaux de clonage illustrent à grands traits leurs propriétés communes ou spécifiques vis-à-vis de leurs propriétés de facteurs de transcription. Ensuite, avec l'exemple des protéines Ews-Ets, j'ai voulu présenter un exemple de protéine Ets, caractérisée en tant que facteur de transcription spécifique et qui permet à mon sens de discuter de cette définition acceptée pour chacune des protéines Ets. Je n'ai fait qu'évoquer les données qui permettent d'intégrer les protéines Ets à différentes voies de signalisation cellulaire.

Afin d'introduire le choix de la construction d'un mutant inductible de la protéine Ets, Erm, par fusion au domaine de liaison de l'hormone, il m'a semblé utile de présenter les travaux d'application de cette stratégie à d'autres protéines. Cette partie se développe ainsi en une présentation historique de la mise en place de cette démarche, suivi des données qui définissent les limites de ce type de mutant inductible. Elle se finit par la présentation d'un aspect qui est peu utilisé, au regard des différents chimères : l'utilisation d'anti-oestrogènes purs pour réguler les fonctions portées par la protéine sauvage correspondante.

Les résultats sont présentés sous la forme de deux publications récemment acceptées et qui s'intègrent à l'étude des facteurs de transcription du groupe PEA3 de la famille Ets, dont les titres sont :

- La transcription du gène codant la protéine ICAM-1 est régulée par les facteurs de transcription de type Ets.

- Un mutant conditionnel du facteur de transcription de type Ets, Erm, par fusion au domaine de liaison du ligand du récepteur aux oestrogènes.

Le texte des deux articles est précédé d'une courte présentation des protéines du groupe PEA3. Il est suivi par quelques éléments de discussion, sur la base des résultats exposés et de quelques autres données préliminaires obtenues depuis, dont l'argumentation a été introduite dans le cadre de la partie introductive de ce mémoire.

En annexe, j'ai placé deux publications qui sont une revue récente sur les membres du groupe PEA3, et la caractérisation du patron d'expression transcriptionnelle des gènes *erm*, *er81* et *pea3* au cours du développement embryonnaire de souris à l'aide de la technique d'hybridation *in situ*.

## Table des matières

|  |    |
|--|----|
| Page de titre  | 1  |
| Remerciements  | 2  |
| Abréviations   | 4  |
| Présentation du mémoire  | 6  |
| Table des matières   | 8  |
| Liste des figures et tableau                                       | 14 |
| Liste des annexes  | 15 |
| <br>   |    |
| <b>INTRODUCTION</b>  | 16 |
| <br>   |    |
| La transformation cellulaire cancéreuse : étude moléculaire        | 16 |
| Définition moléculaire de la famille Ets                           | 16 |
| <br>   |    |
| <b>I CONSTRUCTION DE LA FAMILLE ETS</b>                            | 18 |
| <br>   |    |
| <b>IA Recherche <i>a priori</i> de gènes <i>ets</i></b>            | 18 |
| <b>IA1</b> <i>v-ets</i> : mise en lumière                          | 18 |
| <b>IA2</b> Criblage de banque d'ADN complémentaire                 | 20 |
| <b>IA3</b> Utilisation de séquences <i>ets</i> oligonucléotidiques | 20 |
| En conclusion,   | 21 |

|             |   |           |
|-------------|---|-----------|
| <b>IB</b>   | <b>Le premier gène <i>ets</i> cloné sans préméditation <i>spi.1/pu-1</i></b>  | <b>21</b> |
| <b>IB1</b>  | Les gènes <i>ets</i> dans l'inconnu   | 21        |
| <b>IB2</b>  | Les gènes <i>ets</i> codent des facteurs de transcription spécifiques   | 22        |
| <b>IB3</b>  | Le domaine <i>Ets</i> est un domaine fonctionnel  | 22        |
| <b>IB4</b>  | On a cloné <i>spi-1/pu.1</i>  | 25        |
|             | En conclusion,  | 25        |
| <b>IC</b>   | <b>Les autres clonages fonctionnels de gènes de la famille <i>Ets</i></b>   | <b>26</b> |
| <b>IC1</b>  | Clonage par criblage de banques d'expression  | 26        |
| <b>IC1a</b> | GABP $\alpha$   | 26        |
| <b>IC1b</b> | p62 <sup>TCF</sup> et les protéines du groupe <i>Elk</i>  | 27        |
| <b>IC2</b>  | Clonage d'oncogènes de la famille <i>Ets</i> .  | 29        |
| <b>IC2a</b> | <i>Tel</i> , un domaine fonctionnel unique au sein d'une protéine <i>Ets</i> .  | 29        |
|             | Les différentes translocations humaines impliquant le gène <i>tel</i> .   | 29        |
|             | Le domaine B de <i>Tel</i>  | 30        |
| <b>IC2b</b> | <i>spi-1/pu.1</i> et <i>fli-1</i> les oncogènes de la famille <i>Ets</i> impliqués chez la souris dans le développement de la leucémie de Friend. | 31        |
|             | L'érythro-leucémie de Friend  | 31        |
|             | La protéine gp55 et l'indépendance à l'érythropoïétine  | 31        |
|             | <i>spi-1/pu.1</i> et <i>fli-1</i> et la transformation cancéreuse de précurseurs érythrocytaires  | 32        |
| <b>II</b>   | <b>LES PROTEINES ETS, COMPTE-TENU DES TRANSLOCATIONS ASSOCIÉES AUX TUMEURS D'EWING</b>  | <b>34</b> |
| <b>IIA</b>  | <b>Les translocations associées aux tumeurs d'Ewing</b>   | <b>34</b> |
| <b>IIA1</b> | <i>ews-fli-1</i>  | 34        |
| <b>IIA2</b> | Les gènes <i>ets</i> réarrangés dans les tumeurs d'Ewing  | 35        |
| <b>IIA3</b> | Les protéines "Ews-Ets"   | 37        |
|             | En conclusion,  | 38        |

|               |   |           |
|---------------|---|-----------|
| <b>II B</b>   | <b>Les protéines chimères Ews-Fli-1 et Tls-Erg sont des protéines transformantes</b>  | <b>38</b> |
| <b>II B1</b>  | Les protéines "Ews-Ets" ou "Tls-Ets" transforment les cellules NIH3T3   | 39        |
| <b>II B2</b>  | Les protéines "Ews-Ets" ou "Tls-Ets" permettent le maintien en prolifération de cellules de lignées dérivées de tumeurs d'Ewing | 39        |
|               | En conclusion,  | 40        |
| <b>II C</b>   | <b>Quelles fonctions pour les protéines Ews-Ets et Tls-Erg?</b>   | <b>41</b> |
| <b>II C1</b>  | Les protéines "Ews-Ets" ou "Tls-Ets" sont des facteurs de transcription.  | 41        |
| <b>II C2</b>  | ... sont des facteurs de transcription aux gènes cibles spécifiques.  | 43        |
| <b>II C3</b>  | ... sont des facteurs de transcription spécifiques. Oui, mais...  | 44        |
|               | En conclusion   | 45        |
| <b>II D</b>   | <b>En lisière de la forêt de facteurs de transcription Ets</b>  | <b>46</b> |
| <b>II D1</b>  | Définir un facteur de transcription spécifique  | 49        |
| <b>II D1a</b> | <i>Les sites spécifiques de reconnaissance</i>  | 47        |
| <b>II D1b</b> | <i>Les domaines de transactivation</i>  | 47        |
| <b>II D2</b>  | Etudier le pouvoir transformant des oncogènes   | 49        |
| <b>II D2a</b> | <i>La transformation en système cellulaire</i>  | 49        |
| <b>II D2b</b> | <i>Les étapes d'une tumorigenèse</i>  | 50        |
| <b>II D3</b>  | Les protéines "Ews-Ets" et "Tls-Ets", des facteurs de transcription spécifiques ou quoi d'autre?                                | 50        |
| <b>II D3a</b> | <i>Une nouvelle famille de gènes: la famille Ews/Tls</i>  | 50        |
| <b>II D3b</b> | <i>Tat-SF-1, SARFH et TAFII68 et l'activation basale 16 de la transcription</i>   | 51        |
| <b>II D3c</b> | <i>Des protéines intervenant dans la maturation des ARN messagers</i>   | 52        |
|               | En conclusion,  | 54        |

|               |   |           |
|---------------|---|-----------|
| <b>III</b>    | <b>REGULATION PAR FUSION AUX DOMAINES DE LIAISON DE L'HORMONE DES RECEPTEURS NUCLEAIRES</b>                             | <b>54</b> |
|               | Quelques généralités sur les récepteurs nucléaires  | 55        |
| <b>IIIA</b>   | <b>Les domaines fonctionnels du récepteur aux oestrogènes et du récepteur aux glucocorticoïdes : définition</b>         | <b>56</b> |
| <b>IIIA1</b>  | Le clonage  | 56        |
| <b>IIIA2</b>  | L'étude classique   | 58        |
| <b>IIIB</b>   | <b>Etude à l'aide des systèmes rapporteurs de l'activité de facteur de transcription</b>                                | <b>60</b> |
| <b>IIIB1</b>  | En mutant la région C : le domaine de liaison à l'ADN   | 60        |
| <b>IIIB2</b>  | En délétant la région E : le domaine AF1 et quelques hypothèses quant au contrôle hormonal de l'activité des récepteurs | 61        |
| <b>IIIB3</b>  | Quelques chimères pour, entre autre, localiser le domaine de transactivation AF2  | 62        |
| <b>IIIB4</b>  | L'autonomie du domaine de liaison de l'hormone  | 65        |
| <b>IIIB5</b>  | La mutation Val400  | 65        |
|               | En Conclusion,  | 66        |
| <b>IIIC</b>   | <b>Régulation par fusion aux domaines de liaison de l'hormone de récepteurs nucléaires : les exemples</b>               | <b>67</b> |
| <b>IIIC1</b>  | Les domaines de liaison de l'hormone (DLH) utilisés   | 67        |
| <b>IIIC1a</b> | <i>Le DLH du récepteur aux oestrogènes</i>  | 67        |
| <b>IIIC1b</b> | <i>Le DLH du récepteur à l'hormone thyroïdienne</i>   | 68        |
| <b>IIIC1c</b> | <i>Le DLH du récepteur aux minéralocorticoïdes</i>  | 69        |
| <b>IIIC1d</b> | <i>Le DLH du récepteur à l'acide rétinoïque</i>   | 69        |
| <b>IIIC1e</b> | <i>Le DLH du récepteur à l'ecdysone</i>   | 69        |
|               | En conclusion,  | 70        |

|                |   |           |
|----------------|---|-----------|
| <b>III C2</b>  | <b>Les protéines fusionnées</b>   | <b>71</b> |
| <b>III C2a</b> | <i>Les possibilités techniques de l'outil chimère</i>   | <b>71</b> |
| <b>III C2b</b> | <i>Quelques exemples de régulation fonctionnelle partielle</i>  | <b>78</b> |
| -              | <b>Influence de la position du domaine régulateur</b>   | <b>78</b> |
| -              | <b>Influence du mode d'expression stable ou transitoire des protéines chimères</b>                                | <b>78</b> |
| -              | <b>Des propriétés non régulées</b>  | <b>79</b> |
| <b>III C2b</b> | <i>Quelques exemples de différences fonctionnelles entre la protéine sauvage et le mutant conditionnel activé</i> | <b>79</b> |
| -              | <b>Influence du domaine de transactivation AF2</b>  | <b>80</b> |
| -              | <b>Influence de l'interface de dimérisation</b>   | <b>80</b> |
| -              | <b>Contrevenir à l'influence du domaine de transactivation AF2</b>  | <b>80</b> |
| <b>III C3</b>  | <b>Les chimères ER et l'utilisation des anti-oestrogènes</b>  | <b>82</b> |
| <b>III C3a</b> | <i>Introduction aux anti-oestrogènes et rappel concernant les chimères GalER et GalGR</i>                         | <b>82</b> |
| <b>III C3b</b> | <i>L'utilisation de l'ICI et du 4OHT</i>  | <b>83</b> |
| -              | <b>Activité vis-à-vis des propriétés de transactivation</b>   | <b>83</b> |
| -              | <b>Activité vis-à-vis de la liaison à l'ADN</b>   | <b>84</b> |
| <b>III C3c</b> | <i>La classification proposée par Mc Donnell</i>  | <b>85</b> |
| <b>III C3d</b> | <i>Des cofacteurs spécifiques des complexes anti-hormone /récepteur</i>   | <b>85</b> |
|                | <b>En conclusion,</b>   | <b>87</b> |

## **BUT DU TRAVAIL ET RESULTATS** **88**

### **I LES MEMBRES DU GROUPE PEA3 DE LA FAMILLE Ets** **88**

#### **IA Le groupe PEA3 : sa constitution** **88**

|             |  |            |
|-------------|--|------------|
| <b>IB</b>   | <b>Les données de caractérisation moléculaire</b>  | <b>89</b>  |
| <b>IC</b>   | <b>Quelques données fonctionnelles</b>   | <b>90</b>  |
| <b>II</b>   | <b>LE SUJET DE CE MEMOIRE EN SITUATION</b>   | <b>91</b>  |
| <b>III</b>  | <b>RESULTATS</b>   | <b>92</b>  |
| <b>IIIA</b> | <b>Régulation transcriptionnelle du gène ICAM-1 par les facteurs de transcription de la famille Ets</b>      | <b>92</b>  |
| <b>IIIB</b> | <b>Construction d'un facteur de transcription à activité conditionnelle du groupe PEA3 de la famille Ets</b> | <b>94</b>  |
| <b>IIIC</b> | <b>Articles</b>  | <b>96</b>  |
|             | <b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES</b>  | <b>97</b>  |
|             | <b>REFERENCES</b>  | <b>102</b> |
|             | <b>ANNEXES</b>   | <b>120</b> |

## Liste des figures et tableau

|   |    |
|---|----|
| <b>Figure 1</b> : La famille Ets et ses différents groupes.   | 17 |
| <b>Figure 2</b> : Matrice des taux d'identité de séquence protéique partagés entre les domaines Ets codés par différents gènes de la famille Ets, pris deux à deux et exprimés en %.                        | 19 |
| <b>Figure 3</b> : Les séquences optimisées de liaison à l'ADN <i>in vitro</i> .   | 24 |
| <b>Figure 4</b> : La protéine Ews et les différentes protéines Ets impliquées dans les tumeurs d'Ewing.   | 36 |
| <b>Figure 5</b> : La protéine chimère Ews-Fli-1 est un facteur de transcription.  | 42 |
| <b>Figure 6</b> : Corrélation partielle pour diverses chimères entre leur pouvoir transactivateur en système de chimères Gal4 et leur pouvoir transformant en cellules NIH3T3                               | 45 |
| <b>Figure 7</b> : Modèle schématique d'allostérie des récepteurs nucléaires à ligand.   | 57 |
| <b>Figure 8</b> : Schéma d'organisation des récepteurs aux oestrogènes et aux glucocorticoïdes humains établi sur la base de la comparaison des séquences protéiques des deux récepteurs.                   | 59 |
| <b>Figure 9</b> : Principe de caractérisation des propriétés de transactivation d'un domaine protéique grâce aux chimères "Gal4".   | 63 |
| <b>Figure 10</b> : Le domaine de liaison de l'hormone des récepteurs de type stéroïdien comporte un domaine d'activation de la transcription AF2 dont l'activité est conditionnée par l'hormone appropriée. | 64 |
| <b>Figure 11</b> : Les apports d'un système inductible d'expression par rapport à un système d'expression constitutif.  | 72 |
| <b>Figure 12</b> : Caractère « direct » des cibles moléculaires de la protéine étudiée : exemple des facteurs de transcription spécifiques.   | 73 |
| <b>Tableau 1</b> : Les mutants conditionnels construits par fusion au domaine de liaison de l'hormone d'un récepteur nucléaire.   | 74 |

## Liste des annexes

Deux articles sont donnés en annexe :

Une revue concernant les membres du groupe PEA3 :

Structure-function relationships of the PEA3 group of Ets-related transcription factors. de Launoit, Y., Baert, J.L., Chotteau, A., Monté D., Defossez, P.A., Coutte, L., Pelczar, H. & Leenders, F. Minireview. *Bioch. Mol. Medicine*, 1997, 61: 127-135.

La pulication décrivant les patrons d'expression transcriptionnelle des trois membres du groupe PEA3 au cours du développement embryonnaire de souris, obtenus à l'aide de la technique d'hybridation *in situ* :

Differential expression patterns of the PEA3 group transcription factors through murine embryonic development. Chotteau-Lelièvre, A. Debiens, X., Pelczar, H., Defossez, P.A. & de Launoit, Y. *Oncogene*, 1997, 15: 937-952.

# INTRODUCTION

## La transformation cellulaire cancéreuse : étude moléculaire

L'étude des événements moléculaires associés à la transformation cellulaire cancéreuse a mis en évidence certains gènes intervenant dans les processus cellulaires de prolifération et/ou de différenciation ou encore de mort. L'étude des protéines que codent ces gènes a servi à la caractérisation de voies de signalisation cellulaires qui permettent l'intégration fonctionnelle de la cellule "normale" à son environnement. D'une façon schématique, les cascades d'interactions protéiques proposées relaient l'information extra-cellulaire depuis la membrane jusqu'aux protéines nucléaires effectrices de l'expression des gènes. Le relais ultime est constitué par les facteurs de transcription dits spécifiques, capables de reconnaître des séquences d'ADN particulières au sein des régions régulatrices de la transcription des gènes.

La transformation cellulaire cancéreuse est corrélée à l'altération d'un ou plusieurs de ces gènes par mutations ponctuelles, délétions, amplifications génique ou transcriptionnelle ou encore translocation chromosomique.

## Définition moléculaire de la famille Ets

L'étude du rétrovirus aviaire E26 responsable du développement de leucémies foudroyantes chez le poulet met en lumière la première séquence qui fonde la famille Ets, *v-ets* (Leprince *et al.*, 1983; Nunn *et al.*, 1983, pour une revue récente, voir Ghysdael & Boureux, 1997).

La famille Ets est une famille qui regroupe les protéines codées par plus de 30 gènes actuellement connus (voir fig.1). Ces protéines présentent toutes une séquence protéique de 85 acides aminés, appelée domaine Ets, et définie par le taux d'identité de séquence significatif partagé avec le domaine Ets de *v-Ets* (>33%). Elles semblent représentées, au sein du règne animal dès les

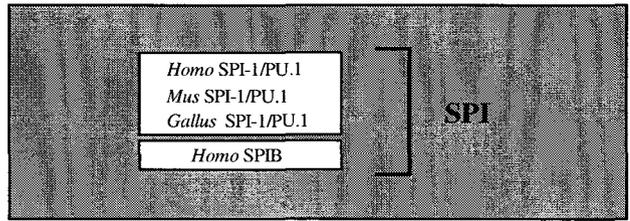
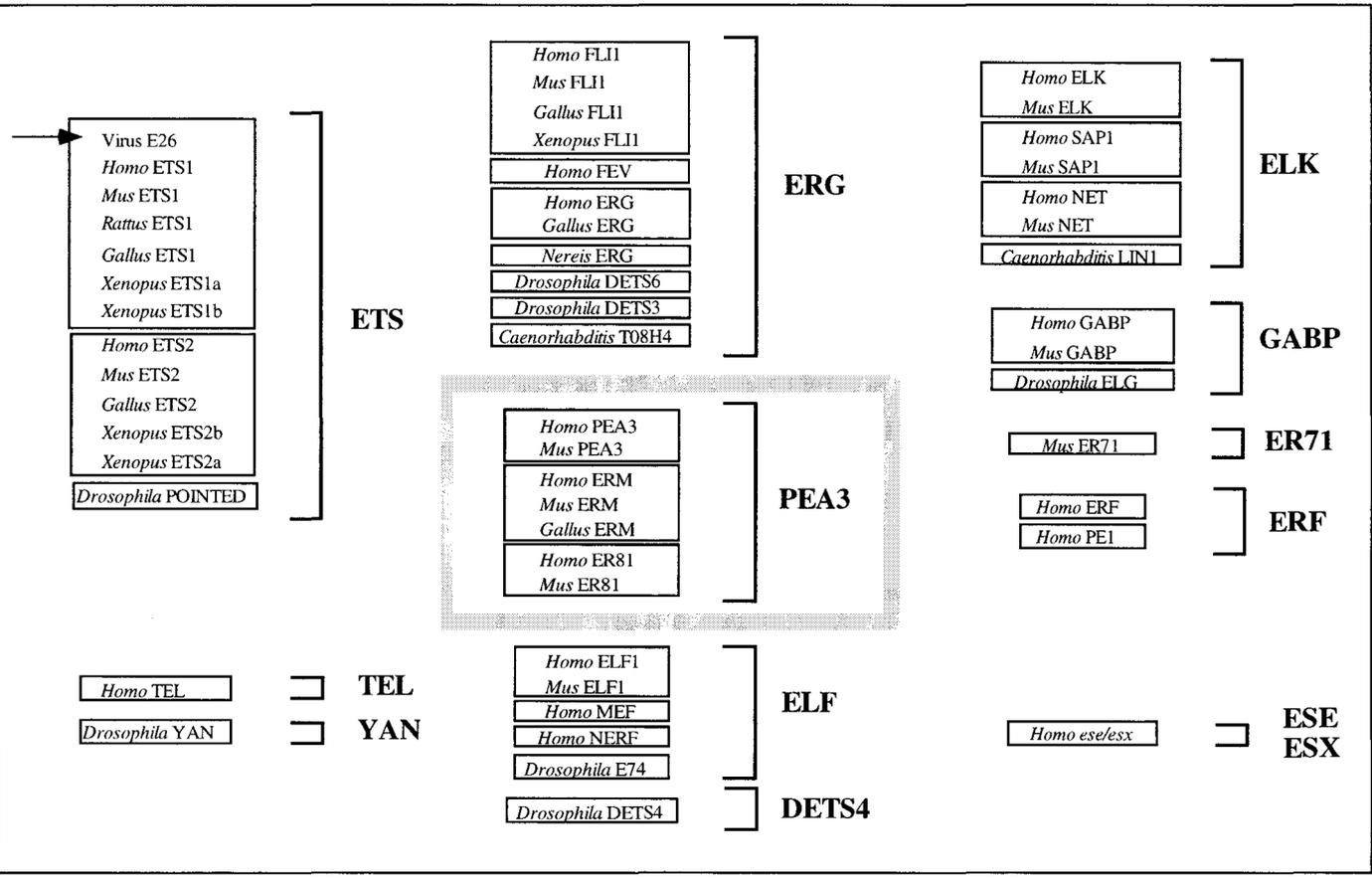


Figure 1 :

La famille Ets et ses différents groupes

Ce catalogue des gènes *ets* est le résultat d'une compilation d'après une actualisation des données de Lautenberger et *al.* 1993, Laudet et *al.* 1993 (communication personnelle de V Laudet) ainsi que des clonages récents de gènes de la famille Ets, *mef*, *nerf* et *ese/esx* (voir le texte pour les références).

métazoaires inférieurs, triploblastiques acoelomates comme les nématodes, et même diploblastiques comme les spongiaires (Degnan *et al.*, 1993). Sur la base de comparaison de séquences, les protéines Spi/Pu présentent les séquences du domaine Ets les plus divergentes de celles des autres membres de la famille (voir, à titre d'exemple, Chen *et al.*, 1992 pour une matrice récapitulative des taux d'identité de séquences, calculés à cette date, fig.2); en dehors des protéines Spi/Pu, les protéines de la famille Ets ont été classées en 9 groupes.

## **I CONSTRUCTION DE LA FAMILLE ETS**

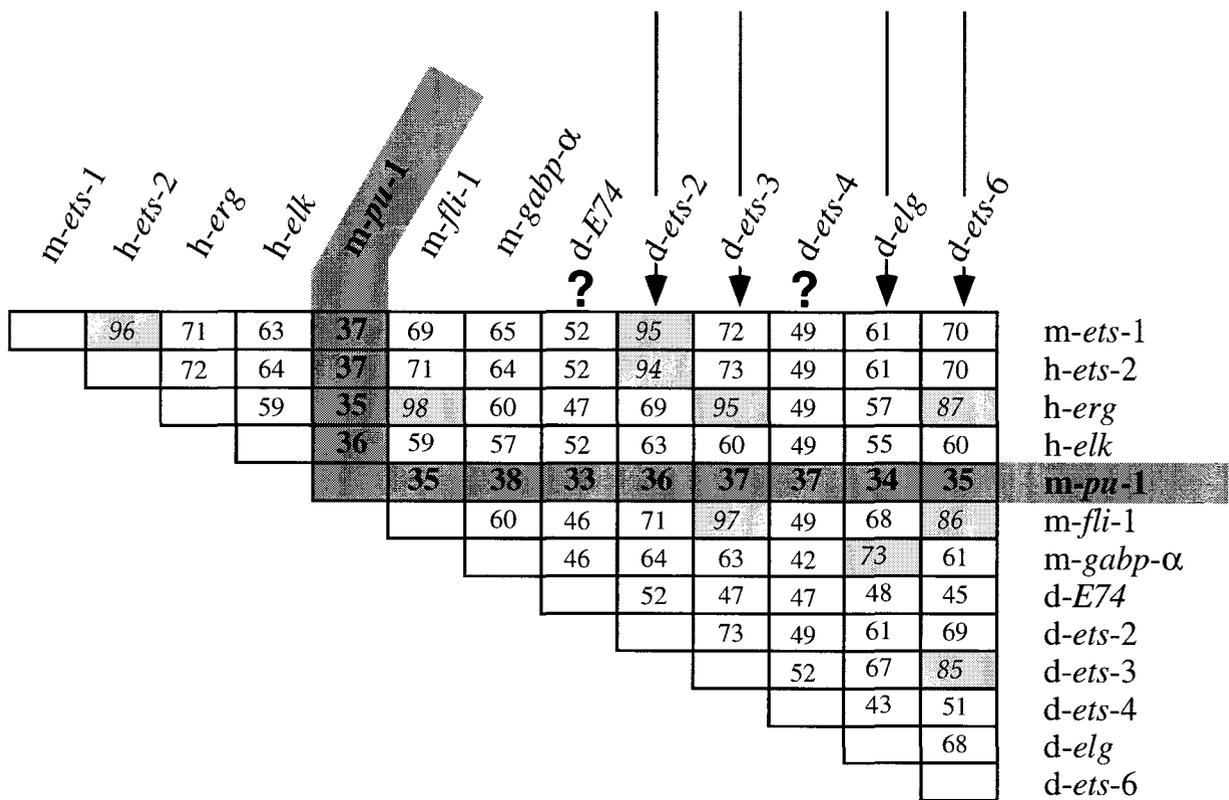
Concrètement, la famille Ets s'est édifiée sur la base des clonages moléculaires que l'on peut organiser comme la résultante de deux types d'études. Le premier type d'étude concerne celles dont les approches techniques limitent la recherche de nouveaux gènes à des gènes de la famille Ets. Elles permettent, *a priori*, uniquement l'identification de gènes *ets*. Le second type d'études regroupe les études menées sans *a priori* sur l'appartenance à la famille Ets des gènes clonés. Il concerne les gènes identifiés en relation avec des processus de tumorigenèse ainsi que ceux isolés au cours de criblages fonctionnels de banques, et qui se sont avérés être des gènes *ets*.

### **IA Recherche *a priori* de gènes *ets***

#### **IA1 *v-ets* : mise en lumière**

Dans le contexte de son isolement à partir du génome du virus aviaire oncogène E26, *v-ets* est une séquence originale qui ne partage pas de séquences avec d'autres gènes eucaryotes ou de virus déjà clonés, mais qui est capable d'hybridation spécifique avec des ARN de cellules de poulet (Leprince *et al.*, 1983). C'est ce qui définit *v-ets* comme un oncogène potentiel : c'est à dire une séquence d'ADN d'origine cellulaire, intégrée ici au génome du rétrovirus E26, et susceptible de jouer un rôle dans le développement des leucémies provoquées par ce virus (Leprince *et al.*, 1983; Nunn *et al.*, 1983).

La recherche du gène cellulaire de poulet (proto-oncogène) dont *v-ets* dérive est le premier travail de recherche *a priori* d'un gène *ets*.



**Figure 2 :**

**Matrice des taux d'identité de séquence protéique partagés entre les domaines Ets codés par différents gènes de la famille Ets, pris deux à deux et exprimés en %.**

Le domaine Ets du gène murin, *m-spi-1/pu.1*, présente les taux d'identité les plus faibles avec les séquences des domaines Ets des autres membres de la famille.

Sur la base des taux d'identité de séquence partagés avec les gènes de la famille Ets, les gènes de drosophile isolés par Chen et ses collaborateurs ont été associés à leurs homologues de vertébrés, lorsqu'ils étaient connus.

(Le gène *E74* fait partie du groupe Elf dont les autres membres ont été isolés ultérieurement)

Le nom des différents gènes est indiqué en italiques. L'espèce chez laquelle il a été cloné est indiquée par une initiale : h=humaine, m=murine, d=de drosophile.

(D'après Chen *et al.*, 1992)

## **IA2 Criblage de banque d'ADN complémentaire**

En fait, l'utilisation d'une sonde *v-ets* pour cribler une banque d'ADN complémentaire de poulet a permis d'identifier *ck-ets-1* (Leprince *et al.*, 1988; Watson *et al.*, 1988), le proto-oncogène correspondant à *v-ets* mais aussi *ck-ets-2* (Boulukos *et al.*, 1988; Watson *et al.*, 1988) très proche de *ck-ets-1*. Les gènes *h-ets-1* et *h-ets-2* chez l'homme (Watson *et al.*, 1988) et *d-ets-2* chez la drosophile (Pribyl *et al.*, 1988) ont aussi été isolés grâce à *v-ets*, ce qui illustre la large représentativité des gènes *ets* au sein du règne animal. Le clonage de nouveaux gènes humains, *h-erg* (Reddy *et al.*, 1987) puis *h-elk* (Rao *et al.*, 1989), grâce à une sonde *h-ets-2*, établit l'idée de l'existence de gènes, codant des protéines partageant toutes au moins le domaine Ets, et qui ont été regroupés sous le concept de "famille" Ets.

Ainsi, comme je viens de l'illustrer, les premiers membres de la famille Ets ont été isolés par l'intermédiaire du criblage de banques d'ADNc en utilisant tout d'abord *v-ets* comme sonde, puis, la famille s'agrandissant, en utilisant d'autres gènes *ets* identifiés.

## **IA3 Utilisation de séquences *ets* oligonucléotidiques**

En utilisant des couples d'oligonucléotides spécifiques du domaine Ets, d'autres gènes *ets* ont été clonés grâce à des expériences de PCR : à titre d'exemples, chez la drosophile *D-ets-3*, *D-ets-4*, *D-ets-6* (Chen *et al.*, 1992), chez l'homme *er71* (Brown & McKnight, 1992), *pe-1* (Klemsz *et al.*, 1994), *sap-2/net/lerp* du groupe Elk (Giovane *et al.*, 1994; Lopez *et al.*, 1994), *er81* et *erm* du groupe PEA3 (Brown and McKnight, 1992; Monté *et al.*, 1994), *mef* du groupe Elf (Miyazaki *et al.*, 1996). Cette technique a aussi permis la mise en évidence de séquences *ets* chez les métazoaires inférieurs (Degnan *et al.*, 1993).

### **En remarque :**

Comme dernière approche déterministe, je voudrais signaler le criblage "virtuel" de banques ayant conduit à l'identification de *nerf* (Oettgen *et al.*, 1996) du groupe Elf et *esx/ese* (Chang *et al.*, 1997; Oettgen *et al.*, 1997), mis en évidence par analyse de banques de données répertoriant les

« étiquettes de séquences exprimées » (EST en anglais). (Leur clonage moléculaire, réel, est passé par une étape de PCR à l'aide d'oligonucléotides spécifiques identifiés dans les banques de données.)

Ainsi, l'utilisation de la PCR a largement contribué à étoffer la famille Ets, que ce soit au sein d'une même espèce (diversité des groupes et de leurs représentants, voir fig.2), ou à travers le monde animal (Degnan *et al.*, 1993).

**En conclusion**, le clonage de nouveaux gènes *ets*, par ces approches déterministes, auréole la famille Ets d'une importance potentielle grandissante. Néanmoins, ce type de clonage n'apporte aucun éclairage fonctionnel au nouveau gène cloné, ni à l'ensemble de la famille. En revanche, certains gènes *ets* ont été isolés de manière non préméditée, dans le cadre d'études plus fonctionnelles. Je voudrais maintenant les présenter, en montrant ce qu'ils révèlent du caractère commun ou spécifique de la fonction moléculaire des gènes *ets*.

## **IB Le premier gène *ets* cloné sans préméditation *spi.1/pu-1***

### **IB1 Les gènes *ets* dans l'inconnu**

Dans un premier temps, le seul angle d'observation fonctionnel de la famille Ets s'ouvre sur la protéine virale exprimée par le virus E26. L'observation est compliquée par le fait que le génome de E26 comporte deux oncogènes. *v-ets* est inséré en fusion traductionnelle avec une séquence virale tronquée *gag* et une séquence d'origine cellulaire déjà identifiée, l'oncogène *v-myb* (Roussel *et al.*, 1979). Ces séquences codent une protéine de 135 kDa, la p135<sup>gag-myb-ets</sup> (Nunn *et al.*, 1983).

C'est la participation active de *v-ets* au phénotype transformé des cellules infectées par E26 (Golay *et al.*, 1988) et l'isolement de nouveaux gènes à domaine Ets, aux fonctions toujours mystérieuses, qui étayent l'importance fonctionnelle des protéines Ets.

## **IB2** Les gènes *ets* codent des facteurs de transcription spécifiques

Deux types d'expériences apportent alors les premiers arguments d'un rôle des protéines Ets en tant que facteurs de transcription spécifiques. D'une part, plusieurs équipes testent, quasiment au hasard, les capacités des protéines Ets-1 (aviaires, murines ou humaines) à activer la transcription par l'intermédiaire de séquences d'ADN issues de promoteurs viraux ou cellulaires (Bosselut *et al.*, 1990; Gunther *et al.*, 1990; Ho *et al.*, 1990; Ho & Leiden, 1990; Wasylyk *et al.*, 1990). D'autre part, Klemsz et ses collaborateurs isolent le gène *pu.1* correspondant à la protéine nucléaire capable d'interagir spécifiquement *in vitro* avec la séquence riche en purines (boîte PU) du promoteur du gène I-A $\beta$  du CMH II (Klemsz *et al.*, 1990). Les auteurs étudient par ailleurs la capacité de la protéine Pu.1 à activer la transcription par l'intermédiaire de boîtes Pu, connues pour leur importance dans la régulation transcriptionnelle de gènes notamment du virus SV40 (Singh *et al.*, 1988). Ils déterminent ainsi que la protéine Pu.1 est un facteur de transcription spécifique capable d'activer la transcription par l'intermédiaire de séquences multimériques de boîtes PU (Klemsz *et al.*, 1990).

Depuis, tous les gènes *ets* identifiés subissent le test de l'activation transcriptionnelle. Les protéines Ets sont des facteurs de transcription spécifiques impliqués dans l'activation de la transcription, à part Erf chez les mammifères (Sgouras *et al.*, 1995), et Yan/Pok chez la drosophile (Lai & Rubin, 1992; Tei *et al.*, 1992) qui présentent une activité de répresseur de la transcription. Par ailleurs, les propriétés transactivatrices ou trans-répressives des protéines Fev et Tel n'ont pas encore été étudiées (Peter *et al.*, 1997).

## **IB3** Le domaine Ets est un domaine fonctionnel

En fait, trois types d'arguments expérimentaux définissent un facteur de transcription :

- les expériences de liaison directe à l'ADN,
- la capacité à réguler la transcription,

- le caractère spécifique de ces propriétés, associé à des séquences d'ADN particulières, par opposition aux éléments de régulation transcriptionnelle communs au fonctionnement de la "machinerie générale de transcription".

Au sein des facteurs de transcription Ets, le domaine Ets définit le domaine de liaison à l'ADN. Il médie l'interaction spécifique des protéines Ets avec des séquences d'ADN particulières, appelées sites ets (voir l'introduction de la thèse de Marie-Pierre Laget pour une revue détaillée de la caractérisation moléculaire du domaine Ets).

*In vivo*, deux types de résultats témoignent de cette fonction du domaine Ets. D'une part, la mutation de sites ets au sein de promoteurs naturels ou artificiels entraîne la diminution de la transactivation médiée par les protéines Ets. D'autre part, l'activité vis-à-vis de la transcription de protéines mutées dans le domaine Ets est abolie. *In vitro*, cette propriété est étayée par des approches biochimiques de liaison à l'ADN. Les expériences de sélection de sites préférentiels d'interaction *in vitro* (TDA), réalisées avec les domaines Ets de diverses protéines ont permis d'établir des séquences consensus de liaison, *in vitro*, à l'ADN. D'une dizaine de nucléotides, elles sont toutes centrées autour de la séquence GGAA/T et varient, d'un domaine Ets à l'autre, pour les nucléotides flanquant cette séquence centrale (fig.3). Outre la grande ressemblance que partagent ces séquences définies *in vitro*, le caractère relatif de la spécificité de reconnaissance de chaque domaine Ets est illustré *in vivo* par le fait que différentes protéines Ets peuvent activer la transcription par l'intermédiaire du même site ets. Les données d'études par RMN (résonance magnétique nucléaire) ou de cristallographie aux rayons X réalisées sur les domaines Ets isolés de trois protéines Ets différentes montrent d'ailleurs qu'ils partagent une structure secondaire commune, de type hélice-tour-hélice (Kodandapani *et al.*, 1996; Liang *et al.*, 1994; Werner *et al.*, 1995).

Ainsi, au sein des facteurs de transcription Ets, le domaine Ets est un domaine fonctionnel, responsable de la reconnaissance de séquences d'ADN particulières appelées sites ets.

Cependant, après cette digression au sujet du domaine Ets, je voudrais revenir à l'exposé des données relatives au clonage du premier gène *ets* sans préméditation.

| Protéine de la<br>Famille Ets  | Site consensuel de liaison à l'ADN |     |     |          |          |          |          |     |     |     |  |
|--------------------------------|------------------------------------|-----|-----|----------|----------|----------|----------|-----|-----|-----|--|
|                                | -3                                 | -2  | -1  | 1        | 2        | 3        | 4        | 5   | 6   | 7   |  |
| <b>Ets-1</b>                   | A/G                                | C/G | C/A | <b>G</b> | <b>G</b> | <b>A</b> | A/T      | G/A | T/C |     |  |
| <b>Ets-2</b>                   | C/A                                | C   | C/A | <b>G</b> | <b>G</b> | <b>A</b> | A/T      | G/A | T/C |     |  |
| <b>Fli-1</b>                   | A                                  | C   | C/A | <b>G</b> | <b>G</b> | <b>A</b> | <b>A</b> | G/A | T/C | A/G |  |
| <b>Erg</b>                     |                                    | C/G | C/A | <b>G</b> | <b>G</b> | <b>A</b> | A/T      | G/A | T/C |     |  |
| <b>Er71</b>                    | G/c                                | C/G | C/A | <b>G</b> | <b>G</b> | <b>A</b> | A/T      | G/A | T/C |     |  |
| <b>h-Erm</b>                   | G/A                                | C   | C   | <b>G</b> | <b>G</b> | <b>A</b> | A/T      | G/A |     |     |  |
| <b>Er81</b>                    | G/A                                | G/c | C/A | <b>G</b> | <b>G</b> | <b>A</b> | A/T      | G/A | T/C |     |  |
| <b>z-Pea3</b>                  |                                    | C   | C   | <b>G</b> | <b>G</b> | <b>A</b> | A/T      | G   | C/T |     |  |
| <b>GABP<math>\alpha</math></b> | G/A                                | G/c | C/A | <b>G</b> | <b>G</b> | <b>A</b> | A/T      | G/A | T/C |     |  |
| <b>E74</b>                     | T/C                                | C   | C/A | <b>G</b> | <b>G</b> | <b>A</b> | <b>A</b> | G/A | T   |     |  |
| <b>Elk-1</b>                   | A/G                                | C/A | C/A | <b>G</b> | <b>G</b> | <b>A</b> | A/T      | G/A | T/C |     |  |
| <b>Spi-1/Pu.1</b>              | A                                  | C   | G   | <b>G</b> | <b>G</b> | <b>A</b> | <b>A</b> | C/G | T   | A/G |  |
| <b>Spi-B</b>                   | A/T                                | G/c | A/c | <b>G</b> | <b>G</b> | <b>A</b> | <b>A</b> | G/c | T   | A/T |  |

**Figure 3 : Les séquences optimisées de liaison à l'ADN *in vitro*.**

Ces séquences ont été obtenues par des expériences de sélection de sites préférentiels d'interaction *in vitro*, réalisées à l'aide des domaines Ets des protéines Ets mentionnées. D'après Ghysdael et Bourreux 1997 et une communication personnelle de A Sharrocks pour la séquence optimisée corespondant aux domaines Ets de z-Pea3 et h-Erm.

## **IB4**            **On a cloné *spi-1/pu.1***

Le locus *spi-1* avait été mis en évidence lors de l'étude des leucémies induites, chez les souris adultes, par le complexe viral de Friend (FV), comme le site d'intégration préférentiel du virus SFFV, l'un des virus du FV (Moreau-Gachelin *et al.*, 1988). Le gène *spi-1*, au locus *spi-1*, était alors décrit comme un oncogène potentiel, dont l'expression était amplifiée, au niveau transcriptionnel, par l'insertion virale du virus SFFV, (Moreau-Gachelin *et al.*, 1989). En fait, la publication de la séquence du gène *pu-1* a révélé, après la correction de la séquence *spi-1* l'identité des gènes *pu.1* et *spi-1* (Klemsz *et al.*, 1990).

*spi-1/pu.1* est donc un nouveau gène de la famille Ets, cloné selon deux approches fonctionnelles différentes : la caractérisation d'un nouvel oncogène (Moreau-Gachelin *et al.*, 1989), et le clonage d'une protéine nucléaire interagissant avec une séquence d'ADN particulière (Klemsz *et al.*, 1990).

**En conclusion**, alors qu'il a fallu attendre de nombreuses années avant de pouvoir associer les protéines Ets-1 à une activité de facteur de transcription spécifique, les observations accumulées sur les boîtes PU (Singh *et al.*, 1988), permettent dès le clonage fonctionnel du gènes *pu.1*, d'étudier les propriétés de transactivation portées par la protéine Pu.1 (Klemsz *et al.*, 1990). De plus, son clonage préalable en tant que gène potentiellement activé par insertion virale, semble établir qu'un gène *ets* pourrait devenir oncogène par sur-expression, sans subir d'altérations dans ses séquences codantes (après correction des erreurs de séquençage de *spi-1*) (Goebel, 1990; Paul *et al.*, 1991).

Ainsi que l'illustre le gène *spi-1/pu.1*, les circonstances dans lesquelles des gènes *ets* ont été isolés sans *a priori* sur leur appartenance à la famille Ets, peuvent se subdiviser en deux : d'une part la recherche d'oncogènes et d'autre part le clonage fonctionnel de facteurs de transcription. C'est par le biais de ces travaux que je voudrais continuer à vous présenter la famille Ets. Ils éclairent divers aspects des propriétés des facteurs de transcription spécifiques Ets.

Le clonage de GABP $\alpha$  ainsi que l'identification de la protéine p62<sup>TCF</sup> montrent deux types de régulation de la liaison à l'ADN des facteurs de transcription Ets. Le clonage de *tel*, réarrangé dans le cadre de plusieurs translocation chromosomiques humaines, met en évidence sa spécificité au sein de la famille Ets. Les érythroleucémies murines de Friend, qui impliquent deux gènes *ets*, *fli-1* et *spi-1/pu.1*, sont un des exemples classiques du caractère multi-étape du processus de tumorigenèse. Je présenterai plus en détails les travaux réalisés sur les protéines Ews-Ets produites en conséquence de diverses translocations associées aux tumeurs humaines d'Ewing, pour leur valeur exemplaire dans l'évolution des concepts moléculaires concernant la famille Ets. Je ne détaillerai pas les données obtenues suite à l'analyse de gènes *ets* grâce aux modèles génétiques que sont la Drosophile et *Caenorhabditis elegans*. L'introduction de la thèse de Olivier Albagli passe en revue les travaux qui ont permis d'intégrer les protéines Ets codées par les gènes *pointed* et *yan* à la voie de signalisation de la protéine Ras, induite par l'activation du récepteur membranaire à activité tyrosine-kinase codé par le gène *sevenless* lors de la mise en place du photorécepteur R7 de l'oeil de Drosophile (voir aussi Dickson, 1995).

## **IC Les autres clonages fonctionnels de gènes de la famille Ets**

### **IC1 Clonage par criblage de banques d'expression**

#### **IC1a GABP $\alpha$**

Le complexe protéique GABP était décrit biochimiquement pour sa fixation avec une grande affinité au niveau de séquences répétées riches en purines (GA repeat) présentes au niveau de séquences régulant l'expression des gènes précoces du virus HSV-1. La purification des deux sous-unités protéiques du complexe GABP a permis le clonage de deux gènes *gabp $\alpha$*  et *gabp $\beta$*  chez la souris. GABP $\alpha$  est une protéine de la famille Ets; sa fixation à l'ADN au niveau des séquences GA du virus HSV-1 est stabilisée en présence de GABP $\beta$  (LaMarco *et al.*, 1991). L'interaction entre GABP $\alpha$  et GABP $\beta$  est médiée par quatre motifs "ankyrin" de GABP $\beta$  (Thompson *et al.*, 1991). Deux équipes clonent les gènes homologues de *gabp $\alpha$*  et *gabp $\beta$* , dans des conditions similaires au clonage réalisé

chez la souris. Watanabe et ses collaborateurs cherchent à cloner les gènes codant les protéines du complexe E4TF1 capable de se fixer au niveau de séquences présentes dans le promoteur E4 de l'adénovirus et indispensables à sa régulation par le facteur de transcription viral E1A. Le complexe E4TF1 humain est un complexe homologue au complexe GABP (Watanabe *et al.*, 1993). De même, NRF2 est un complexe multiprotéique impliqué dans la régulation transcriptionnelle de la sous-unité IV de la cytochrome-oxydase de rat (Virbasius *et al.*, 1993).

Dans tous les cas, la caractérisation biochimique qui précède le clonage, permet de vérifier rapidement que la sous-unité de type GABP $\alpha$  seule se fixe à l'ADN avec une affinité faible. L'ajout de sous-unités de type GABP $\beta$  conduit à la formation d'un complexe tétramérique dont l'affinité pour l'ADN est augmentée (Thompson *et al.*, 1991; Virbasius *et al.*, 1993; Watanabe *et al.*, 1993). Brown et McKnight essaient d'isoler d'autres gènes *ets* capables d'interagir avec GABP $\beta$ . Ils isolent ainsi à l'aide de la technique de PCR deux gènes *er71* et *er81*. Si les domaines Ets codés par ces deux gènes présentent des séquences de fixation à l'ADN optimisées très proches des séquences sélectionnées par celui de GABP $\alpha$  ou encore celui de Ets-1, seule GABP $\alpha$  interagit avec GABP $\beta$  (Brown and McKnight, 1992).

GABP $\beta$  définit donc le premier cofacteur protéique spécifique d'une protéine Ets. Les études biochimiques des complexes de type GABP permettent l'isolement de ce cofacteur, GABP $\beta$ , dès le clonage de son partenaire de type Ets, GABP $\alpha$ . La caractérisation de domaines responsables de l'activité de transcription semble indiquer que seule la protéine GABP $\beta$ , au sein du complexe GABP, active la transcription (Gugneja *et al.*, 1995).

### **IC1b**      p62<sup>TCF</sup> et les protéines du groupe Elk

La régulation transcriptionnelle précoce du gène *c-fos* fait intervenir une séquence d'ADN particulière nommée SRE (élément de réponse au sérum). L'activation transcriptionnelle nécessite un facteur de transcription particulier, SRF, qui interagit de manière spécifique avec l'ADN. Au niveau de ce site particulier, diverses observations avaient amené l'hypothèse de la formation d'un complexe ternaire SRE/SRF/TCF (TCF pour facteur du complexe ternaire).

Deux équipes ont montré concomitamment que les protéines Ets du groupe Elk présentent une activité TCF. La proximité du site ets, voisin du SRE, au niveau du promoteur du gène *c-fos*, et la taille d'une protéine à activité TCF caractérisée biochimiquement, 62kDa, a encouragé Nordheim et ses collaborateurs à étudier l'identité éventuelle entre p62<sup>TCF</sup> et la protéine de la famille Ets, Elk. Il s'avère que Elk présente une activité TCF (Hipskind *et al.*, 1991). L'autre équipe tire partie de l'observation selon laquelle SRF n'est pas capable d'activer la transcription par l'intermédiaire de sites de type SRE en levure. Les auteurs mettent ainsi en oeuvre une stratégie de criblage de banque par double hybride en levure en utilisant SRF comme appât et en plaçant les séquences codant la  $\beta$ -galactosidase sous le contrôle d'un SRE. Ainsi, Dalton et Treisman isolent Sap-1, une protéine proche de Elk-1 à activité TCF (Dalton & Treisman, 1992).

La comparaison entre Elk-1 et Sap-1 a révélé trois caractéristiques structurales communes : la position du domaine Ets en position N-terminale des protéines et deux autres régions conservées, les régions B et C indispensables à l'interaction avec SRF. Erp/Net/Sap-2, le troisième membre du groupe Elk, a depuis été isolée. C'est une protéine de la famille Ets qui montre une structure primaire comparable à celle des protéines Elk-1 et qui présente aussi une activité TCF (Giovane *et al.*, 1994; Lopez *et al.*, 1994). L'interaction des protéines du groupe Elk avec SRF est régulée par leur phosphorylation au niveau de résidus sérine et thréonine présents dans leur région C. Différentes kinases sont impliquées dans la phosphorylation de ces résidus, ce qui place les protéines Ets à activité TCF sur différentes voies de signalisation cellulaires (voir Ghysdael and Boueux, 1997 pour une revue et les références qu'elle contient).

Les protéines Ets à activité TCF sont incapables de se lier au SRE et de réguler la transcription en absence du SRF, par l'intermédiaire du SRE. A la différence de GABP $\alpha$ , c'est donc la liaison préalable du SRF au niveau du SRE qui permet le « recrutement » des protéines Ets au niveau du site ets voisin du SRE dans le promoteur de *c-fos*.

Dans le cadre du clonage gènes codant des protéines Ets par le biais du criblage de banques d'expression, il faut encore mentionner le clonage de *pea3*, *elaf* (Higashino *et al.*, 1993; Xin *et al.*,

1992) qui est présenté au niveau de la partie Résultats, ainsi que le clonage de *erf*. La protéine Erf a été identifiée dans le cadre de l'étude de la régulation transcriptionnelle du gène *ets-2*, et la caractérisation fonctionnelle de Erf a mis en évidence qu'elle était un facteur de transcription à activité répressive (Sgouras *et al.*, 1995).

## **IC2            Clonage d'oncogènes de la famille Ets.**

### **IC2a            *Tel, un domaine fonctionnel unique au sein d'une protéine Ets.***

#### **Les différentes translocations humaines impliquant le gène *tel*.**

*tel* est un gène de la famille Ets mis en évidence suite à la caractérisation de plusieurs translocations associées à des leucémies humaines. Les réarrangements chromosomiques conduisent toujours à la formation d'un nouveau gène codant une protéine chimérique constituée d'une région N-terminale de la protéine Tel et des régions C-terminales de différentes protéines :

- la translocation t(5;12) réarrange *tel* sur le chromosome 12 et le gène codant le récepteur  $\beta$  à activité tyrosine-kinase du PDGF (facteur de croissance plaquettaire), *pdgfr- $\beta$* , dont le locus se situe sur le chromosome 5 (Golub *et al.*, 1994).

- la translocation t(9;12) touche le gène codant la protéine à activité tyrosine-kinase ABL (Papadopoulos *et al.*, 1995).

- la translocation t(12;22) cible le facteur de transcription MN1 (Buijs *et al.*, 1995).

- la translocation t(12;21) réarrange le gène codant le facteur de transcription AML-1 (Golub *et al.*, 1995).

- enfin, Peeters et ses collaborateurs montrent que le gène codant la protéine à activité tyrosine-kinase JAK-2 est réarrangé dans des translocations t(9;12) (Peeters *et al.*, 1997).

Ces différents réarrangements chromosomiques préservent toujours le domaine B, un domaine de 65 acides aminés situé en position N-terminale de Tel, et présent aussi chez les protéines Ets des

groupes ETS, ERG, TEL, YAN et GABP (voir, pour un alignement des séquences de ces domaines, Ghysdael and Boureux, 1997).

Si la conservation de séquence observée au niveau du domaine B était un argument théorique en faveur de son importance fonctionnelle, les premiers arguments fonctionnels expérimentaux concernant ce domaine viennent de l'étude des protéines chimères Tel-ABL et Tel-PDGFR $\beta$ .

### **Le domaine B de Tel.**

En système cellulaire, l'expression stable des protéines chimériques Tel-ABL ou Tel-PDGFR $\beta$  entraîne l'acquisition, par les cellules concernées, d'une indépendance vis-à-vis des facteurs de croissance (pour Tel-ABL, Golub *et al.*, 1996; Okuda *et al.*, 1996 et pour Tel-PDGFR $\beta$  Carroll *et al.*, 1996). Les auteurs corrélaient ce phénotype à l'augmentation de la phosphorylation des protéines cellulaires au niveau de tyrosines, à la phosphorylation constitutive des protéines chimériques (Carroll *et al.*, 1996; Golub *et al.*, 1996; Okuda *et al.*, 1996). Ils observent aussi la formation *in vitro* d'homooligomères, pour ces protéines (Carroll *et al.*, 1996; Golub *et al.*, 1996). L'étude par mutagenèse de délétion des protéines Tel-ABL et Tel-PDGFR $\beta$  montre que l'ensemble de ces propriétés nécessite la présence du domaine B de la protéine Tel (Carroll *et al.*, 1996; Golub *et al.*, 1996; Okuda *et al.*, 1996).

Ces données suggèrent donc que le domaine B de la protéine Tel, et par extension le domaine B des différentes protéines Ets qui le contiennent, était un domaine d'oligomérisation, indispensable dans le cadre des protéines Tel-ABL et Tel-PDGFR $\beta$  à leur activité tyrosine-kinase.

Cette hypothèse a été testée par le biais de la construction de protéines chimériques artificielles remplaçant le domaine B de Tel par le domaine B de différentes protéines Ets. Dans ce travail, seul le domaine B de la protéine Tel est capable de médier l'homo-oligomérisation des protéines Tel ou Tel-PDGFR $\beta$  correspondantes ainsi que la transformation cellulaire (Jousset *et al.*, 1997).

Ainsi, l'étude de la protéine Tel par le biais des protéines chimères produites suite aux réarrangements chromosomiques touchant le gène *tel* a permis de mettre en évidence la spécificité fonctionnelle du domaine B d'une protéine Ets particulière, la protéine Tel.

L'étude, chez la souris, des érythro-leucémies de Friend a, quant à elle permis les travaux montrant la coopération entre différents événements moléculaires, impliquant les gènes *fli-1* et *spi-1/pu.1* dans la mise en place de la transformation cancéreuse.

**IC2b**      *spi-1/pu.1 et fli-1 les oncogènes de la famille Ets impliqués  
chez la souris dans le développement de la leucémie de  
Friend.*

### **L'érythro-leucémie de Friend**

L'érythro-leucémie de Friend est une leucémie provoquée chez la souris adulte par le complexe viral de Friend, FV : elle est caractérisée par la multiplication, au niveau de la rate, d'érythroblastes précurseurs des érythrocytes. Le développement des érythro-leucémies de Friend est un des exemples qui illustre le caractère multi-étape de la transformation cancéreuse. Dans une première étape, on observe une prolifération polyclonale de cellules érythroblastiques : ces cellules présentent la capacité à croître *in vitro* en absence d'érythropoïétine et ne sont pas leucémogènes. Dans une deuxième étape, on observe une prolifération clonale des cellules : celles-ci peuvent être maintenues indéfiniment en culture et sont leucémogènes. (pour une revue voir Ben David & Bernstein, 1991b). Quelques événements moléculaires ont été associés à chacune de ces étapes.

### **La protéine gp55 et l'indépendance à l'érythropoïétine**

Le complexe viral de Friend est constitué de deux virus : le SFFV (pour « spleen focus forming virus ») qui est un virus déficient pour la réplication et le F-MuLV (pour « Friend murine leukemia virus ») compétent pour la réplication, et qui complémente le défaut de réplication du SFFV dans le FV.

C'est le SFFV qui est responsable de pathogénécité du FV chez l'adulte. Le F-MuLV est cependant responsable de différentes leucémies, lorsqu'il est inoculé à des souriceaux nouveau-nés (voir Ben David and Bernstein, 1991b).

Le séquençage du génome du SFFV met en évidence qu'il code un gène *env* tronqué en comparaison des gènes *env* de virus proches (Clark & Mak, 1983). L'étude de la glycoprotéine codée par ce gène, la protéine gp55, montre qu'elle est associée au caractère pathogène du SFFV. En effet, des mutants naturels du virus SFFV moins leucémogènes que les souches sauvages du SFFV sont mutés dans le gène *env* (Ruta *et al.*, 1983). La construction de divers virus artificiels montre que l'expression de la protéine gp55 est nécessaire et suffisante au développement de la première étape de la maladie de Friend (Friedrich *et al.*, 1991). La protéine gp55 est en fait capable d'activer le récepteur à l'érythropoïétine ainsi que le démontrent Li et ses collaborateurs en 1990 (Li *et al.*, 1990). L'activation du récepteur à l'érythropoïétine semble suffisante à la mise en place de la première étape des leucémies de Friend comme le suggèrent l'utilisation de virus permettant l'expression constitutive d'érythropoïétine (Hoatlin *et al.*, 1990) ou l'utilisation d'un récepteur à l'érythropoïétine mutant à activité dominant-négative vis-à-vis du récepteur sauvage (Barber *et al.*, 1994).

### **spi-1/pu.1 et fli-1 et la transformation cancéreuse de précurseurs érythrocytaires**

C'est l'étude des sites d'insertions du SFFV dans les cellules leucémogènes qui met en évidence l'insertion préférentielle (95% des cas étudiés) du virus au locus *spi* (Moreau-Gachelin *et al.*, 1988) auquel le gène *spi-1/pu.1* est ensuite associé (Klemsz *et al.*, 1990; Moreau-Gachelin *et al.*, 1989; Paul *et al.*, 1991). L'implication de Spi-1/Pu.1 dans le développement d'érythro-leucémies est confirmée par une approche de transgénèse qui associe le développement de leucémies dans 50% des animaux transgéniques obtenus (Moreau-Gachelin *et al.*, 1996).

Dans le cas des érythro-leucémies provoquées par le virus F-MuLV chez les souriceaux nouveau-nés, une intégration virale préférentielle est aussi observée qui cible cette fois le locus *fli-1* (75% des cas étudiés) provoquant l'amplification de l'expression transcriptionnelle du gène *fli-1* de la famille Ets (Ben David *et al.*, 1990a; Ben David *et al.*, 1991a). Dans ce type d'érythro-leucémie

l'intégration virale au locus *fli-1* est d'ailleurs un événement précoce dans le processus de la maladie (Howard *et al.*, 1993).

Associées au phénotype leucémogène des cellules érythroblastiques infectées, par le FV ou le F-MuLV, des mutations dans le gène *p53* ont aussi été répertoriées (Ben David *et al.*, 1990b; Howard *et al.*, 1993). Dans le cas des leucémies induites par le F-MuLV, l'altération du gène codant la protéine *p53* est un événement tardif (Howard *et al.*, 1993). Dans le cas des leucémies induites par le SFFV, l'importance des mutations dans le gène *p53* est mise en évidence par une approche de transgénèse : des souris surexprimant une protéine *p53* mutée montrent un temps de latence réduit pour le développement d'érythro-leucémies après une infection par le FV (Lavigueur & Bernstein, 1991).

Récemment, la coopération des différents événements moléculaires caractérisés au cours de l'étude des leucémies induites par le SFFV a été abordée grâce à un système d'expression complexe obtenu à partir de précurseurs des érythroblastes aviaires. Ces précurseurs issus de moëlle osseuse aviaire, se différencient en érythrocytes matures *in vitro*. Les auteurs montrent que l'activation d'un récepteur à l'érythropoïétine surexprimé ainsi que la surexpression de la protéine Spi-1/Pu.1 sont nécessaires au maintien en prolifération des cellules et à leur blocage dans la voie de différenciation érythrocytaire. De plus, seule l'expression conjointe d'une protéine *p53* mutée permet l'obtention d'une population de cellules homogènes quant au stade de différenciation dans lequel elles sont bloquées (Quang *et al.*, 1997).

Ainsi, l'ensemble de ces travaux montre comment le clonage d'oncogènes de la famille *Ets* a permis d'étudier le caractère coopératif de la participation des protéines concernées à la transformation cancéreuse, grâce aux connaissances accumulées indépendamment sur cet événement cellulaire particulier.

Lors de ce premier chapitre de l'introduction, j'ai voulu montrer comment les circonstances des clonages des différents gènes de la famille *Ets* avaient influencé l'étude des protéines *Ets* correspondantes. Au cours du deuxième chapitre, j'ai choisi de vous présenter l'étude et la

caractérisation moléculaire des protéines Ets chimériques produites suite aux réarrangements chromosomiques associés aux tumeurs d'Ewing. Ces protéines ont tout d'abord été considérées uniquement comme des facteurs de transcription spécifiques de la famille Ets. Des données récentes laissent envisager d'autres propriétés pour ces protéines transformantes. Leur présentation est l'occasion de s'interroger sur la définition de facteur de transcription spécifique acceptée pour chacune des protéines de la famille Ets.

## **II LES PROTEINES ETS, COMPTE-TENU DES TRANSLOCATIONS ASSOCIÉES AUX TUMEURS D'EWING**

### **IIA Les translocations associées aux tumeurs d'Ewing**

Chez l'homme, le développement de tumeurs est fréquemment associé à la description d'anomalies cytogénétiques révélées après analyse caryotypique de cellules cancéreuses. Les translocations chromosomiques humaines qui entraînent le remaniement de gènes codant des facteurs de transcription font l'objet d'une revue récente (Labelle & Delattre, 1997).

#### **IIA1 *ews-fli-1***

Certaines tumeurs de l'enfant telles que les sarcomes d'Ewing, les tumeurs d'Askin et les tumeurs périphériques du neuroépithélium, ont été regroupées sous le terme de tumeurs d'Ewing. Entre autre caractéristique commune, elles présentent la translocation  $t(11;22)(q24;q12)$  de façon récurrente (voir les introductions de Zucman *et al.*, 1993a et de Kovar *et al.*, 1996 et les références qu'elles contiennent). Le clonage des points de cassure des chromosomes 11 et 22 impliqués dans ce type de translocation a permis d'identifier le gène *ews* sur le chromosome 22 et le gène *fli-1* sur le chromosome 11 (Delattre *et al.*, 1992) déjà cloné chez la souris (Moreau-Gachelin *et al.*, 1989; Moreau-Gachelin *et al.*, 1988).

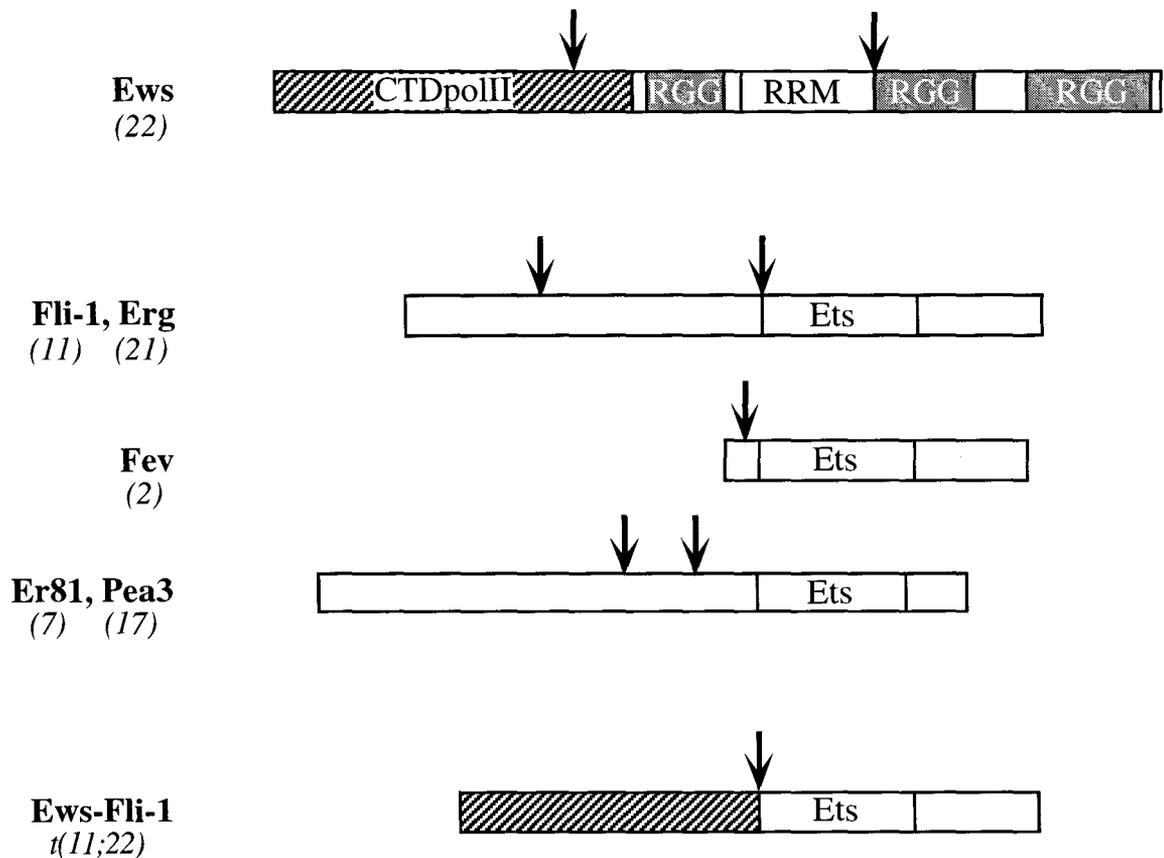
La séquence de *ews* a, dès son clonage, permis de poser l'hypothèse selon laquelle la protéine Ews serait une protéine capable de se fixer à l'ARN. La région N-terminale de Ews présente des répétitions dégénérées de motifs évoquant ceux retrouvés dans le domaine C-terminal de l'ARN-

polymérase II eucaryote (CTDpolII). La région C-terminale de Ews comporte deux types de motifs impliqués dans la liaison à l'ARN : une séquence de 85 acides aminés, présente au niveau de nombreuses protéines de liaison à l'ARN, la séquence RRM pour "RNA Recognition Motif", et trois motifs RGG qui présentent plusieurs répétitions de séquences contenant les acides aminés arginine (R) et glycine (G) (Delattre *et al.*, 1992, voir fig.4). L'interaction ARN/Ews a été étudiée *in vitro*, avec des homo-polymères ribonucléotidiques. Ews interagit avec les séquences poly-G ou poly-U et il semble que la région C-terminale est responsable de cette propriété. La région N-terminale, incapable seule d'interagir avec l'ARN, semble stabiliser l'interaction Ews/poly-U (Ohno *et al.*, 1994).

La translocation t(11;22) conduit à l'expression de protéines chimères Ews-Fli formées de la partie N-terminale de Ews, contenant le domaine CTDpolII, et d'une région C-terminale de Fli-1, contenant le domaine Ets de liaison à l'ADN (Delattre *et al.*, 1992; Zucman *et al.*, 1993a).

## **IIA2 Les gènes *ets* réarrangés dans les tumeurs d'Ewing**

Il s'avère que toutes les translocations chromosomiques caractérisées parmi les cas de tumeurs d'Ewing touchent le gène *ews* et divers gènes *ets* : *fli-1* pour près de 90% des cas (48cas/54, Zucman *et al.*, 1993a), *erg*, situé sur le chromosome 21, réarrangé dans des translocations t(21;22)(q24;q12)(5cas/54, Sorensen *et al.*, 1994; Zucman *et al.*, 1993a), *er81* à l'occasion d'une translocation t(7;22)(p22;q12) (un cas, Jeon *et al.*, 1995), *pea3* à l'occasion d'une translocation t(17;22)(;q12) (deux cas, Kaneko *et al.*, 1996; Urano *et al.*, 1996) et enfin *fev* lors de translocations complexes impliquant le chromosome 2 et le chromosome 22, t(2;21;22)(q33;q22;q12) (2cas/200, Peter *et al.*, 1997). Alors que *erg*, *er81*, *pea3* étaient déjà clonés (Brown and McKnight, 1992; Higashino *et al.*, 1993; Reddy *et al.*, 1987; Xin *et al.*, 1992), *fev* est un nouveau gène de la famille Ets à rapprocher du groupe Erg.



**Figure 4 :**

**La protéine Ews et les différentes protéines Ets impliquées dans les tumeurs d'Ewing.**

Les différents motifs structuraux identifiés au niveau des séquences protéiques sont indiqués :

- les motifs retrouvés dans d'autres protéines de liaison à l'ARN : RRM, motif de reconnaissance de l'ARN, et RGG, séquence présentant des répétitions de ces trois acides aminés.

- le domaine Ets de liaison à l'ADN des protéines Ets.

La localisation chromosomique du gène codant la protéine est indiquée en italique et une flèche verticale marque la limite des fragments protéiques, imposée par le réarrangement chromosomique.

Un exemple de protéine chimère Ews-Fli-1 produite suite à une translocation entre les chromosomes 11 et 22 est présentée.

Les mécanismes qui président aux translocations chromosomiques sont encore mal connus. Néanmoins, l'orientation transcriptionnelle des gènes *ews* et *fli-1* par rapport aux centromères respectivement des chromosomes 22 et 11 est la même, à la différence du gène *erg* sur le chromosome 21 (Delattre *et al.*, 1992). Ainsi, la fusion transcriptionnelle nécessaire à la construction d'un nouveau gène fonctionnel fait intervenir des translocations simples dans le cas des translocations t(11;22) et complexes dans le cas de *erg*, mais aussi de *fev* (Delattre *et al.*, 1992; Peter *et al.*, 1997).

### **IIA3 Les protéines "Ews-Ets"**

Ces translocations impliquant cinq gènes différents de la famille Ets sont, en général, réciproques. Néanmoins un seul transcrite chimérique est détecté, initié sur le chromosome réarrangé contenant le centromère du chromosome 22 (der(22)), au locus de *ews* (Delattre *et al.*, 1992; Jeon *et al.*, 1995). L'absence de détection du transcrite chimérique initié sur l'autre chromosome réarrangé semble suggérer que le promoteur dirigeant l'expression du gène *ets* impliqué soit silencieux dans ces cellules. Cette hypothèse est étayée par l'absence d'expression de chacun des gènes *ets* sauvages dans les lignées testées (voir les publications de caractérisation citées). Ces données d'expression, ainsi que l'observation, dans certains cas, de la perte du chromosome réciproque réarrangé, ont orienté l'ensemble des travaux sur l'étude des protéines aberrantes "Ews-Ets" codées par les différents transcrits initiés à partir des chromosomes der(22). Ainsi que l'illustre la figure 4, deux fragments N-terminaux de Ews peuvent participer aux chimères "Ews-Ets"; les divers fragments des protéines Ets contiennent tous le domaine Ets.

De plus, de manière remarquable, dans le cadre de l'étude d'une translocation récurrente t(16;22)(p11;q22) associée à diverses leucémies humaines en phase aiguë, une autre protéine chimère, Tls-Erg, a été mise en évidence. Cette protéine résulte de la fusion du domaine N-terminal d'une protéine proche de Ews, Tls, et d'une région C-terminale de Erg, contenant le domaine Ets (Ichikawa *et al.*, 1994; Shimizu *et al.*, 1993). Tls présente aussi un domaine comparable au domaine CTDpolIII ainsi que le RRM, responsable *in vitro* de la liaison de Tls à des homopolymères ribonucléiques, poly-G (Prasad *et al.*, 1994). Ces propriétés de liaison à l'ARN sont illustrées aussi, par la caractérisation d'une

protéine d'un complexe ribonucléoprotéique, la protéine hnRNP P2, qui s'est avérée identique à Tls (Calvio *et al.*, 1995).

**En conclusion**, les données présentées ici corrélient le phénotype cancéreux de certains tissus humains à différentes translocations chromosomiques qui entraînent toutes l'expression de protéines hybrides ayant deux caractéristiques en commun. D'une part, elles présentent une région N-terminale dérivée des protéines Ews et Tls. D'autre part, la partie C-terminale des protéines conserve toujours le domaine Ets intact. La mise en évidence de ces translocations qui ciblent le domaine Ets concourt à démontrer l'importance fonctionnelle du domaine Ets.

D'un point de vue expérimental, les études se sont intéressées aux propriétés des protéines Ews-Fli-1 et Tls-Erg. Tout d'abord, je voudrais vous présenter comment ces études ont établi que ces protéines étaient transformantes.

## **II B Les protéines chimères Ews-Fli-1 et Tls-Erg sont des protéines transformantes**

Afin d'étudier l'implication active des protéines Ews-Fli et Tls-Erg dans le processus de transformation cancéreuse, deux types de stratégies ont été suivis :

- d'une part, l'étude de l'expression de ces protéines et de leurs divers mutants dans des cellules d'une lignée fibroblastique modèle, les cellules NIH3T3. L'expression de divers oncogènes dans cette lignée entraîne, notamment, la transformation morphologique des cellules qui prennent un aspect rond et réfringent par opposition à leur aspect fusiforme initial ainsi que l'acquisition des capacités à se multiplier dans un milieu semi-solide (test de clonage en agar) et à former des tumeurs après injection à des souris immunodéprimées - pour éviter la réaction de rejet - (test de tumorigénicité en souris nues).

- d'autre part, l'étude de l'extinction ciblée de l'expression des protéines chimères dans des lignées cellulaires dérivant des cellules de tumeurs d'Ewing, par l'utilisation d'ARN "anti-sens".

## **II B1** Les protéines "Ews-Ets" ou "Tls-Ets" transforment les cellules NIH3T3

La comparaison des capacités des clones NIH3T3, exprimant de façon stable chacune des protéines Fli-1 et Ews-Fli-1, à se multiplier en agar mou (ou semi-solide) montrait le caractère transformant de la protéine Ews-Fli-1 par rapport à la protéine sauvage Fli-1 correspondante (May *et al.*, 1993a). Cette étude est complétée par la caractérisation, dans ce système, de deux délétants de la protéine Ews-Fli-1, correspondant à une protéine Ews-Fli-1 délétée du domaine Ets et à une protéine réduite à la région de Fli-1 contribuant à la chimère, Fli-1-C. Aucun de ces mutants n'apporte aux cellules NIH3T3 la capacité de croître en milieu semi-solide, ce qui démontre la nécessité de chacun des domaines contribuant à la chimère Ews-Fli-1 : le domaine Ets et le domaine semblable au domaine CTDpolIII de EWS (May *et al.*, 1993b). Enfin, Lessnick et ses collaborateurs testent divers autres domaines fonctionnels en fusion avec Fli-1-C. Ils construisent ainsi Tls-Fli-1, et d'autres chimères plaçant en N-terminal de Fli-1-C différents domaines transactivateurs, tels que le domaine acide de VP16, les domaines riches en glutamine de Sp1 ou la région N-terminale de Ets-2, Ets-2-N. Les protéines Tls-Fli-1, VP16-Fli-1 et Ets2-N-Fli-1 sont transformantes (Lessnick *et al.*, 1995).

Ainsi, les protéines Ews-Fli-1 et Tls-Fli-1 sont capables de transformer les cellules de la lignée NIH3T3. Le domaine Ets est indispensable à cette propriété de Ews-Fli-1. Certains domaines transactivateurs, en fusion avec la partie C-terminale de Fli-1 contribuant à la chimère Ews-Fli-1, conduisent à des chimères également transformantes.

## **II B2** Les protéines "Ews-Ets" ou "Tls-Ets" permettent le maintien en prolifération de cellules de lignées dérivées de tumeurs d'Ewing

Deux types d'arguments sont en faveur d'un rôle direct des protéines Ews-Ets vis-à-vis de la transformation cancéreuse dans le cas des tumeurs d'Ewing.

Deux équipes étudient ainsi les conséquences cellulaires de l'expression stable, dans des cellules de tumeurs d'Ewing (ET), d'un ARN "anti-sens" de l'ARN chimère, c'est-à-dire dont la séquence est complémentaire d'un fragment du transcrit codant Ews-Fli-1 ou Ews-Erg. Théoriquement, la formation d'hybrides d'ARN double-brin conduit à leur dégradation par un système enzymatique cellulaire ubiquiste. Expérimentalement, les auteurs vérifient la diminution quantitative du transcrit *ews-fli-1* pour les cellules ET exprimant de façon stable la construction anti-sens correspondante (ET $\alpha$ ) (Kovar *et al.*, 1996) ou la diminution de l'expression des protéines Ews-Fli-1 et Ews-Erg (Ouchida *et al.*, 1995). Ces diminutions sont spécifiques de l'expression de la construction anti-sens. Elles sont corrélées à une diminution de la vitesse de croissance des clones ET $\alpha$  (Kovar *et al.*, 1996; Ouchida *et al.*, 1995), à leur incapacité à se développer en agar mou et à leur absence de tumorigénicité en souris nues (Ouchida *et al.*, 1995).

Ainsi, l'extinction ciblée de l'expression des protéines Ews-Ets au sein des cellules de lignées dérivées de tumeurs d'Ewing semble entraîner la perte de certaines de leur caractéristiques de transformation.

L'ensemble des expériences présentées ci-dessus montre par défaut un rôle actif des protéines de type Ets dans le maintien de la prolifération des cellules ET $\alpha$ . Cette propriété est à mettre en relation avec des données récentes caractérisant les capacités des protéines Ews-Fli, Ews-Erg et Tls-Erg à inhiber l'activation de la mort cellulaire par apoptose induite par différents signaux. En effet, des cellules NIH3T3 transformées de façon stable par chacune de ces protéines sont résistantes à l'apoptose induite par un traitement au calcium ionophore. Parallèlement, les clones ET $\alpha$  présentés dans le paragraphe précédent sont plus sensibles à l'induction de l'apoptose par traitement chimique que les cellules tumorales dont elles dérivent (Yi *et al.*, 1997).

**En conclusion**, ces données étayent le caractère transformant et actif des protéines Ews-Ets ou Tls-Ets produites en conséquence de diverses translocations. L'une des hypothèses moléculaires envisagées dès la mise en évidence de ces protéines chimères arborant un domaine Ets intact, était qu'à l'occasion de ces translocations, un nouveau facteur de transcription Ets était synthétisé, plus "actif" ou aux cibles modifiées par rapport à la protéine Ets sauvage

correspondante, ou les deux. A l'aval de cette hypothèse, d'autres translocations affectant les gènes *ews* et *tls* ont été caractérisées. Elles entraînent toutes la fusion du domaine de type "CTDpolIII" à des portions de facteur de transcription spécifique qui contiennent toutes un domaine de liaison à l'ADN (Ladanyi & Gerald, 1994 pour Ews-WT1, Zucman *et al.*, 1993 pour Ews-ATF1, Crozat *et al.*, 1993 pour Tls-CHOP, Panagopoulos *et al.*, 1996 pour Ews-CHOP). Dans ce cadre, l'hypothèse moléculaire dominante présente les protéines réarrangées comme des facteurs de transcription spécifiques, aux gènes cibles dont l'expression conduit au phénotype transformé des cellules porteuses de la translocation.

Un certain nombre de travaux a d'ailleurs comparé les propriétés transactivatrices des chimères Ews-Ets par rapport à celles des protéines Ets. Néanmoins, l'équation entre transformation et capacités transactivatrices n'est pas si facile à établir.

## **II C Quelles fonctions pour les protéines Ews-Ets et Tls-Erg?**

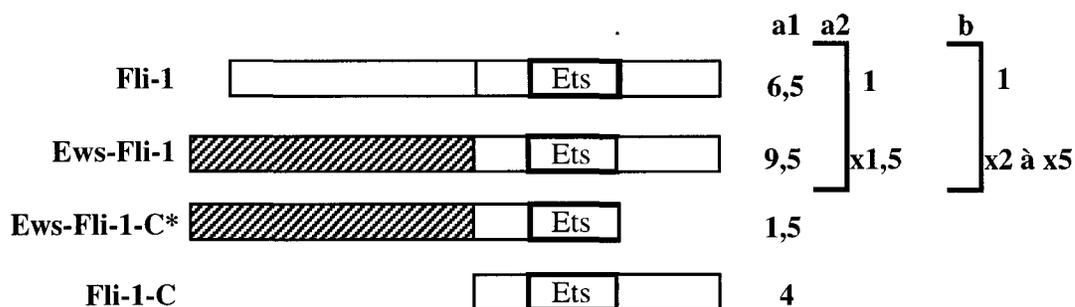
### **II C1 Les protéines "Ews-Ets" ou "Tls-Ets" sont des facteurs de transcription.**

Les domaines transactivateurs des protéines Ews-Ets ont été étudiés grâce à différents délétants des protéines, ou alors au moyen de la construction de protéines chimériques fusionnant le domaine de liaison à l'ADN du facteur de levure Gal4 à différents fragments des protéines Ews-Ets.

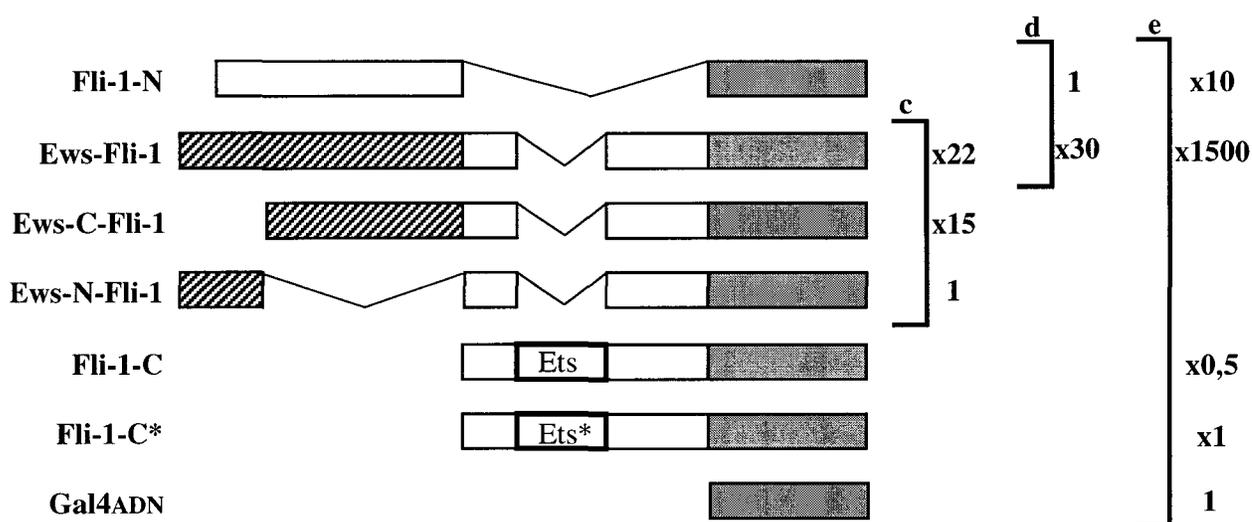
Ainsi, à la lumière des constructions chimériques "Gal4", le domaine de type CTDpolIII de Ews semble médier l'activation de la transcription de manière plus efficace que le domaine N-terminal de Fli-1-N (Bailly *et al.*, 1994; May *et al.*, 1993a). L'intégrité de ce domaine de Ews semble nécessaire pour que l'activation de la transcription soit maximale. Cependant, l'essentiel de la fonction de transactivation est porté par la partie C-terminale du domaine N-terminal de Ews (Lessnick *et al.*, 1995, voir fig.5).

Vis-à-vis de la protéine Ews-Fli-1, Bailly et ses collaborateurs comparent les propriétés de transactivation des protéines Ews-Fli-1 et Fli-1 par l'intermédiaire de différents sites ets (Bailly *et al.*, 1994). Ces sites ets identifiés au sein de promoteurs viraux du virus HTLV-1 médient efficacement la

**Activation de la transcription  
par l'intermédiaire de sites ets**



**Activation de la transcription par  
l'intermédiaire de sites GAL4**



**Figure 5 : La protéine chimère Ews-Fli-1 est un facteur de transcription.**

La région N-terminale de la protéine Ews est capable d'activer la transcription lorsqu'elle est fusionnée à la partie C-terminale de la protéine Fli-1, contenant le domaine Ets (a, b) ou lorsqu'elle participe à des chimères Gal4 (c, d, e).

Dans la chimère Ews-Fli-1, la région C-terminale de la portion Ews est responsable de la majeure partie de l'activation transcriptionnelle (c), le domaine Ets ne porte pas de propriétés d'activation de la transcription (e), et enfin la portion Ews et la région Fli-1 située en aval du domaine Ets coopèrent pour l'activation de la transcription.

Les différentes constructions sont comparées pour leur capacité à activer la transcription par l'intermédiaire de sites GAL4 (c, d, e). Les valeurs sont données en unités arbitraires par rapport à l'une des constructions prises comme référence (valeur = 1) (a2, b, c, d, e) ou par rapport au vecteur d'expression vide (a1).

Les boîtes hachurées correspondent à différents délétants de la partie N-terminale de la protéine Ews. Les boîtes vides correspondent à différents fragments de la protéine Fli-1. Le domaine Ets de la protéine Fli-1 est figuré par une boîte vide entourée d'un trait épais. La construction Fli-1C\* correspond à un mutant ponctuel de la construction Fli-1, dans le domaine Ets. Cette mutation abolit les capacités de liaison à l'ADN de Fli-1C, *in vitro*. Les boîtes grisées correspondent au domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription GAL4.

La figure compile le travail réalisé par plusieurs équipes : a-Ohno *et al.*, 1993, b et e-Bailly *et al.*, 1994, c-Lessnick *et al.*, 1995 et d-May *et al.*, 1993.

transactivation par des protéines Ets (Gegonne *et al.*, 1993 et voir Zhang *et al.*, 1993 pour un exemple de site ets moins efficace). Ces auteurs démontrent eux aussi que le pouvoir transactivateur de la protéine Ews-Fli-1 est supérieur à celui de la protéine Fli-1 (Bailly *et al.*, 1994). Par ailleurs, ils montrent que les mécanismes d'activation de la transcription employés par les deux protéines seraient différents. En effet, en fonction d'une gamme de chacune des protéines exprimées, la réponse transcriptionnelle enregistrée est différente (Bailly *et al.*, 1994). Enfin, pour les protéines Ews-Fli-1 et Ews-Erg, le domaine situé en C-terminal du domaine Ets et le domaine Ews coopèrent vis-à-vis de la transactivation (Ohno *et al.*, 1994; Ohno *et al.*, 1993).

Ces données établissent donc que le domaine de type CTDpolII de la protéine Ews peut être un domaine transactivateur et qu'il peut participer à l'activation spécifique de la transcription, lorsqu'il est fusionné à un domaine de liaison à l'ADN tel que le domaine Ets ou le domaine de liaison à l'ADN de GAL4 (fig.5). Ces données sont aussi reproduites pour la protéine Tls-Erg (Prasad *et al.*, 1994). Les chimères Ews-Ets et Tls-Ets définissent donc des facteurs de transcription de type Ets. De plus, si le domaine Ets que ces protéines contiennent semble pouvoir cibler leur action au niveau de sites ets, le mécanisme d'activation de la transcription pourrait différer de celui employé par le facteur Ets sauvage correspondant (Bailly *et al.*, 1994).

## **IIc2            ... sont des facteurs de transcription aux gènes cibles spécifiques.**

Dans la continuité des travaux réalisés dans les cellules NIH3T3, une équipe a cherché à identifier les gènes régulés spécifiquement par les protéines Ews-Fli-1. Le principe de l'étude consiste en une sélection des ADN complémentaires correspondant à des ARN messagers exprimés de façon différentielle dans des cellules NIH3T3 exprimant de manière stable, d'une part Ews-Fli-1, et d'autre part Fli-1. Dix gènes ont ainsi été clonés dans une première étude, dont huit étaient sur-exprimés dans des cellules "Ews-Fli-1" et deux présentaient une expression réduite, par rapport aux cellules "Fli-1" (Braun *et al.*, 1995). Parmi les gènes surexprimés, trois gènes étaient déjà connus, codant : la stromélysine de type 1, l'homologue murin du cytochrome P450 F1, et la cytokératine de type 15. Un nouveau gène, *eat-2*, a été caractérisé, codant une protéine contenant un domaine SH2 d'interaction

protéique au niveau de tyrosines phosphorylées (Thompson *et al.*, 1996 pour une revue voir Zhou *et al.*, 1995). L'expression de ces quatre gènes est augmentée dans les cellules "Ews-Fli-1" par rapport aux cellules "Fli-1".

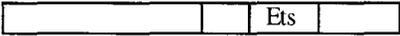
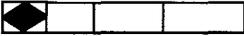
En dehors de Ews-Fli-1, d'autres protéines contrôlent aussi la régulation de l'expression de ces gènes, telles les protéines Ews-Erg ou Tls-Fli-1 (Braun *et al.*, 1995; Thompson *et al.*, 1996). Néanmoins dans ce type d'étude le caractère direct de ces régulations n'a pas été abordé : d'une part, les auteurs n'ont pas (encore) identifié les régions cibles de cette régulation au sein des promoteurs de chaque gène. D'autre part, leurs modèles d'étude ne permettent pas d'exclure que la régulation de ces gènes fait intervenir un autre facteur de transcription dont l'activité et/ou l'expression sont elles-même régulées suite à l'expression des protéines Ews-Fli-1 ou Ews-Erg ou encore Tls-Fli-1.

Cependant ces travaux montrent que les protéines Ews-Ets ou Tls-Ets peuvent être des facteurs de transcription responsables dans un contexte cellulaire donné de la régulation de gènes cibles spécifiques.

### **II C3 ... sont des facteurs de transcription spécifiques. Oui, mais...**

Certains des mutants présentés dans le cadre des expériences de caractérisation des propriétés de transactivation des protéines Ews-Ets et Tls-Ets en cellules NIH3T3, ont été testés pour leur pouvoir transformant en cellules NIH3T3. Il s'avère ainsi que la délétion de la région N-terminale du domaine de type CTDpolII de la chimère Ews-Fli-1 supprime à la fois le caractère transformant de la protéine délétée et l'activation de la transactivation en système "Gal4" (fig.6). Cependant, la délétion de la région C-terminale de ce domaine qui porte l'essentiel de l'activité vis-à-vis de la transcription (voir fig.6), conduit à une protéine au pouvoir transformant tout à fait comparable à la chimère complète (Lessnick *et al.*, 1995). Dans le contexte de la chimère Ews-Fli-1 dont la transactivation est étudiée par l'intermédiaire de sites ets, les délétions des régions N- ou C-terminales du domaines Ews conduisent à une diminution de la transactivation par rapport à celle observée en système Gal4.

Néanmoins, au sein de la protéine chimère Ews-Fli-1, les capacités à transactiver et à transformer ne sont que partiellement liées, dans le contexte cellulaire défini par les cellules NIH3T3.

|             |   | Nombre de clones transformés | Transactivation en système de chimères Gal 4 |
|-------------|---|------------------------------|--|
| Fli-1       |  | —                            | nd   |
| Ews-Fli-1   |  | 400                          | x100   |
| Ews-C-Fli-1 |  | 175                          | —  |
| Ews-N-Fli-1 |  | 50                           | +  |
| VP1-Fli-1   |  | 500                          | x200   |
| VP4-Fli-1   |  | 500                          | x1600  |
| Ets-2-Fli-1 |  | 100                          | x200   |
| Tls-Fli-1   |  | 400                          | —  |
| Gal4ADN     |   | nd                           | 1  |

**Figure 6 :**

**Corrélation partielle pour diverses chimères entre leur pouvoir transactivateur en système de chimères Gal4 et leur pouvoir transformant en cellules NIH3T3.**

A la différence de Ews-Fli-1, la protéine Fli-1 n'est pas transformante en cellules NIH3T3. Pour la protéine Ews-Fli-1, la région de la portion Ews essentiellement responsable de la transactivation est la région C-terminale (Ews-C), alors que celle responsable de la transformation se situe en N-terminal (Ews-N).

La fusion d'un exemplaire (VP1) ou de quatre exemplaires (VP4) du domaine acide de VP16 entraîne l'augmentation du pouvoir transactivateur de la chimère correspondante sans augmenter son pouvoir transformant.

Le domaine transformant de la protéine Tls n'est pas transactivateur.

La protéine chimère Ets-2-Fli-1 est une protéine Ets transformante à la différence de la protéine Fli-1.

Les constructions utilisées pour les tests de transactivation en chimères Gal4 ne sont pas représentées. Elles correspondent aux constructions schématisées ici, fusionnées en position C-terminale, au domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription GAL4, Gal4ADN, et déléetées des séquences codant le domaine Ets de Fli-1.

Les valeurs de transactivation sont données en unités arbitraires par rapport aux données obtenues avec une construction réduite au domaine Gal4ADN (valeur=1).

(D'après Lessnick *et al.* 1995).

Ces résultats sont à mettre en parallèle avec les résultats obtenus avec la chimère Tls-CHOP qui fusionne le domaine de type CTDpolIII de Tls au domaine de liaison à l'ADN de CHOP, un facteur de transcription de la famille C/EBP (Crozat *et al.*, 1993; Zinszner *et al.*, 1994). En effet, une protéine chimère remplaçant le domaine Tls par celui de Ews ou celui de SARFH, une protéine homologue de Ews et Tls clonée chez la Drosophile est transformante vis-à-vis des cellules NIH3T3. Pourtant, à la différence des chimères Ews-CHOP et Tls-CHOP, la chimère SARFH-CHOP n'est pas transactivatrice (Immanuel *et al.*, 1995).

**En conclusion**, que ce soit :

- à travers les différentes chimères artificielles évoquées précédemment, fusionnant le domaine C-terminal de Fli à divers domaines transactivateurs,

- au moyen des domaines N-terminaux des protéines homologues entre elles, Ews, Tls et SARFH,

- ou par le biais des délétants de la chimère Ews-Fli-1,

de nombreuses données nous mettent en garde quant à envisager le pouvoir transformant des protéines Ews-Ets ou Tls-Ets comme uniquement lié à l'expression de facteurs de transcription aberrants de la famille Ets. A moins que ces données ne nous fassent prendre conscience, éventuellement, du manque d'imagination qu'il y a à envisager chacune des protéines Ets comme un facteur de transcription *stricto sensus*.

## **III D En lisière de la forêt de facteurs de transcription Ets**

### **III D1 Définir un facteur de transcription spécifique**

J'ai profité du premier chapitre concernant la famille Ets pour donner la définition d'un facteur de transcription spécifique. Il me semble maintenant qu'à la lumière des résultats présentés concernant les tumeurs d'Ewing, plusieurs limites peuvent être posées à cette définition.

## **II D1a**      *Les sites spécifiques de reconnaissance*

La liaison directe des facteurs de transcription à l'ADN est étudiée *in vitro*, notamment par la technique de retard sur gel. Par cette technique d'étude de la liaison binaire ADN/protéine, aucune différence de "spécificité" de reconnaissance entre les protéines Fli-1 et Ews-Fli-1 n'a été observée (Bailly *et al.*, 1994; Mao *et al.*, 1994; May *et al.*, 1993a; Ohno *et al.*, 1994). Ce résultat a d'ailleurs aussi été obtenu pour les protéines Ews-Erg, Tls-Erg et Erg (Ohno *et al.*, 1994; Prasad *et al.*, 1994). Sans discuter des conditions expérimentales qui permettent l'observation de l'interaction ADN/protéine, sans doute faut-il relativiser la portée de ces résultats aux séquences utilisées dans ces études. Ce sont toutes des séquences préalablement connues pour interagir avec une protéine Ets (Bailly *et al.*, 1994; May *et al.*, 1993a; Ohno *et al.*, 1994; Prasad *et al.*, 1994) ou sélectionnées pour interagir préférentiellement avec le domaine Ets de Fli-1 (Mao *et al.*, 1994). De plus, de nombreux arguments montrent que la liaison spécifique à l'ADN peut difficilement se réduire à une relation binaire et que d'autres protéines interviennent pour stabiliser l'interaction ADN/protéine dans le cas des protéines Ets, notamment dans le cas des protéines GABP $\alpha$  et Elk (Hipskind *et al.*, 1991; Thompson *et al.*, 1991; Virbasius *et al.*, 1993).

Ainsi, les différences, aussi minimes soient elles, entre les séquences sélectionnées *in vitro* pour une liaison optimale de chacun des domaines Ets isolés, illustrent une certaine spécificité apportée par le domaine Ets lui-même à la protéine qui le contient. Néanmoins, pour autonomes que puissent être les divers domaines Ets, assimiler la liaison des protéines Ets à celle de leur domaine Ets est une vision réductrice.

## **II D1b**      *Les domaines de transactivation*

Deux approches permettent par mutagenèse de délétion ou ponctuelle de localiser les régions d'un facteur de transcription spécifiques importantes pour la régulation de la transcription : d'une part les études réalisées dans le contexte de la protéine naturelle, et d'autre part celles qui utilisent la construction de chimères par fusion de différents fragments protéiques à un domaine de liaison hétérologue (chimères Gal4, entre autre). Complémentaires, ces deux approches donnent parfois des

résultats contradictoires rarement expliqués. Ainsi j'ai mis en avant le travail de Bailly et de ses collaborateurs qui a le mérite de présenter l'influence de la quantité de protéines Fli-1 ou Ews-Fli-1 exprimées sur la régulation de la transcription. Alors que dans le contexte des protéines naturelles, un effet d'inhibition vis-à-vis de la transcription est visualisé pour les quantités les plus grandes de Ews-Fli-1 et pas pour Fli-1, c'est le contraire qui est observé en système Gal4 (Bailly *et al.*, 1994). Si ces données mettent en avant une différence fonctionnelle entre les domaines transactivateurs des deux protéines, elles montrent aussi les limites des systèmes d'étude.

Par l'intermédiaire d'un certain nombre de sites ets, Fli-1 a été définie comme un transactivateur modeste (Bailly *et al.*, 1994; May *et al.*, 1993a; Zhang *et al.*, 1993) que ce soit dans un contexte naturel ou de chimère Gal4. Cette observation est sans doute à mettre en parallèle avec la nature des sites ets ou gal4 utilisés dans ces études, qui sont des sites simples par opposition aux sites « complexes » présents dans les promoteurs viraux du virus HTLV1 (Bailly *et al.*, 1994) ou du promoteur cellulaire du gène de l'immunoglobuline  $\mu$ E2 (élément  $\pi$ 3 Rivera *et al.*, 1993, Lessnick *et al.*, 1995). Ces derniers sites semblent médier une activation de la transcription dépendante de Fli-1 de manière plus convaincante, par l'intermédiaire d'une coopération éventuelle avec d'autres facteurs de transcription tels que Sp-1 ou E12 respectivement (Gegonne *et al.*, 1993, Rivera *et al.*, 1993). La chimère Ews-Fli-1, définie comme "fortement" transactivatrice, n'active pas plus la transcription que Fli-1 par l'intermédiaire de l'élément  $\pi$ 3 (Lessnick *et al.*, 1995). Enfin, les protéines Tls-Fli-1 ou Tls-Erg ne semblent pas plus actives que les protéines Fli-1 et Erg dans les tests de transactivation réalisés (Lessnick *et al.*, 1995; Prasad *et al.*, 1994).

Ainsi, les tests de transactivation et les notions de transactivateur "fort "ou "faible" sont donc à considérer avec beaucoup de précaution. La fusion à un domaine de liaison à l'ADN hétérologue comme celui du facteur GAL4, par exemple, semble pouvoir affranchir de la nécessité de l'identification de sites de réponse réels, mais risque d'altérer les fonctions des domaines étudiés. L'étude des domaines transactivateurs au sein d'une protéine naturelle est, elle, largement conditionnée par le site de réponse transcriptionnel utilisé. En fait, de nombreux travaux relatent l'identification de sites ets importants pour la régulation d'un fragment de promoteur isolé (Ghysdael

and Boureux, 1997). Devant l'abondance de ces sites potentiels identifiés, toute démarche exhaustive est impossible. Caractériser chaque membre de la famille Ets en tant que facteur de transcription spécifique au moyen de sites ets génériques présente un intérêt fondamental indéniable. Cependant, les limites expérimentales exposées définissent la nécessité, pour chaque protéine Ets, d'isoler, ou de pouvoir sélectionner parmi celles déjà repérées, des séquences naturelles pour une étude moléculaire plus spécifique.

## **IID2** Etudier le pouvoir transformant des oncogènes

### **IID2a** *La transformation en système cellulaire*

L'étude des protéines Ews-Ets et Tls-Ets débute avec des observations d'ordre clinique corrélant des cancers humains et des translocations somatiques. Elle nécessitait le développement de système d'étude, et le pouvoir transformant des protéines chimères associées à ces translocations a ainsi été testé en cellules de la lignée NIH3T3 (Lessnick *et al.*, 1995; May *et al.*, 1993a). Si ces expériences ont donné les premiers arguments démonstratifs au lien causal éventuel entre les protéines réarrangées et les tumeurs d'Ewing notamment, ce type de modèle d'étude reste d'une portée limitée dans l'analyse des événements moléculaires présidant à la transformation cancéreuse des cellules de ET. La majeure partie des expériences concernant les protéines Ews-Ets a été effectuée avec les protéines Ews-Fli et Ews-Erg. L'expression de ces deux protéines entraîne la transformation des cellules NIH3T3 ; néanmoins dans le même système cellulaire, la protéine Ews-Er81 n'est pas transformante (cité par Braun *et al.*, 1995). Comment interpréter ce résultat? Reflète-t-il une absence de propriété transformante valable aussi dans l'histoire des cellules ET correspondantes? Ou, reflète-t-il une caractéristique fonctionnelle des cellules NIH3T3? A l'aval de cette deuxième hypothèse, il semble que d'autres lignées fibroblastiques murines ne soient pas transformées suite à l'expression de ces même protéines (Lessnick *et al.*, 1995; May *et al.*, 1993a).

Dans ce cadre, les gènes cibles potentiels isolés à partir de cellules NIH3T3 transformées par la protéine Ews-Fli-1 permettront peut être à terme de caractériser les événements moléculaires impliqués

dans la régulation de leur expression. Leur implication réelle dans un processus de transformation attend, en fait, un modèle d'étude.

## **IID2b**      *Les étapes d'une tumorigenèse*

C'est presque devenu un lieu commun d'affirmer que le développement d'une tumeur est un phénomène multi-étape. Dans le cas des tumeurs d'Ewing, c'est la récurrence de la translocation t(11;22) qui a entraîné l'étude des gènes impliqués dans ce réarrangement. Cependant, cette altération n'est pas la seule répertoriée au sein des cellules ET. Néanmoins, peu de données cliniques permettent de retracer la séquence de l'apparition de ces anomalies dans le processus de transformation cancéreuse. Par ailleurs, l'extinction ciblée des protéines chimères dans les cellules ET maintenues en culture ne suffit pas à entraîner la différenciation des cellules (Kovar *et al.*, 1996). Cette donnée préliminaire semble donc confirmer que les protéines Ews-Ets ne sont pas les seuls acteurs moléculaires de la transformation.

## **IID3**      **Les protéines "Ews-Ets" et "Tls-Ets", des facteurs de transcription spécifiques ou quoi d'autre?**

### **IID3a**      *Une nouvelle famille de gènes: la famille Ews/Tls*

L'isolement de nouveaux gènes montre en fait que les protéines Tls et Ews appartiennent à une famille de protéines de liaison à l'ARN, partageant toutes des motifs de liaison à l'ARN de type RRM et RGG, ainsi que, en position N-terminale, une région évoquant le domaine C-terminal de l'ARN polymérase de type II. Outre Ews et Tls, cette famille comprend une protéine de Drosophile, SARFH (Immanuel *et al.*, 1995) et trois autres protéines isolées chez l'homme : Tat-SF-1 (Zhou & Sharp, 1996), TAFII68 (Bertolotti *et al.*, 1996) et RBP56 (Morohoshi *et al.*, 1996). Elle serait aussi représentée chez *Caenorhabditis elegans*, par la séquence C27H5.3 (Morohoshi *et al.*, 1996).

La caractérisation moléculaire des protéines chimères qui réarrangent Tls et Ews tend à démontrer que, dans le contexte de ces protéines particulières, la région N-terminale de Tls et Ews comporte un domaine transactivateur. En dehors du clonage de RBP56, l'isolement des nouveaux gènes cités donne d'autres pistes pour aborder les rôles des protéines de la famille Tls/Ews. Par suite,

ils lèvent de nouvelles hypothèses quant au rôle transformant des protéines chimères qui concernent Ews et Tls.

### **IID3b**      **Tat-SF-1, SARFH et TAFII68 et l'activation basale de la transcription**

Tat-SF-1 a été isolée dans le cadre de la caractérisation biochimique de l'activation de la transcription médiée par la protéine virale Tat, du virus HIV-1 (Zhou & Sharp, 1995). Tat est une protéine qui influence la transcription en interagissant avec une séquence d'ARN particulière, TAR, présente au niveau de l'extrémité 5' de l'ARN messager viral nouvellement transcrit. Dans un système de reconstitution *in vitro*, l'activité Tat-SF définit la fraction (qui par suite est appelée Tat-SF) d'extraits nucléaires de cellules HeLa indispensable à l'activation de la transcription spécifique de la protéine Tat et dépendante de la séquence TAR. En présence de cette fraction Tat-SF, Tat active la transcription d'un gène codant la séquence TAR en stabilisant l'étape d'élongation de la transcription (Zhou and Sharp, 1995). La purification de la protéine portant cette activité biochimique définit la protéine Tat-SF-1 dont la séquence révèle qu'elle appartient à la famille Ews/Tls (Zhou and Sharp, 1996).

Ces travaux sont à rapprocher de l'étude de la protéine SARFH chez la drosophile. La protéine SARFH est associée aux zones de transcription active facilement observables dans les glandes salivaires de drosophile au niveau des «puffs» des chromosomes polyténiques (Immanuel *et al.*, 1995).

De même, la protéine TAFII68 a été mise en évidence dans le cadre de l'étude de l'activation basale de la transcription (par opposition à l'activation de la transcription par des facteurs de transcription spécifiques). Classiquement, on distingue plusieurs étapes clef dans la transcription dépendante de l'ARN polymérase de type II des cellules de mammifères : fixation de la protéine TBP, de liaison à la boîte TATA, au niveau des séquences d'initiation de la transcription contenant la boîte TATA, formation du complexe de pré-initiation, initiation de la synthèse de l'ARN messager, élongation et terminaison. TAFII68 est l'un des constituants spécifiques de l'un des complexes multiprotéiques TFIID, contenant la protéine TBP, dans le complexe de pré-initiation de la transcription. De plus, les auteurs de ce travail montrent que TAFII68 est aussi associée à l'ARN

polymérase de type II au cours de la phase d'élongation de la transcription (Bertolotti *et al.*, 1996). Ainsi, TAFII68 est un facteur général de transcription qui participe à deux étapes de la transcription basale : la formation du complexe de pré-initiation et l'élongation. C'est un facteur de transcription général à caractère spécifique puisqu'il ne participe qu'à une partie des complexes TFIID.

Ces exemples nous poussent à envisager que les protéines Ews et Tls, et donc les protéines chimères Ews-Ets et Tls-Ets, pourraient être des facteurs de transcription généraux intervenant à différentes étapes de la transcription, lors de la formation du complexe de pré-initiation et au cours de l'élongation. Bertolotti et ses collaborateurs montrent d'ailleurs que la protéine Tls est aussi associée à la protéine TBP dans certains complexes TFIID (Bertolotti *et al.*, 1996). Ils illustrent de plus la limite des notions de facteurs de transcription généraux associés à une seule étape de la transcription par l'intermédiaire de complexes multiprotéiques distincts : TAFII68 est une protéine associée à la TBP et à l'ARN polymérase II. Ces résultats troublent encore la distinction facteur de transcription général *versus* facteur de transcription spécifique : en effet, TAFII68 pourrait être un facteur général de transcription spécifique d'un sous-groupe de promoteurs à boîte TATA. Enfin, par l'exemple de l'activation par la protéine virale Tat, ils nous montrent que l'activation spécifique de la transcription ne se réduit pas à l'activation de l'initiation de la transcription mais peut aussi refléter une stabilisation de l'étape d'élongation. Cependant l'activation basale de la transcription n'est pas la seule piste à envisager pour les protéines de liaison à l'ADN de la famille Ews/Tls.

### **IID3c**      *Des protéines intervenant dans la maturation des ARN messagers*

Dans le cadre de la caractérisation biochimique et moléculaire de complexes ribonucléoprotéiques associés aux ARN pré-messagers, la protéine hnRNP P2 s'est révélée être la protéine TLS (Calvio *et al.*, 1995). Au sein du complexe ribonucléique, Tls/hnRNP P2 est associée aux protéines hnRNP A1, B1, C1 et G. La protéine hnRNP A1 illustre elle aussi le caractère pléiotrope des fonctions portées par les protéines de liaison à l'ARN. La protéine hnRNP A1 pourrait être impliquée dans le transport des ARN messagers du noyau vers le cytoplasme (Fridell *et al.*, 1997; Izaurralde *et*

*al.*, 1997). De plus, elle vient d'être caractérisée en tant que facteur d'épissage spécifique capable d'influencer *in vitro* l'épissage alternatif d'un ARN messager par l'intermédiaire de séquences d'ARN particulières : la liaison de hnRNP A1 au niveau de cette séquence orienterait le choix des sites d'épissage réarrangés au cours de la maturation des ARN pré-messagers (Chabot *et al.*, 1997). Enfin, sa liaison au niveau de séquences d'ARN régulatrices de la transcription de l'ARN viral du virus de l'hépatite suggère qu'elle pourrait, elle aussi, être impliquée dans des mécanismes de régulation de la transcription (Li *et al.*, 1997). Les protéines de la famille Ews/Tls pourraient être impliquées dans ces divers mécanismes. En effet, la protéine Tls, que d'autres travaux montrent associée à un complexe TFIID (Bertolotti *et al.*, 1996), navigue elle aussi entre le noyau et le cytoplasme (Zinszner *et al.*, 1997). De plus, en association avec la protéine Spi-1/Pu.1 de la famille Ets, elle serait, elle aussi, un facteur d'épissage capable, *in vitro* et *in vivo*, d'influencer l'épissage du transcrit correspondant à un mini-gène synthétique (Halliez, communication personnelle). Enfin, la sous-localisation cellulaire de Tls au niveau du nucléole suggère qu'elle pourrait être impliquée dans des processus particuliers d'épissage (Zinszner *et al.*, 1997).

Ainsi, l'ensemble de ces travaux montre que les protéines Tls et Ews naturelles sont des protéines de liaison à l'ARN, associées à des complexes multiprotéiques impliqués au niveau de différentes étapes de la biosynthèse des ARN messagers. Ces propriétés, en partie portées par la région N-terminale des protéines Tls et Ews (Zinszner *et al.*, 1997) pourraient intervenir dans le caractère transformant des protéines réarrangées, suite aux différentes translocations. Enfin des données récentes montrent l'implication de la protéine Ets Spi-1/Pu.1 en association avec Tls au niveau de complexes d'épissage. Ces résultats ouvrent, d'une part, de nouveaux horizons fonctionnels aux protéines de la famille Ets, et d'autre part, suggèrent que les translocations, notamment dans le cas des tumeurs d'Ewing, fixent par le biais d'une fusion traductionnelle des interactions intermoléculaires naturellement fonctionnelles.

**En conclusion,** plusieurs remarques :

- *Les facteurs de transcription de la famille Ets, une idée fixe aux limites techniques étroites.* Si la conservation du domaine Ets au sein des protéines Ets, en terme de séquence primaire et de structure, est un argument en faveur de son implication fonctionnelle, l'observation des protéines Ets par le biais des tests de transactivation est une observation biaisée qui force leur définition en tant que facteurs de transcription spécifiques. Les exemples récents apportés par l'étude du facteur de transcription Spi-1/Pu.1 montrent que ces protéines pourraient jouer d'autres fonctions dans le contrôle de l'expression génique.

- *A la croisée des approches expérimentales, de nouvelles dimensions fonctionnelles.* Dans la continuité de cette première remarque, je voudrais mettre l'accent sur les travaux dont les conclusions rendent un peu plus flou le cartésianisme des modèles établis. En particulier, nous sommes à une époque charnière où le caractère spécifique *versus* général des facteurs de transcription est nuancé par différents exemples de protéines qui illustrent le continuum moléculaire qui relie ces deux notions.

- *La famille que l'on oublie parfois.* Peu de données concernent encore les paramètres qui conditionnent, au niveau d'un site de co-expression, la spécificité d'action (ou la redondance) de différents facteurs de transcription de la famille Ets. Hormis le cas de l'invalidation d'un gène par recombinaison homologue sans phénotype détectable, ou celui de l'identification de facteurs de transcription répresseurs par opposition aux congénères transactivateurs, les conséquences fonctionnelles de la conservation du domaine Ets sont rarement discutées à l'échelle de la famille.

### **III REGULATION PAR FUSION AUX DOMAINES DE LIAISON DE L'HORMONE DES RECEPTEURS NUCLEAIRES**

Depuis une dizaine d'années une stratégie de création de mutants conditionnels s'est développée, tirant partie de ce que le domaine de liaison de l'hormone des récepteurs de type stéroïdien est autonome et transférable à d'autres protéines. Les protéines chimères obtenues par fusion traductionnelle avec l'un de ces domaines régulateurs sont inactives en absence de ligand et rapidement activées après addition du ligand approprié (pour une revue à caractère pratique concernant les protéines fusionnées aux domaines de liaison du ligand des récepteurs de type stéroïdien, voir Mattioni *et al.*, 1994).

## Quelques généralités sur les récepteurs nucléaires

La réponse cellulaire aux hormones stéroïdiennes (dérivées du cholestérol) est médiée par des récepteurs intracellulaires spécifiques : les récepteurs aux oestrogènes, à la progestérone, aux minéralocorticoïdes, aux corticostéroïdes et aux androgènes. Les gènes codant les récepteurs de type stéroïdien appartiennent à la famille des récepteurs nucléaires. Cette famille regroupe aussi les récepteurs à l'hormone thyroïdienne, à la vitamine D, aux rétinoïdes et à l'ecdysone ainsi que des récepteurs dits orphelins. Sans ligand actuellement connu, ils furent identifiés comme membres de cette famille sur la base des taux d'identité de séquence significatifs qu'ils partagent avec les gènes des récepteurs déjà cités. La famille des récepteurs nucléaires constitue, chez les eucaryotes, une des plus grandes familles de facteurs de transcription. Dans le cas des récepteurs pour lesquels un ligand a été identifié, leur activité de régulateur en *trans* de la transcription (transactivateur) est modulée par ce ligand.

De nombreuses revues ont été consacrées aux récepteurs nucléaires. Entre autres, celle de Yamamoto en 1985 (Yamamoto, 1985) pour une revue des travaux réalisés avant le clonage des récepteurs, celle de Evans en 1988 (Evans, 1988) pour une des premières synthèses concernant le découpage moléculaire des récepteurs en domaines fonctionnels; celle de Tsai et O'Malley de 1994 (Tsai & O'Malley, 1994) pour une revue détaillant la caractérisation fine des interactions entre récepteur et ADN (tirées des données de cristallographie) et présentant un bilan intermédiaire des réseaux moléculaires liant les récepteurs à la machinerie basale de transcription (obtenu par des systèmes acellulaires de reconstitution) ; enfin celles publiées dans la revue *Cell* en 1995 à l'occasion des 10 ans de travaux de recherche suivant les premiers clonages de récepteurs, notamment celle de Beato (Beato *et al.*, 1995) et celle du groupe de Chambon (Kastner *et al.*, 1995) présentant l'invalidation des gènes codant différents récepteurs nucléaires, et celle de Thummel (Thummel, 1995) présentant les résultats dérivés de l'analyse du modèle génétique qu'est la *Drosophile*.

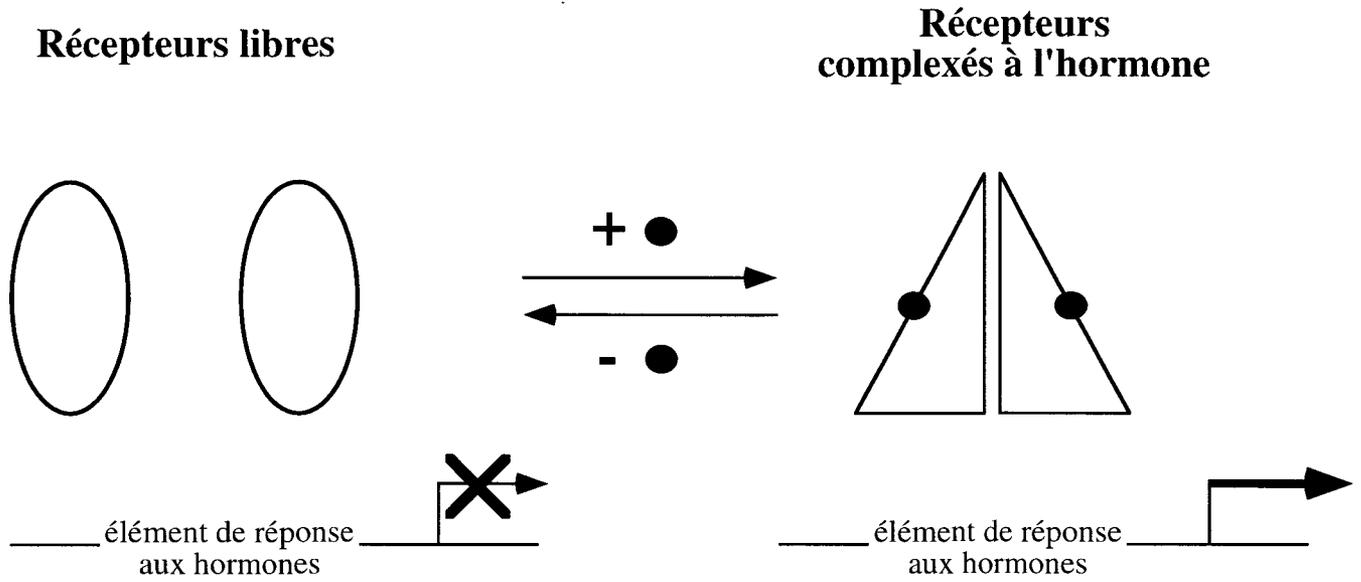
Je présenterai juste les résultats initiaux de caractérisation moléculaire des récepteurs stéroïdiens qui ont permis le développement des chimères et qui éclairent leur fonctionnement, en me limitant aux études concernant le récepteur aux glucocorticoïdes et le récepteur aux oestrogènes.

### **III A Les domaines fonctionnels du récepteur aux oestrogènes et du récepteur aux glucocorticoïdes : définition**

Le récepteur aux glucocorticoïdes et le récepteur aux oestrogènes sont en fait les premiers facteurs de transcription spécifiques caractérisés chez les eucaryotes supérieurs. Cette caractérisation s'est faite à travers l'utilisation d'outils qui ont ensuite été appliqués à l'étude des autres facteurs de transcription eucaryotes. Il s'agit, par exemple, des tests "rapporteurs". Ils permettent de doser une activité enzymatique (ou l'expression d'un transcrit quantifiable par protection vis-à-vis de la RNase) qui reflète l'activité transcriptionnelle initiée au niveau de séquences promotrices données. Ainsi ces tests donnent accès, non seulement à l'étude de séquences promotrices, mais aussi à la caractérisation des facteurs de transcription en domaines fonctionnels. De plus, diverses stratégies de construction de facteurs de transcription hybrides se sont révélées riches d'enseignements, telles que les expériences d'échange de domaines, ou de réalisation de chimères Gal4, ainsi que l'illustre la présentation des résultats qui suit.

#### **III A1 Le clonage**

Avant leur clonage, les récepteurs aux glucocorticoïdes et aux oestrogènes avaient été purifiés par voie biochimique, par chromatographie d'affinité, à l'aide de ligands synthétiques. Leur étude par protéolyse ménagée avait conduit à l'hypothèse de leur structuration en domaines fonctionnels différents pour la liaison à l'ADN et la liaison de l'hormone. Enfin, les premiers modèles d'allostérie du récepteur étaient établis, selon lesquels la liaison de l'hormone entraînerait la "transformation" du récepteur d'une forme libre, inactive, à une forme active complexée à l'hormone (Yamamoto, 1985) (fig.7).



**Figure 7 :**

**Modèle schématique d'allostérie des récepteurs nucléaires à ligand.**

En présence de l'hormone, le récepteur adopterait une nouvelle conformation. L'étude initiale des récepteurs stéroïdiens corrèle cette "transformation" du récepteur à l'activation de la transcription. (La formation de dimères de récepteurs en présence d'hormone est introduite plus loin dans le texte.)

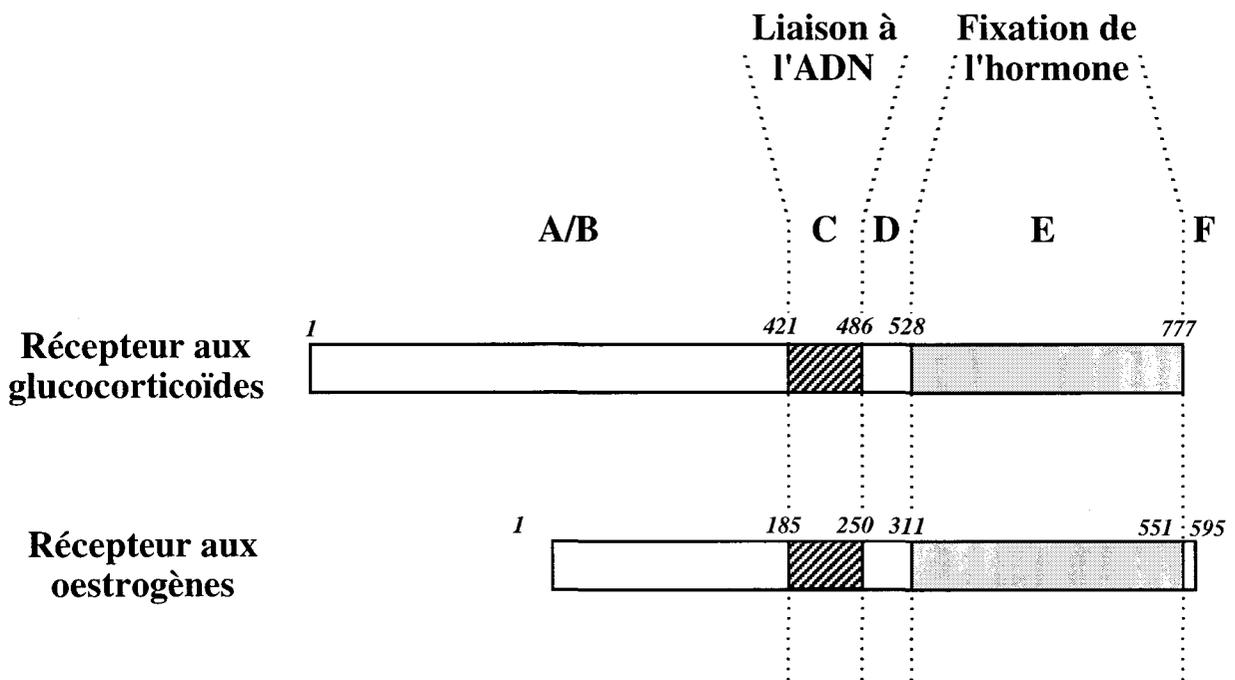
Le développement des techniques de biologie moléculaire a permis leur clonage par criblage d'épitope (Hollenberg *et al.*, 1985; Weinberger *et al.*, 1985) ou par utilisation d'une sonde nucléotidique dérivée de la séquence peptidique (Green *et al.*, 1986; Walter *et al.*, 1985) et le séquençage des ADNc isolés. Ainsi, les premières comparaisons de séquence permettaient de définir deux sous-régions C et E très conservées au sein des récepteurs aux oestrogènes (aviaire et humain) et aux glucocorticoïdes (humain), encadrées par les régions A/B, D et F moins conservées (Krust *et al.*, 1986).

Cette structure reste applicable à tous les membres de la famille des récepteurs nucléaires isolés depuis (fig.8).

### **III A2** L'étude classique

Les ADNc et différents délétants ont été exprimés en cellule après transfection (Kumar *et al.*, 1986), ou *in vitro* (Rusconi & Yamamoto, 1987). Les récepteurs, et les protéines obtenues par délétion, ont été le substrat d'expériences *in vitro* de liaison de l'hormone et de fixation à l'ADN réalisées jusqu'alors avec les récepteurs endogènes purifiés. Ainsi la région C s'est avérée contenir le domaine de liaison à l'ADN et la région E, le domaine de liaison de l'hormone.

Ces résultats confirmaient les données obtenues au cours des expériences de protéolyse ménagée des récepteurs purifiés. Néanmoins, ces approches ne permettaient pas d'étudier les mécanismes moléculaires par lesquels les récepteurs interféraient avec la régulation de la transcription, observée après l'addition de l'hormone (pour une revue voir Evans, 1988). Deux stratégies ont permis d'aborder ces questions : le développement de systèmes acellulaires de reconstitution (que je ne détaillerai pas) et l'étude des récepteurs au moyen des tests rapporteurs.



**Figure 8 :**

**Schéma d'organisation des récepteurs aux oestrogènes et aux glucocorticoïdes humains établi sur la base de la comparaison des séquences protéiques des deux récepteurs.**

Les positions des acides aminés extrêmes des 5 régions A/B, C, D, E et F délimitées sont données en italique.

Les régions C et E sont les deux régions les plus conservées, avec des taux d'identité de séquences respectivement de 50% et 30%.

La région C contient le domaine de liaison à l'ADN.

La région E contient le domaine de fixation de l'hormone (d'après Evans, 1988).

## **III B Etude à l'aide des systèmes rapporteurs de l'activité de facteur de transcription**

Des séquences d'ADN particulières ont été mises en évidence qui médient la régulation transcriptionnelle de certains gènes en réponse au traitement hormonal. Elles ont été appelées éléments de réponse aux hormones. La mise au point de tests rapporteurs des activités de facteur de transcription a permis d'établir que les récepteurs sont des facteurs de transcription spécifiques, effecteurs de la réponse hormonale. Ce sont des facteurs de transcription dont l'activité est conditionnée par la présence de l'hormone.

Ainsi, en présence de dexaméthasone, le récepteur aux glucocorticoïdes est capable d'activer la transcription *via* des séquences, (éléments de réponse aux glucocorticoïdes) contenues dans le LTR (« long terminal repeat ») du virus MMTV induisant des tumeurs mammaires chez la souris (Giguere *et al.*, 1986). Le récepteur aux oestrogènes est transactivateur *via* des séquences (élément de réponse aux oestrogènes : ERE) contenues dans le promoteur de la vitellogénine ou dans celui du gène pS2, en présence d'oestrogènes (Green & Chambon, 1987; Kumar *et al.*, 1987).

Les domaines protéiques fonctionnels intervenant dans la régulation transcriptionnelle ont été cartographiés par mutagenèse (de délétion ou ponctuelle) des récepteurs.

### **III B1 En mutant la région C : le domaine de liaison à l'ADN**

Les mutations dans la région C engendrent des récepteurs mutants incapables d'activer la transcription en test de transactivation (Godowski *et al.*, 1987; Hollenberg & Evans, 1988; Kumar & Chambon, 1988; Kumar *et al.*, 1987). De plus, la région C est suffisante pour conférer la spécificité de reconnaissance de l'ADN. En effet, l'expérience "d'échange de domaines" entre les régions C des récepteurs aux glucocorticoïdes et aux oestrogènes a conduit à l'obtention de récepteurs hybrides aux capacités de reconnaissance de l'ADN interchangeables (Green and Chambon, 1987). Le motif structural du domaine de liaison à l'ADN est constitué de deux "doigts de zinc" de type C2C2 (Schwabe & Rhodes, 1991). La réalité structurale de ce motif avait été devinée sur la base des identités de séquence

partagées entre la région C et le premier motif structural "en doigt de zinc" décrit, au sein du facteur TFIIIA (Miller *et al.*, 1985). Par mutagenèse dirigée, la séquence peptidique responsable de la spécificité de reconnaissance a été réduite à la boîte P (Mader *et al.*, 1989; Umesono & Evans, 1989) au sein de laquelle l'identité de trois acides aminés fixe la nature de la séquence cible reconnue. De plus, les récepteurs stéroïdiens se fixent sous forme de dimères au niveau de leur séquence cible, et c'est dans la région E que se situe l'interface majeure de dimérisation (dont la fonction est d'ailleurs dépendante de la liaison de l'hormone) (Tora *et al.*, 1989a).

### **III B2      En délétant la région E : le domaine AF1 et quelques hypothèses quant au contrôle hormonal de l'activité des récepteurs**

Les mutants affectant par délétion la région E, sont des mutants de perte de fonction partiels vis-à-vis des tests de transactivation (Godowski *et al.*, 1988; Godowski *et al.*, 1987; Hollenberg and Evans, 1988; Kumar *et al.*, 1987). Ils ont permis la mise en évidence d'un domaine d'activation de la transcription sous-localisé dans la région N-terminale, A/B, du récepteur, nommé AF1 (Fonction d'Activation 1) (Godowski *et al.*, 1988; Hollenberg and Evans, 1988; Kumar *et al.*, 1987). En effet, ces mutants sont des facteurs de transcription constitutifs, aux propriétés de transactivation variables en comparaison du récepteur sauvage (de 100% et même 120% à 0%).

Ces expériences montrent de plus que la délétion de la région E supprime le contrôle hormonal de la liaison du récepteur à l'ADN. A titre d'exemple, le récepteur aux oestrogènes délété de la région E est inactif quant à l'activation de la transcription mais il reste capable d'entrer en compétition vis-à-vis de la transactivation médiée par le récepteur sauvage (Kumar *et al.*, 1987). Ceci a amené deux hypothèses pour le contrôle de la liaison du récepteur à l'ADN par la fixation au ligand : ou le domaine de liaison de l'hormone masque le domaine de liaison à l'ADN du récepteur en absence d'hormone, ou bien la liaison de l'hormone permet un changement de conformation du récepteur qui le rend fonctionnel pour la reconnaissance des séquences cibles du récepteur. Les expériences décrivant l'importance de la dimérisation du récepteur aux oestrogènes pour sa fixation à l'ADN, amenaient une autre hypothèse : celle du contrôle de l'activité des récepteurs stéroïdiens par le contrôle hormonal de leur dimérisation (Tora *et al.*, 1989a). Les mécanismes moléculaires qui stabilisent la conformation

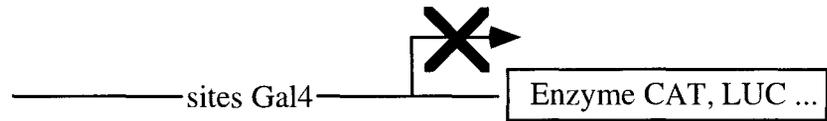
des récepteurs stéroïdiens (et plus généralement celle des récepteurs nucléaires à ligand) en absence d'hormone sont encore largement inconnus.

En outre, si ces mutants dans la région E permettaient de mettre en évidence la fonction du domaine AF1 des récepteurs, ils mettaient aussi en évidence par défaut l'existence d'un autre domaine de transactivation.

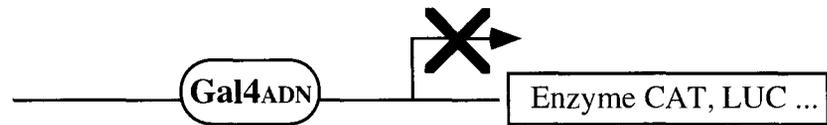
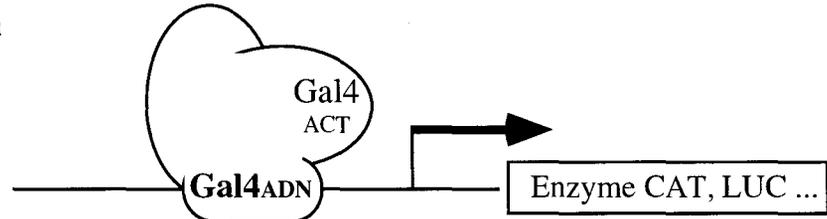
### **III B3      Quelques chimères pour, entre autre, localiser le domaine de transactivation AF2**

C'est pour répondre à la question de la localisation de ce domaine que les chimères Gal4 ou LexA ont été construites. Ces chimères fusionnent le domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription de levure GAL4 (acides aminés 1 à 74) ou bactérien LEXA à différents fragments protéiques des récepteurs aux glucocorticoïdes ou aux oestrogènes (Godowski *et al.*, 1988; Hollenberg and Evans, 1988; Webster *et al.*, 1988) (fig.9) . Cette stratégie permet d'étudier les capacités d'activation de la transcription des fragments fusionnés aux domaines de liaison à l'ADN hétérologues *via* les séquences cibles des facteurs LEXA ou GAL4. Elle a permis de confirmer l'existence des domaines AF1. Quant aux domaines de liaison de l'hormone, chacun d'eux apporte un domaine transactivateur à la chimère correspondante dont l'activité est modulée par le ligand approprié. Ces chimères se comportent comme des nouveaux récepteurs inductibles par leur hormone respective, pour lesquels la spécificité de reconnaissance de l'ADN est définie par le domaine de liaison hétérologue utilisé (fig.10). Le domaine de transactivation portée par la région E a été appelée AF2.

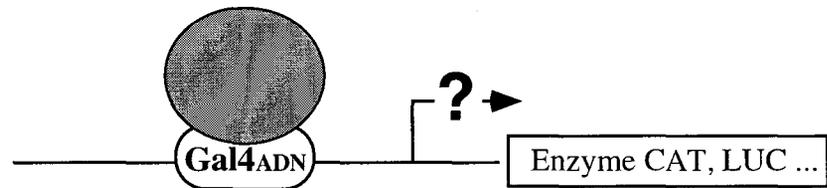
Au sein des récepteurs, l'importance fonctionnelle relative des domaines AF1 et AF2 est dépendante non seulement de l'élément de réponse testé (Godowski *et al.*, 1987) mais aussi du contexte cellulaire (voir la discussion de Berry *et al.*, 1990; Tora *et al.*, 1989a).



**A** Facteur de transcription GAL4



**B** Domaine protéique à caractériser



**Figure 9 :**

**Principe de caractérisation des propriétés de transactivation d'un domaine protéique grâce aux chimères "Gal4".**

Les capacités de transactivation sont évaluées à l'aide d'un test enzymatique, qui reflète l'activité de transcription initiée au niveau de séquences promotrices contenant des sites de réponse au facteur de transcription GAL4 (l'initiation de la transcription est figurée par la flèche brisée).

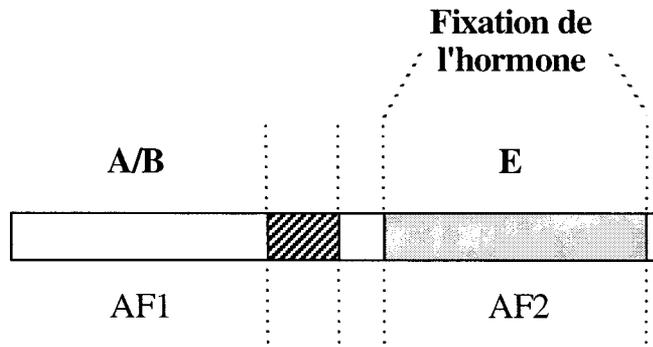
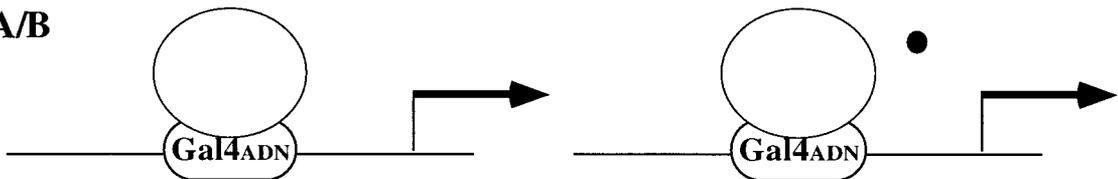
Les séquences codant diverses enzymes peuvent être utilisées, telles la Chloramphénicol Acétyl Transférase -CAT- ou la luciférase -LUC.

L'expression de l'enzyme choisie est activée au niveau transcriptionnel par tout facteur de transcription dont la spécificité de reconnaissance de l'ADN est ciblée par le domaine de liaison à l'ADN du facteur GAL4, Gal4ADN.

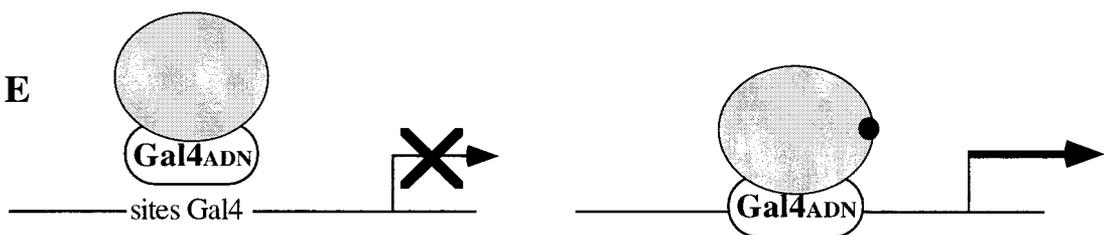
Gal4ACT symbolise le domaine transactivateur de GAL4 (A).

Le domaine protéique à caractériser est figuré par le disque grisé (B). Ses capacités à activer la transcription sont étudiées au moyen d'une construction qui permet l'expression d'une protéine hybride où le domaine protéique d'intérêt est fusionné au domaine Gal4ADN.

La figure rappelle que le domaine Gal4ADN ne possède pas la capacité d'activer la transcription.

**A****B****En absence d'hormone****En présence d'hormone****Région A/B**

La région A/B contient le domaine de transactivation AF1 dont l'activité est indépendante de l'hormone

**Région E**

La région E contient un domaine de transactivation inducible par l'hormone AF2

**Figure 10 :**

**Le domaine de liaison de l'hormone des récepteurs de type stéroïdien comporte un domaine d'activation de la transcription AF2 dont l'activité est conditionnée par l'hormone appropriée.**

A. Rappel de la structure du récepteur aux oestrogènes pris comme exemple.

B. Schéma des tests de transactivation en chimère Gal4 utilisant les régions A/B et E.

La région A/B comporte le domaine AF1 dont l'activité est indépendante de la présence de l'hormone. La région E comporte le domaine AF2 dont l'activité est conditionnée par la fixation de l'hormone (figurée pour le dique noir).

**?** Ces expériences ne suffisent pas pour conclure quant à la fixation de la chimère GalER(E) à l'ADN, en absence d'hormone.

### **III B4**      **L'autonomie du domaine de liaison de l'hormone**

La fusion au domaine de liaison de l'hormone du récepteur aux oestrogènes ou aux glucocorticoïdes entraîne aussi la régulation de la fonction de liaison à l'ADN du domaine de liaison à l'ADN de GAL4 (Gal4<sub>ADN</sub>) par le ligand concerné. La démonstration élégante utilise la co-expression de Gal4<sub>ADN</sub>, ou du facteur sauvage GAL4, et de chacune des deux chimères, GalER(74, 282) et GalGR(74, 500). L'expression de Gal4<sub>ADN</sub> entraîne l'inhibition de l'activation de la transcription médiée par chacune des deux chimères en présence de leur ligand respectif. Cette première partie de l'expérience montre la liaison de GalER et GalGR à l'ADN en présence de l'hormone. En l'absence d'hormone, ces deux chimères sont incapables d'entrer en compétition avec la transactivation médiée par le facteur de transcription sauvage GAL4. Ceci démontre leur incapacité à se fixer à l'ADN dans ces conditions (Webster *et al.*, 1988). Je reviendrai encore à l'étude de ces chimères un peu plus loin.

Ainsi, ces chimères sont les premières fusions "ER" et "GR" respectivement, appliquées à la régulation de la fonction de liaison à l'ADN d'un domaine hétérologue différent du domaine de liaison à l'hormone des récepteurs stéroïdiens.

L'autonomie du domaine de liaison des récepteurs stéroïdiens est confirmée dans le groupe de Yamamoto avec la construction de différentes chimères fusionnant le facteur de transcription viral E1A de l'adénovirus et le domaine de liaison de l'hormone du récepteur aux glucocorticoïdes (Picard *et al.*, 1988). Dans ce cas, les auteurs étudient les fonctions du facteur de transcription viral qui sont placées sous le contrôle des glucocorticoïdes.

### **III B5**      **La mutation Val400**

Je voudrais terminer cet exposé des premiers travaux concernant les récepteurs aux glucocorticoïdes et aux oestrogènes par le travail caractérisant la mutation Val400 (Tora *et al.*, 1989b) présente dans l'ADNc du récepteur humain aux oestrogènes. Alors que la première séquence du

récepteur aux oestrogènes humain publiée présente en position 400 une valine (Val) (Green *et al.*, 1986), des travaux indépendants montrent une glycine en position 400 (Gly) (Ponglikitmongkol *et al.*, 1990). En fait, la présence d'une valine en position 400 est une mutation artéfactuelle, puisque les cellules à l'origine de la banque criblée n'expriment pas cette mutation (Tora *et al.*, 1989b).

Située dans le domaine de liaison de l'hormone, la mutation Val400 a pour conséquence fonctionnelle de rendre le récepteur muté moins sensible aux oestrogènes (constante d'affinité diminuée d'un facteur 100 en test de fixation du ligand *in vitro*, réponse aux oestrogènes à des concentrations 100 fois plus élevées en transfection transitoire). Par ailleurs, le récepteur sauvage (Gly400) présente un niveau d'activité plus élevé sans ajout d'hormone au milieu de culture (activité basale) que le récepteur mutant (Val400). Cette propriété pourrait être liée à une activité oestrogénique résiduelle présente dans le milieu de culture (Tora *et al.*, 1989b), ou à une propriété intrinsèque du récepteur sauvage (Tzukerman *et al.*, 1990) sans que la question ne soit encore tranchée.

Pour des raisons historiques, c'est le domaine de liaison de l'hormone du récepteur muté (Val400) qui a été utilisé pour la chimère GalER(74, 282) mais aussi pour la première chimère ER concernant une protéine de pleine longueur, le facteur de transcription v-Myc (vMycER). Pour les avantages que le domaine muté apporte aux chimères, par rapport aux autres domaines utilisables (voir plus loin), c'est ce domaine (Val400) qui a été utilisé dans la majorité des chimères ER, et notamment dans la chimère ErmER construite dans le groupe (Pelczar *et al.*, 1997).

### **En conclusion,**

L'ensemble de ces travaux démontre à l'échelle moléculaire que les récepteurs stéroïdiens sont des facteurs de transcription inductibles par leur ligand. Ils ont permis d'identifier la structure en domaines des récepteurs. Les travaux ultérieurs sont la poursuite de la caractérisation des propriétés portées par les différents domaines dans le but d'élucider les mécanismes moléculaires qui médient la réponse cellulaire aux hormones. Si l'observation corrélant la formation de chromosomes polyténiques dans des cellules des glandes salivaires de *Drosophile* sous l'action de l'ecdysone remonte à 1974 (Ashburner, 1974), les acteurs qui relient les récepteurs à la machinerie basale de transcription

commencent à être identifiés depuis peu (voir les revues Beato *et al.*, 1995; Horwitz *et al.*, 1996; Mangelsdorf *et al.*, 1995; Thummel, 1995). Dans l'étude globale des récepteurs je m'arrêterai à la construction de ces premières chimères.

A partir de 1989, cette stratégie a été appliquée à de nombreuses protéines pour l'étude des fonctions qu'elles portent et non plus seulement dans le cadre de l'étude des récepteurs nucléaires.

### **III C Régulation par fusion aux domaines de liaison de l'hormone de récepteurs nucléaires : les exemples**

J'ai exposé précédemment quelques travaux qui ont contribué à démontrer que les récepteurs nucléaires ont une structure modulaire et, entre autre, que le domaine de liaison de l'hormone des récepteurs, de type stéroïdien notamment, est autonome et transférable à d'autres protéines. Ce résultat a amené la mise en place d'une stratégie de construction de mutants conditionnels par fusion traductionnelle de la séquence codant la protéine d'intérêt et de celle codant le domaine de liaison de l'hormone d'un récepteur nucléaire dont le ligand est connu. Les chimères E1AGR (Picard *et al.*, 1988) et MycER (Eilers *et al.*, 1989) sont les premiers exemples d'application de cette stratégie. Pour illustrer cette démarche et la diversité tant des domaines régulateurs utilisés que des fonctions régulées, j'ai dressé une liste des chimères (Tableau 1). J'ai choisi de vous détailler ces différents exemples selon l'éclairage qu'ils donnent de l'utilisation de ces chimères.

#### **III C1 Les domaines de liaison de l'hormone (DLH) utilisés**

##### **III C1a *Le DLH du récepteur aux oestrogènes***

Différents domaines de liaison de l'hormone de récepteurs nucléaires ont été utilisés en fusion traductionnelle pour la réalisation de mutants conditionnels. Le domaine de liaison de l'hormone (DLH) plus couramment utilisé est le DLH du récepteur aux oestrogènes, comme en rend compte le tableau 1. Il y a plusieurs raisons à cela : une raison historique, puisque le DLH du récepteur aux oestrogènes est l'un des premiers DLH, avec le DLH du récepteur aux glucocorticoïdes, à être cloné et

utilisé dans le cadre de la réalisation de chimères (voir précédemment). De plus, dans ce type de système inductible, l'expression du récepteur sauvage endogène est généralement indésirable puisqu'elle complique l'analyse de la réponse cellulaire hormonale. Le récepteur aux oestrogènes présente une expression plus restreinte que celle du récepteur aux glucocorticoïdes (discuté dans la revue de Mattioni *et al.*, 1994). Cet aspect a favorisé l'utilisation du DLH du récepteur aux oestrogènes même si un certain nombre de travaux, que je détaillerai un peu plus loin, ont cherché à développer l'utilisation du DLH d'autres récepteurs. Ensuite, les hormones sont actives à de très faibles concentrations et les DLH sont activables à de très faibles concentrations d'hormones. Devant cet aspect du contrôle hormonal, le DLH du récepteur aux oestrogènes utilisé présente l'avantage par rapport aux autres DLH d'être un mutant moins sensible que le récepteur sauvage (Tora *et al.*, 1989b, voir aussi avant). Ainsi, les conditions de culture (déplétion en hormones du sérum ajouté au milieu de culture) permettant l'absence d'activation du DLH sont plus facilement obtenues pour le DLH du récepteur aux oestrogènes que pour les autres DLH. Dans le même ordre d'idée, il faut néanmoins mentionner le développement d'un mutant du récepteur aux oestrogènes rendu "insensible" à l'hormone et activable par un ligand à activité antagoniste partielle vis-à-vis du récepteur sauvage (Littlewood *et al.*, 1995) : ce DLH mutant n'est pas activé en présence de sérum et il permet donc l'exploitation de systèmes cellulaires tributaires de la présence de sérum complet dans le milieu de culture. Enfin, évoquons le DLH du récepteur à l'ecdysone qui semblait offrir le meilleur contrôle "éteint" pour un DLH : en effet, les cellules de mammifères ne synthétisent pas d'ecdysone et le récepteur à l'ecdysone n'est pas activé par les hormones de vertébrés. Cependant, aucune chimère utilisant ce DLH n'est publiée à ce jour.

J'en reviens néanmoins aux DLH des autres récepteurs que le récepteur aux oestrogènes.

### **III C1b**      *Le DLH du récepteur à l'hormone thyroïdienne*

L'utilisation du DLH du récepteur de l'hormone thyroïdienne a été validée par Hollenberg et ses collaborateurs qui publient une chimère MyoDTR. Cette chimère fusionne le facteur de transcription myogénique MyoD et le DLH du récepteur à l'hormone thyroïdienne (Hollenberg *et al.*, 1993). Pour des lignées stables de cellules fibroblastiques murines 10T1/2 exprimant la chimère MyoDTR la

différenciation musculaire et l'expression de différents marqueurs musculaires sont placées sous le contrôle de l'hormone thyroïdienne.

### **III C1c**      *Le DLH du récepteur aux minéralocorticoïdes*

Pour le DLH du récepteur aux minéralocorticoïdes, une chimère GCN4MR a été construite et testée en transfection transitoire vis-à-vis de la régulation de l'activité de facteur de transcription de la protéine de levure GCN4. Par rapport à la chimère correspondante GCN4ER, la chimère GCN4MR présente un profil de régulation de son activité comparable (voir aussi après). En outre, les auteurs mettent aussi en avant la grande affinité du DLH du récepteur aux minéralocorticoïdes pour le ligand agoniste utilisé, l'aldostérone : ceci permet son utilisation à des concentrations auxquelles il est peu probable que le métabolisme des minéralocorticoïdes interfère avec celui des autres stéroïdes. Enfin, l'action d'un antagoniste des minéralocorticoïdes, le spironolactone, a été étudiée sur la chimère GCN4MR activée par l'aldostérone. Les auteurs montrent que la transactivation médiée par la chimère GCN4MR activée peut être inhibée par le spironolactone sans que le mécanisme d'action de cet antagoniste sur la chimère ait été approfondi, (Fankhauser *et al.*, 1994).

### **III C1d**      *Le DLH du récepteur à l'acide rétinoïque*

Plus récemment, le DLH du récepteur de l'acide rétinoïque a été utilisé pour une chimère FasRAR. Son expression stable dans des cellules HeLa place sous le contrôle de l'acide rétinoïque la mort par apoptose des clones (Takebayashi *et al.*, 1996).

### **III C1e**      *Le DLH du récepteur à l'ecdysone*

Pour le DLH du récepteur à l'ecdysone, Christopherson et ses collaborateurs montrent que seuls des ecdystéroïdes sont capables d'activer en cellules de mammifères le récepteur à l'ecdysone (Christopherson *et al.*, 1992). De plus, le DLH du récepteur à l'ecdysone semble être transférable à d'autres protéines : par échange de DLH, un récepteur nucléaire chimère, où le DLH du récepteur aux glucocorticoïdes est remplacé par celui du récepteur à l'ecdysone, est activable par la muristéronne. Il en est de même d'un récepteur complètement artificiel fusionnant le domaine de transactivation de la

protéine de levure VP16, le domaine de liaison à l'ADN de la protéine bactérienne LexA et le DLH du récepteur à l'ecdysone. Néanmoins, Mattioni et ses collaborateurs mentionnent le fait qu'il n'ont pu obtenir de fusion FosEcR fonctionnelle, fusionnant la protéine Fos et le DLH du récepteur à l'ecdysone (Mattioni *et al.*, 1994), alors que sont publiés des mutants conditionnels de Fos par fusion aux DLH des récepteurs aux glucocorticoïdes ou aux oestrogènes (Superti-Furga *et al.*, 1991). En fait, la spécificité d'activation du récepteur à l'ecdysone en cellules de mammifères a été utilisée pour un contrôle transcriptionnel de l'expression ectopique de gènes, en tirant partie aussi des éléments de réponse spécifique aux ecdystéroïdes (No *et al.*, 1996).

### **En conclusion,**

D'une manière générale, l'utilisation des DLH autres que celui des récepteurs aux oestrogènes reste marginale. Elle permet de mettre en évidence les propriétés communes des DLH des récepteurs nucléaires "à ligand" d'être autonomes et transférables à d'autres protéines. Les interactions moléculaires qui sous-tendent l'inactivation fonctionnelle en absence de ligand des protéines hétérologues fusionnées aux divers DLH n'ont été que peu étudiées. Les chimères fusionnant l'enzyme  $\beta$ -galactosidase et le DLH du récepteur aux glucocorticoïdes ou aux oestrogènes sont capables d'interagir avec la protéine Hsp90. Cette interaction, comme pour le récepteur complet correspondant, est dépendante du ligand (Scherrer *et al.*, 1993). Cependant, l'interaction du récepteur aux glucocorticoïdes avec la protéine Hsp90 semble indispensable à l'établissement du complexe hormone-récepteur (Bresnick *et al.*, 1989), ce n'est pas le cas pour les autres récepteurs stéroïdiens. D'autres fonctions de l'interaction avec la protéine Hsp90 restent donc à définir vis-à-vis des récepteurs stéroïdiens (discuté dans la revue de Smith & Toft, 1993) et vis à vis des chimères. Néanmoins, la capacité de tous les DLH, à transférer une inactivation fonctionnelle en absence d'hormone, suggère le caractère universel du mécanisme du contrôle hormonal médié par le domaine de liaison du ligand des récepteurs, au sein des récepteurs sauvages mais aussi des protéines chimères. Les travaux concernant l'utilisation des anti-oestrogènes pour la régulation des chimères "ER" étayent aussi cette thèse.

## **III C2** Les protéines fusionnées

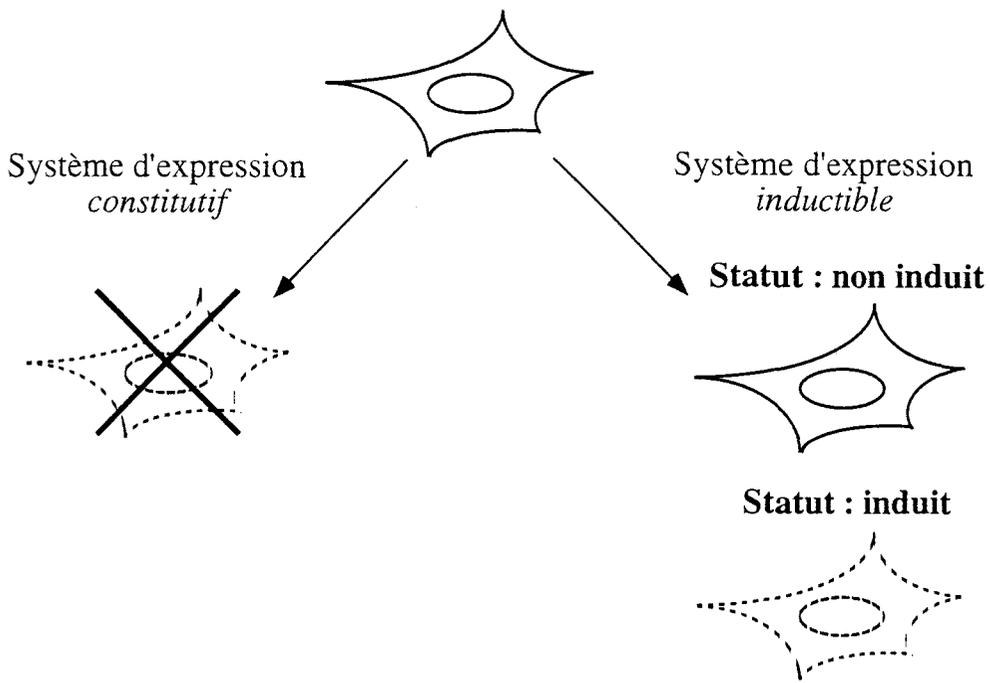
Dans ce paragraphe je voudrais mettre en avant la diversité des fonctions mises sous le contrôle d'un DLH. Cette stratégie est particulièrement bien documentée pour les facteurs de transcription : E1A, Myc, Myb, Fos, Jun, MyoD, Rel, C/EBP $\beta$ , Rev, ou Gata-1. Elle a aussi servi l'étude d'autres molécules impliquées dans les voies de transduction du signal comme les kinases Abl ou Raf, ou impliquée dans la réparation de l'ADN telle que l'enzyme MGMT. Par ailleurs, cette stratégie a permis d'affiner la technique d'inactivation génique en rendant conditionnelle l'activité des recombinaisons, Cre et FLP (Logie & Stewart, 1995; Metzger *et al.*, 1995b).

### **III C2a** Les possibilités techniques de l'outil chimère

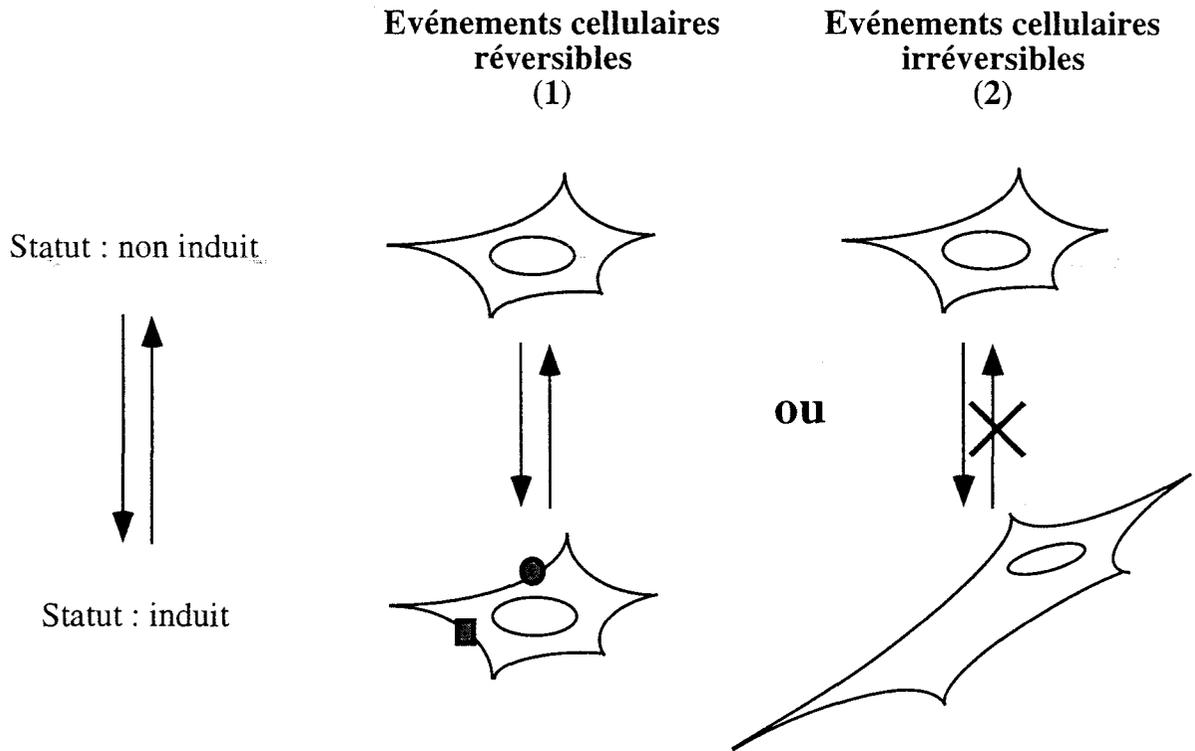
Vis-à-vis des propriétés régulées, l'utilisation d'un système conditionnel par régulation directe au niveau de la protéine permet plusieurs types d'apports : d'un point de vue phénotypique cette démarche permet l'accès à des fonctions que les systèmes d'expression constitutive contre-sélectionnent (arrêt de croissance, processus de mort cellulaire...) (fig. 11A). Ensuite, en relation avec le caractère réversible de l'induction (l'ajout/l'élimination d'hormone au milieu de culture qui conditionne l'activation/l'inhibition des fonctions sous contrôle hormonal), cette stratégie permet d'étudier le caractère réversible ou non d'un phénotype induit (arrêt de croissance ou différenciation ou encore transformation) (fig 11B). Enfin, au niveau moléculaire, le contrôle "direct" des propriétés protéiques permet d'établir un lien "direct" (concrètement : sans l'intervention d'une étape de néosynthèse protéique, bloquée par exemple par la cycloheximide) ou non entre la protéine étudiée et ses "cibles" (gène cible pour un facteur de transcription; substrat cellulaire pour une activité enzymatique) (fig. 12). Les différentes colonnes du tableau 1 résument selon ces différents aspects, les propriétés étudiées à l'aide des chimères.

Néanmoins, pour une protéine donnée, la régulation fournie par la fusion à un DLH n'est pas absolue. En effet, une partie seulement des fonctions peuvent être soumises au contrôle hormonal. En outre, la fusion à un DLH peut faire apparaître des fonctions spécifiques du mutant, non portées par la protéine sauvage.

A



B



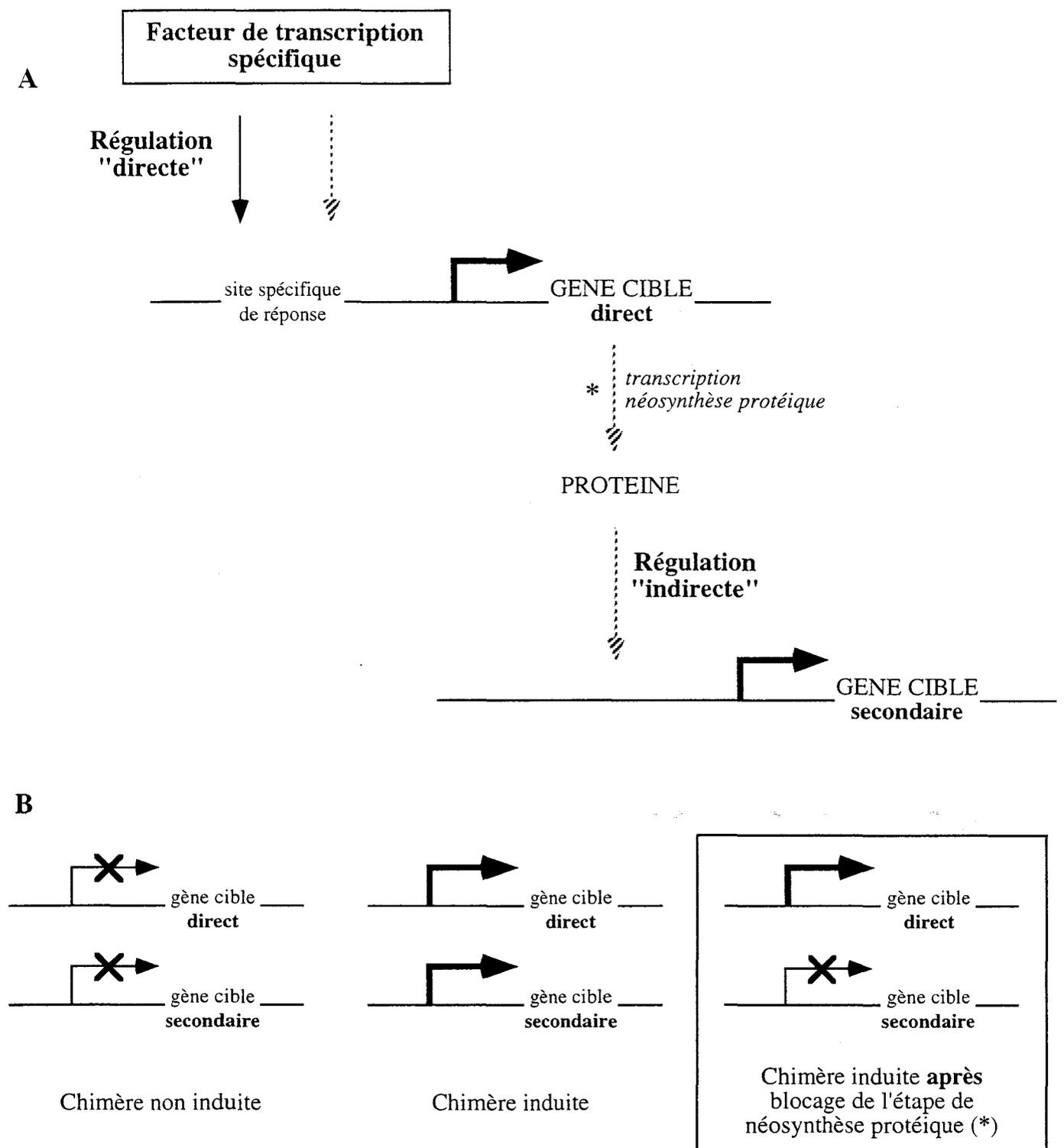
**Figure 11 :**

**Les apports d'un système inductible d'expression par rapport à un système d'expression constitutif.**

A. Accès, grâce à un système d'expression inductible, à des fonctions contre-sélectionnées par un système d'expression constitutif : ces fonctions ne seraient pas accessibles à l'observation expérimentale, en système d'expression constitutif.

B. Accès au caractère réversible ou non d'un phénotype étudié, comme par exemple l'expression de marqueurs cellulaires (1), ou l'engagement sur une voie de différenciation (2).

Ces propriétés des systèmes inductibles sont communes aux contrôles d'expression établis au niveau transcriptionnel ou au niveau post-traductionnel.



**Figure 12 :**

**Caractère "direct" des cibles moléculaires de la protéine étudiée : exemple des facteurs de transcription spécifiques.**

A. Schéma rappelant la définition du caractère direct (flèche pleine) ou secondaire (flèche en pointillé) des gènes régulés par un facteur de transcription spécifique.

B. Application de l'utilisation des chimères inductibles à la définition du caractère direct ou non des gènes régulés par l'étude de l'activation transcriptionnelle des gènes après une étape de blocage de la néosynthèse protéique.

Tableau 1 :

**Les mutants conditionnels construits par fusion au domaine de liaison à l'hormone d'un récepteur nucléaire**

Les différentes constructions sont décrites par le nom de la protéine sauvage correspondante, le nom du récepteur nucléaire concerné, la référence du travail publié.

Les propriétés régulées sont décrites succinctement.

Différents commentaires précisent, en italiques, les limites de l'outil chimère quand elles ont été mises en évidence (régulation partielle ou propriétés artéfactuelles), le traitement par un anti-oestrogène (4OHT ou ICI) et l'étude du caractère direct des fonctions régulées par la chimère concernée.

| Protéine fusionnée | Récepteur nucléaire concerné | Référence       | Propriétés régulées   |
|--------------------|------------------------------|-----------------|---|
|                    |                              |                 | <i>Commentaire</i>  |
| cAbl               | ER                           | Jackson 1993    | Propriétés transformantes de différentes versions activées ou non de la tyrosine-kinase Abl.  |
|                    |                              | Mattioni 1995   | <i>différence fonctionnelle avec la protéine non fusionnée.</i><br>Arrêt de croissance.<br><i>limite de l'inactivation fonctionnelle en absence d'hormone.</i>          |
| βGal               | GR                           | Scherrer 1993   | Interaction avec Hsp90.<br><i>activité enzymatique non régulée.</i>   |
| C/EBPβ (NF-M)      | ER                           | Umek 1991       | Propriétés transformantes.  |
|                    | ER                           | Muller 1995     | Différenciation hématopoïétique.<br>Mort cellulaire par apoptose.   |
| Cre                | ER <sup>TM</sup>             | Metzger 1995    | Invalidation génique inductible.  |
| E1A                | GR                           | Picard 1988     | Première chimère GR.<br>Application à la régulation de la transcription étudiée par transfection transitoire.<br><i>influence de la position du domaine régulateur.</i> |
|                    | ER                           | Spitkovsky 1994 | Régulation de la transcription étudiée par expression stable à l'aide d'un adénovirus exprimant E1A-ER.   |
| EBNA2              | ER                           | Kempkes 1995    | Maintenance de l'état transformé de cellules B infectées par un virus d'Epstein-Barr exprimant EBNA2-ER.  |
|                    |                              | Larcher 1995    | Régulation de la transcription de marqueurs membranaires B, CD21 entre autre.   |
|                    |                              | Kempkes 1996    | Rôle dans l'arrêt de croissance.  |

| Protéine fusionnée | Récepteur nucléaire concerné | Référence          | Propriétés régulées<br><i>Commentaire</i>   |
|--------------------|------------------------------|--------------------|---|
| Fas                | ER RAR                       | Takebayashi 1996   | Mort cellulaire par apoptose.   |
| FLP                | ER <sup>TM</sup>             | Logie 1995         | Invalidation génique inductible.  |
| Fos                | ER GR                        | Superti-Furga 1991 | Régulation de la transcription.<br><i>caractère direct.</i>   |
|                    | ER                           | Reichmann 1992     | Différenciation cellulaire : transition épithélium-mésenchyme.  |
|                    |                              | Bergers 1994       | Régulation de la transcription du gène <i>fit-1</i> .<br><i>caractère direct.</i>   |
|                    |                              | Hennig 1995        | Régulation de la transcription du gène codant la E-cadhérine.   |
|                    |                              | Jooss 1995         | Régulation de la transcription de gènes codant des protéines de micro-filaments tels que l'erzin et la tropomyosine.  |
|                    |                              | Preston 1996       | Mort cellulaire par apoptose.   |
| FosB               | ER                           | Nakabeppu 1993     | Propriétés transformantes.<br><i>différence fonctionnelle avec la protéine non fusionnée.</i>   |
| Gata-1             | ER                           | Briegel 1996       | Différenciation cellulaire.<br>Régulation de la transcription.  |
| GCN4               | MR                           | Fankhauser 1994    | Première chimère MR.  |
| Jun                | ER                           | Fialka 1996        | Différenciation cellulaire : transition épithélium-mésenchyme.  |
| JunD               |                              | Francis 1995       | Régulation de la transcription.   |
| vMyb               | ER                           | Burk 1991          | Différenciation hématopoïétique.<br><i>caractère réversible.</i>  |
|                    |                              | Engelke 1997       | Application à la régulation transcriptionnelle de <i>mim-1</i> .<br>Régulation de la transcription d'un nouveau gène cible.<br>Différenciation hématopoïétique de cellules monocytiques en cellules géantes multinuclées.<br><i>caractère réversible.</i> |

| Protéine fusionnée | Récepteur nucléaire concerné | Référence       | Propriétés régulées<br><i>Commentaire</i>  |
|--------------------|------------------------------|-----------------|--|
| cMybEn             | ER                           | Lyon 1997       | Où l'on construit un répresseur transcriptionnel par fusion au domaine répresseur de la transcription du facteur de transcription <i>engrailed</i> , que l'on rend conditionnel par fusion au DLH ER. Application à la régulation transcriptionnelle de <i>mim-1</i> . |
|                    | ERTM                         | Husain 1997     | Mort cellulaire par apoptose.  |
| cMyc               | ER                           | Eilers 1989     | Première chimère GR. Application à la transformation de fibroblastes de rat.<br><i>influence de la position du domaine régulateur.</i>   |
|                    |                              | Rosenwald 1993  | usage du 4OHT. Régulation de la transcription d'un nouveau gène cible : <i>eIF-4E</i> .  |
|                    |                              | Alexandrow 1995 | Rôle actif de Myc dans les voies de signalisation cellulaire induite par le TGFβ1.   |
|                    |                              | Grandori 1996   | Régulation de la transcription d'un nouveau gène cible codant une hélicase: <i>MrDB</i> .<br><i>caractère direct.</i>  |
| MyoD               | ER GR TR                     | Hollenberg 1993 | Régulation transcriptionnelle des gènes codant la myogénine (*) la créatine-kinase (°) ou encore l'actine cardiaque de type α (°).<br><i>caractère direct (*) ou non (°).</i>  |
|                    | ER GR                        | Kolm 1995       | Première chimère TR. Exploitation par microinjection de constructions plasmidiques des chimères ER et GR dans des oeufs et des embryons de Xénope.   |
| p53                | ER                           | Roemer 1993     | Contrôle de la prolifération cellulaire. Régulation transcriptionnelle du gène <i>mdm-2</i> .<br><i>différence fonctionnelle avec la protéine non fusionnée.</i>   |

| Protéine fusionnée | Récepteur nucléaire concerné | Référence     | Propriétés régulées<br><i>Commentaire</i>  |
|--------------------|------------------------------|---------------|--|
| p53                | ER <sup>TM</sup>             | Vater 1996    | Mort cellulaire par apoptose : étude après transfection stable de la chimère dans des fibroblastes murins pour lesquels le gène p53 est géniquement invalidé et qui sont transformés par la protéine de l'adénovirus E1A ou une version activée de l'oncogène <i>ras</i> . |
| Raf                | ER                           | Samuels 1993  | Propriétés transformantes<br><i>usage du 4OHT, usage de l'ICI.</i>   |
| BXB-Raf            | ER                           | Kerkhoff 1997 | Propriétés transformantes de cette version activée par délétion de la sérine, thréonine-kinase Raf.  |
| vRel               | ER                           | Boehmelt 1992 | Propriétés transformantes vis-à-vis de cellules de moëlle épinière de poulet et fibroblastes aviaires.   |
|                    |                              | Boehmelt 1995 | <i>usage du 4OHT, usage de l'ICI.</i><br>Caractérisation des cellules de moëlle épinière de poulet transformées<br>Étude du stade de différenciation dans lequel les cellules sont bloquées<br><i>usage du 4OHT, usage de l'ICI.</i>                                       |
| TLS/CHOP           | ER                           | Zinzner 1994  | Propriétés transformantes.   |

### **III C2b**      *Quelques exemples de régulation fonctionnelle partielle*

#### **- Influence de la position du domaine régulateur**

##### **- E1A-GR et régulation des propriétés d'activation de la transcription**

Dès le clonage de la première chimère "GR", Picard et ses collaborateurs observent un effet de la "distance intramoléculaire", entre le DLH et la protéine virale E1A fusionnée, sur l'efficacité de la régulation fonctionnelle. En insérant des séquences du récepteur aux glucocorticoïdes entre les séquences codant E1A et les séquences du DLH, les capacités d'activateur de la transcription de E1A sont moins efficacement inhibées en absence d'hormone par le DLH (Picard *et al.*, 1988).

##### **- GalER et régulation de la liaison à l'ADN**

Cet effet était déjà visualisé par Webster et ses collaborateurs, par l'étude des chimères GalER qui fusionnent le domaine de liaison à l'ADN du facteur de levure GAL4 (acides aminés 1-74 ou 1-147) au DLH du récepteur aux oestrogènes (acides aminés 282-595 ou 251-595). La chimère GalER(74, 282) a ses capacités de liaison à l'ADN sous contrôle hormonal, alors que GalER(147,251), qui comprend des acides aminés additionnels entre le domaine régulé et le domaine régulateur, lie de manière constitutive l'ADN (Webster *et al.*, 1988).

##### **- MycER et régulation des propriétés transformantes**

Pour la première chimère "ER" concernant une protéine de pleine longueur, les auteurs testent le pouvoir transformant de la chimère MycER exprimée de façon stable dans des fibroblastes de rat (Eilers *et al.*, 1989). Le pouvoir transformant du facteur de transcription Myc, étudié par test de clonage en agar, est placé sous le contrôle des oestrogènes. Cependant, la position du DLH influence le nombre de clones apparaissant en absence de traitement hormonal : 0/230 pour la fusion du DLH en position C-terminale de Myc (MycER), 14/170 pour la fusion en N-terminal (ER-Myc).

#### **- Influence du mode d'expression stable ou transitoire des protéines chimères**

Pour la protéine p53, il est possible d'obtenir un arrêt de prolifération cellulaire dépendant de l'hormone pour des clones cellulaires exprimant de manière stable la protéine p53ER; dans ce contexte, les auteurs observent la régulation transcriptionnelle du gène *mdm-2* est corrélée au traitement hormonal des cellules. Cependant, dans ces cellules l'activité de transcription dépendante de

p53 enregistrée *via* des séquences ectopiques n'est pas régulée par les oestrogènes (Roemer & Friedmann, 1993).

#### - Des propriétés non régulées

##### - AblER

Dans le cas de chimères qui utilisent les 630 premiers acides aminés de la tyrosine-kinase cAbl non activée (AblER) ou activée ( $\Delta$ XBER) Mattioni et ses collaborateurs montrent qu'en absence d'hormone, l'expression stable de chacune des chimères n'est pas neutre puisqu'elle entraîne l'arrêt de croissance des cellules qui l'expriment (Mattioni *et al.*, 1995).

##### - Le cas de différentes enzymes

Enfin, certaines fonctions semblent réfractaires au contrôle par fusion à un DLH : c'est le cas de la  $\beta$ -galactosidase et des fusions  $\beta$ GalGR (Picard *et al.*, 1988; Scherrer *et al.*, 1993) ou  $\beta$ GalER (Scherrer *et al.*, 1993). Ces chimères ont été étudiées pour l'identification de signaux de localisation nucléaire au sein du DLH du récepteur aux glucocorticoïdes (Picard *et al.*, 1988) ou pour l'étude de l'interaction avec la protéine Hsp90 médiée par le DLH des récepteurs stéroïdiens (Scherrer *et al.*, 1993). De plus, d'autres enzymes (galactokinase, dihydrofolate-réductase ou encore l'enzyme que code le gène de levure URA3), mentionnées dans la revue de Mattioni et de ses collaborateurs (1994), échappent au contrôle hormonal après fusion à un DLH (Mattioni *et al.*, 1994).

### III C2b *Quelques exemples de différences fonctionnelles entre la protéine sauvage et le mutant conditionnel activé*

L'autre limite concernant la régulation fonctionnelle par fusion à un DLH concerne la description de l'acquisition de propriétés spécifiques de la protéine chimère non décrites pour la protéine sauvage. Au sein du récepteur, le DLH est un domaine multifonctionnel comportant, outre le capacité de lier l'hormone, la fonction de transactivation du domaine AF2 et une interface de dimérisation, dont les fonctions sont dépendantes de la liaison de l'hormone. Dans certains cas de fusion chimérique avec un DLH ces deux aspects fonctionnels du DLH pourraient intervenir dans l'expression de certaines propriétés de la protéine chimère.

### **- Influence du domaine de transactivation AF2**

Ainsi, les protéines chimères correspondant aux deux isoformes naturelles que code le gène *fosB*, FosB-LER et FosB-SER, expriment toutes deux des propriétés "transformantes" sous contrôle hormonal : leur expression stable induit une transformation morphologique de cellules de la lignée fibroblastique de souris NIH3T3 (avec notamment la suppression du phénomène "d'inhibition de contact" 24h à 48h après l'addition de l'hormone). En test de clonage en agar, en utilisant la lignée fibroblastique de rat 208F, FosB-LER et Fos-SER présentent un pouvoir transformant comparable. Pourtant, les protéines naturelles FosB-L et FosB-S sont différentes quant à leurs capacités de transformation : FosB-S ne permet pas la formation de foyers en agar pour les cellules 208F, et vis-à-vis des cellules NIH3T3 FosB-S conduit à la transformation morphologique d'un nombre beaucoup moins élevé de clones que FosB-L. La fusion au DLH du récepteur aux oestrogènes gomme donc au moins certaines différences fonctionnelles existant entre les protéines FosB-S et FosB-L (Schuermann *et al.*, 1993).

### **- Influence de l'interface de dimérisation**

Un autre exemple est apporté par la chimère AblER qui utilise une version non activée de la protéine à activité tyrosine kinase, Abl. En fait, l'expression stable de cette chimère AblER dans des cellules de la lignée fibroblastique de souris NIH3T3 entraîne l'acquisition, par ces cellules, d'un phénotype transformé induit en présence d'oestrogènes. L'activation transformante par homodimérisation est décrite pour différentes activités tyrosine-kinase. Dans le cas de AblER, son activation transformante sous contrôle hormonal pourrait être liée à une dimérisation médiée par le DLH (Jackson *et al.*, 1993).

### **- Contrevenir à l'influence du domaine de transactivation AF2**

Si aucune parade vis-à-vis de la dimérisation éventuelle des chimères n'a été mise en place, l'activité transactivatrice du DLH du récepteur aux oestrogènes peut être inhibée par l'utilisation de ligands synthétiques du récepteur aux oestrogènes naturel : le tamoxifène (Tam) et son dérivé, le 4-

hydroxy-tamoxifène (4OHT). Ces composés sont des agonistes partiels du récepteur aux oestrogènes. Leur liaison au récepteur entraîne l'activation partielle du récepteur en activant la liaison du récepteur à l'ADN ainsi que la fonction de transactivation du domaine AF1. Cependant, le Tam et le 4OHT inhibent l'activité du domaine transactivateur contenu dans le DLH, AF2 (voir le paragraphe XXX). Par suite, le traitement au 4OHT (ou au Tam) des facteurs de transcription chimériques a valeur de contrôle établissant la part de l'activité de transactivation apportée par le facteur de transcription concerné, de celle apportée par le DLH.

Ainsi, dans le cas de la chimère FosB-SER, le traitement par le Tam des cellules NIH3T3 exprimant de manière stable la chimère n'entraîne pas la transformation induite par les oestrogènes. Ceci démontre la participation du domaine AF2 dans l'acquisition de propriétés transformantes de FosB-SER non décrites pour la protéine FosB (Schuermann *et al.*, 1993).

En revanche, le 4OHT (ou le Tam) est un agoniste des chimères ER-Myc ou MycER, p53ER, v-RelER ou encore RafER vis-à-vis des phénotypes observés (Boehmelt *et al.*, 1992; Eilers *et al.*, 1989; Roemer and Friedmann, 1993; Samuels *et al.*, 1993). Ceci démontre cette fois que les propriétés inductibles étudiées sont bien liées aux propriétés des protéines fusionnées plutôt qu'au DLH utilisé.

En conclusion, ces résultats illustrent expérimentalement les limites de l'utilisation des chimères. Ces limites (régulation fonctionnelle partielle voire acquisition de propriétés artificielles) sont néanmoins inhérentes à toute démarche d'étude par mutagenèse, dont les résultats sont toujours à replacer dans le contexte plus général des arguments obtenus indépendamment.

Ils introduisent aussi, vis-à-vis des chimères ER, l'utilisation d'autres ligands du récepteur aux oestrogènes et, notamment, l'utilisation d'antagonistes de l'activité du récepteur sauvage. A l'échelle des travaux publiés sur les chimères, ces composés restent relativement peu utilisés. Il m'a néanmoins semblé que leur utilisation était un atout supplémentaire à la construction de mutants inductibles de ce type.

### III C3 Les chimères ER et l'utilisation des anti-oestrogènes

#### Introduction aux anti-oestrogènes et rappel concernant les chimères GalER et GalGR

L'intérêt médical dans le développement de composés à activité anti-oestrogénique est directement à mettre en relation avec leur utilisation en traitement adjuvant dans certains cas de cancer du sein dits "hormonosensibles". (voir l'introduction de McDonnell *et al.*, 1995). D'un point de vue biochimique on peut distinguer deux types d'anti-oestrogènes selon que leur structure dérive du cholestérol (anti-oestrogènes "purs") ou non (comme le tamoxifène et ses dérivés). D'un point de vue biologique on peut distinguer les anti-oestrogènes qui sont des antagonistes purs de l'activité du récepteur aux oestrogènes, des antagonistes / agonistes partiels. (voir la discussion de Metzger *et al.*, 1988 et aussi l'introduction de Metzger *et al.*, 1995a). Parallèlement à la caractérisation du récepteur aux oestrogènes, la biologie moléculaire a fourni des outils pour étudier le mécanisme d'action des anti-oestrogènes.

L'étude par délétion du récepteur aux oestrogènes a permis la mise en évidence d'un domaine de transactivation (dit AF1) dans la région A/B du récepteur (Kumar *et al.*, 1987). En revanche, l'identification du domaine de transactivation AF2 au sein du domaine de liaison de l'hormone a utilisé le système de construction de chimères par fusion à un domaine de liaison à l'ADN hétérologue (Webster *et al.*, 1988) dépourvu de propriétés d'activation de la transcription. Ainsi, les chimères GalER(74, 282) et GalER(147, 251) se comportent chacune comme un transactivateur inductible par le  $17\beta$ -oestradiol (E2) (Green *et al.*, 1986; Tora *et al.*, 1989a). Ces propriétés inductibles de transactivation s'accompagnent du contrôle hormonal des propriétés de liaison à l'ADN pour GalER(74, 282), ou non pour GalER(147,251) (Webster *et al.*, 1988, voir aussi le précédent).

En parallèle des études menées sur le récepteur aux oestrogènes sauvage, les chimères GalER ont été un outil pour la caractérisation moléculaire du mode d'action des anti-oestrogènes.

## L'utilisation de l'ICI et du 4OHT

### - *Activité vis-à-vis des propriétés de transactivation*

Parmi les anti-stéroïdes alors disponibles, Webster et ses collaborateurs (Webster *et al.*, 1988) ainsi que Berry et ses collaborateurs (Berry *et al.*, 1990) ont utilisé deux anti-oestrogènes : l'ICI-164,384 (ICI) et le 4-hydroxy-tamoxifène (4OHT). En test de transactivation, utilisant des cellules de la lignée humaine HeLa et l'élément de réponse aux oestrogènes dérivé du promoteur de la vitellogénine (vitERE), les deux composés se comportent comme des antagonistes purs du récepteur aux oestrogènes : l'activation transcriptionnelle dépendante de E2 du promoteur rapporteur est supprimée en présence de l'un ou l'autre des deux anti-oestrogènes. Cependant, selon le contexte cellulaire de ces tests de transactivation, le 4OHT présente une activité agoniste alors que l'ICI se comporte toujours comme un antagoniste pur. Lors de transfections en cellules de poulet CEF, le 4OHT est un agoniste partiel du récepteur aux oestrogènes *via* le vitERE (Berry *et al.*, 1990).

Vis-à-vis des deux chimères GalER citées précédemment, les deux composés se comportent comme des antagonistes purs de leur activité de transactivation, quel que soit le contexte cellulaire, HeLa ou CEF (Berry *et al.*, 1990; Webster *et al.*, 1988). L'ensemble de ces résultats définit l'ICI et le 4OHT, au moins, comme des antagonistes vis-à-vis de l'activité du domaine AF2 au sein des chimères GalER.

Par extension, pour le récepteur aux oestrogènes, les résultats de Berry et ses collaborateurs ont amené l'hypothèse que l'ICI inhibe les capacités transactivatrices tant du domaine AF1 que du domaine AF2, alors que le 4OHT est un antagoniste/agoniste partiel, antagoniste vis-à-vis du domaine AF2 et agoniste vis-à-vis du domaine AF1. Ces propriétés différentes sont modulées par le contexte cellulaire et la nature des ERE et reflètent, selon cette hypothèse, l'importance relative des domaines AF1 et AF2, dans un contexte moléculaire défini (voir aussi Tzukerman *et al.*, 1994).

### - *Activité vis-à-vis de la liaison à l'ADN*

Si les capacités d'agoniste partiel du 4OHT *via* certains ERE impliquent que le 4OHT médie l'interaction du récepteur avec l'ADN, l'influence de l'ICI sur la liaison du récepteur à l'ADN restait à tester. Cette question a été abordée à travers l'utilisation de différentes constructions rapportrices permettant de tester *in vivo* les capacités de liaison à l'ADN du récepteur aux oestrogènes sauvage par le développement de test d'interférence vis-à-vis de la promotion de la transcription (promoter interference) d'abord en levure (McDonnell *et al.*, 1991) puis en cellules de mammifère (Metzger *et al.*, 1995a). Les séquences contenues dans le plasmide rapporteur contiennent un ERE en aval de séquences capables de promouvoir la transcription de manière constitutive; ainsi la fixation éventuelle du récepteur sous une forme inactive du point de vue transcriptionnel entre en compétition avec la transcription promue de manière constitutive. En fait, en présence d'ICI le récepteur aux oestrogènes se fixe aux niveaux des ERE et le caractère antagoniste pur de l'activité du récepteur n'est donc pas médié par l'inhibition de la capacité de liaison à l'ADN du récepteur (Metzger *et al.*, 1995a. Voir aussi ce travail pour le caractère exhaustif de l'étude de la liaison à l'ADN *in vitro* présentée).

Les capacités de liaison à l'ADN *in vivo* de la construction chimérique GalER(74, 282) ont été étudiées, en présence des anti-oestrogènes, par test de compétition de la transactivation médiée par le facteur sauvage GAL4. Ainsi, l'addition de chacun des anti-oestrogènes entraîne la fixation de GalER(74, 282) au niveau des sites Gal4 sans pour autant qu'il y ait activation de la transcription.

Ces résultats montrent que l'ICI et le 4OHT restent des ligands du DLH du récepteur aux oestrogènes dans le cadre des chimères GalER. De manière comparable au traitement du récepteur aux oestrogènes, le traitement des chimères par ces anti-oestrogènes entraîne la fixation à l'ADN (pour GalER(74,282)) et l'inactivation des fonctions transactivatrices du domaine AF2. Cette dernière propriété a été utilisée, pour le 4OHT, vis-à-vis des chimères qui concernent des facteurs de transcription (voir précédemment). L'ICI n'a été que rarement utilisé : vis-à-vis de v-RelER ce composé se comporte comme un antagoniste pur des propriétés de la chimère (Boehmelt *et al.*, 1992).

## **La classification proposée par Mc Donnell**

Si la classification dichotomique antagonistes purs, antagonistes/agonistes partiels se justifiait phénotypiquement (voir la discussion de Berry *et al.*, 1990), Mc Donnell et ses collaborateurs proposent une classification plus subtile basée sur l'utilisation de l'ERE contenu dans le promoteur du gène pC3 (McDonnell *et al.*, 1995). Les auteurs distinguent trois classes d'anti-oestrogène qui reflèteraient la capacité de chaque type d'anti-oestrogène à stabiliser le récepteur dans une conformation donnée, qu'il adopterait naturellement au cours de sa transformation sous l'action de l'hormone.

La comparaison du comportement en transfection transitoire du récepteur sauvage (ER-wt), d'un récepteur mutant porteur des mutations ponctuelles inactivant le domaine AF2 (mutant ER-TAF1) (Danielian *et al.*, 1992) et d'un mutant nul (mutant ER-nul) (muté dans le domaine AF2 et délété du domaine AF1) permet de définir l'ICI, le 4OHT et le kéoxifène (un dérivé du tamoxifène) comme les paradigmes de ces trois classes : *via* l'ERE dérivé du pC3, l'ICI est un antagoniste de ER-wt ou de ER-TAF1, le 4OHT est un agoniste de ER-wt et de ER-TAF1 et le kéoxifène représente une classe intermédiaire puisqu'il est un antagoniste de ER-wt mais un agoniste de ER-TAF1 (ER-nul est le contrôle d'absence d'activation de transcription spécifique du récepteur). Il est à noter, de plus, qu'il n'existe pas d'anti-oestrogène capable d'inhiber la capacité de liaison à l'ADN du récepteur aux oestrogènes (McDonnell *et al.*, 1995; Metzger *et al.*, 1995a).

## **Des cofacteurs spécifiques des complexes anti-hormone/récepteur**

Le travail de Jackson et de ses collaborateurs va dans le sens de l'hypothèse de Mc Donnell (). Les auteurs ont réalisé un travail de criblage par le système de double-hybride en levure afin d'identifier des cofacteurs spécifiques du complexe RU486-récepteur de la progestérone en utilisant comme appât la chimère LexA:H-HBD, fusionnant au domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription bactérien LEXA les acides aminés C-terminaux 638 à 933 du récepteur humain de la progestérone : ce segment du récepteur à la progestérone recouvre les régions D (dont on considère qu'elle est une zone charnière -"hinge"- des récepteurs) et E (contenant le domaine de liaison de l'hormone) du récepteur (Jackson *et al.*, 1997).

Deux cofacteurs ont été identifiés, la protéine L7, déjà identifiée en tant que protéine de liaison à l'ARN, et le co-répresseur des récepteurs à l'hormone thyroïdienne et des récepteurs à l'acide rétinoïque, N-CoR. SMRT, un co-répresseur des mêmes récepteurs a aussi été testé fonctionnellement. Ces trois protéines modulent la transactivation médiée par le récepteur de la progestérone endogène en présence de RU486 *via* un élément de réponse à la progestérone pour lequel RU486 est un agoniste partiel; elles sont sans effet en absence ou en présence d'hormone ou encore en présence d'un antagoniste pur de la progestérone. Ces interactions, sans que leur caractère direct soit étudié dans ce travail, sont donc spécifiques du complexe récepteur-agoniste partiel RU486 (). L7 interagit avec le récepteur au niveau de la région D, N-CoR et SMRT interagissent avec le récepteur au niveau de la région E. L7 augmente la transactivation médiée par le complexe récepteur-RU486, N-CoR et SMRT la diminue. De façon intéressante, les protéines L7, N-CoR et SMRT expriment le même type de propriété vis-à-vis des différents complexes hormone (E2)- agoniste partiel (tamoxifène)- antagoniste pur (ICI)- récepteur aux oestrogènes (sans que la sous-localisation D/E n'ait été effectuée pour ces interactions) : L7, N-CoR et SMRT interagissent spécifiquement et uniquement avec le complexe agoniste partiel (tamoxifène)-récepteur aux oestrogènes pour augmenter (L7) ou diminuer (N-CoR, SMRT) la transactivation médiée par ce complexe.

Ainsi, pour la première fois, ont été identifiées des protéines qui pourraient partiellement expliquer le comportement de certains anti-stéroïdes antagonistes/agonistes partiels : la balance cellulaire L7/N-CoR, SMRT pourrait participer à la définition du caractère agoniste ( $L7 > N-CoR, SMRT$ ) ou antagoniste ( $L7 < N-CoR, SMRT$ ) d'un anti-oestrogène dont on a vu que, pour un même élément de réponse, il pouvait être sensible au contexte cellulaire (Berry *et al.*, 1990; Tzukerman *et al.*, 1994). La mise en évidence des interactions spécifiques (Récepteur-Ligand)-Cofacteur révèle l'existence de complexes stabilisés, ici, par des anti-stéroïdes issus de la recherche pharmacologique. Ceci, sans pour autant d'ailleurs que ne soit établie de relation d'ordre dans l'établissement des complexes multiprotéiques auxquels le récepteur participe : les cofacteurs mis en évidence pourraient jouer un rôle actif dans la stabilisation de ces complexes ou bien ils pourraient n'intervenir qu'une fois le complexe récepteur-ligand établi.

## **En conclusion,**

Ainsi, l'ensemble de ces travaux sur l'action des anti-stéroïdes met en lumière quelques aspects moléculaires de la dynamique des équilibres mis en jeu autour du récepteur aux oestrogènes ou à la progestérone pour intégrer au niveau cellulaire la réponse hormonale. J'ai choisi de vous détailler la mise en évidence de cofacteurs de complexes anti-stéroïde/récepteur stéroïdien. En fait, plusieurs travaux ont abouti à la mise en évidence de cofacteurs spécifiques de récepteurs nucléaires complexés à leur ligand (co-activateurs de l'activité conditionnelle des récepteurs stéroïdiens) ou spécifiques de récepteurs nucléaires non complexés à leur ligand (co-répresseurs des récepteurs de l'hormone thyroïdienne ou de l'acide rétinoïque). Le domaine de liaison de l'hormone semble être le maître d'oeuvre de l'architecture fonctionnelle du récepteur, aux ordres de divers ligands et aux limites définies par le contexte cellulaire. Toujours est-il, que ces propriétés médiées ici par les régions D ou E sont transférables : en levure, la chimère LexA-H-HBD interagit avec les constructions issues de la banque Gal(AD)L7 ou Gal(AD)N-CoR avec les mêmes exigences vis-à-vis du ligand (Gal (AD) pour domaine activateur de GAL4) (Jackson *et al.*, 1997).

C'est donc à la lumière de ces résultats qu'il faut considérer l'action des anti-oestrogènes sur les chimères utilisant le domaine de liaison de l'hormone du récepteur aux oestrogènes (et par extension l'action d'anti-hormones sur celles utilisant le domaine de liaison d'autres récepteurs nucléaires dont le ligand est connu).

# BUT DU TRAVAIL ET RESULTATS

## I LES MEMBRES DU GROUPE PEA3 DE LA FAMILLE Ets

Le premier chapitre de l'introduction présente brièvement les différents gènes qui codent les protéines de la famille Ets. Suite aux travaux caractérisant l'activité de facteur de transcription de certains d'entre eux, tous ont été soumis au test de régulation de la transcription par l'intermédiaire de sites ets artificiels ou naturels. L'autre grande constante des études menées sur les facteurs de transcription, et ceux de la famille Ets en particulier, est l'étude de la régulation de leur activité par phosphorylation, et, par suite, l'étude de leur intégration aux voies de signalisation cellulaire vis-à-vis desquelles les kinases impliquées ont un rôle à jouer. Enfin, la définition de séquences consensus d'ADN spécifiques de liaison des domaines Ets a ouvert le champ à de nombreuses études cherchant à caractériser des sites ets fonctionnels importants dans la régulation transcriptionnelle de promoteurs isolés.

A l'échelle du groupe PEA3, ce type d'approche a permis de définir les données moléculaires de base concernant les protéines Erm, Er81 et Pea3 (Ces données font l'objet d'une revue récente donnée en annexe de ce mémoire, de Launoit *et al.*, 1997).

### IA Le groupe PEA3 : sa constitution

Dès son clonage à l'aide d'une sonde oligonucléotidique contenant le site PEA3 de l'enhancer  $\pi$  du virus du polyome, ou le site E1A de l'enhancer de l'adénovirus Ad5, la protéine Pea3/E1AF est identifiée comme un facteur de transcription spécifique de la famille Ets. Pea3/E1AF active la transcription par l'intermédiaire de l'enhancer  $\pi$  du virus du polyome ou plus faiblement par l'intermédiaire du site E1A, tous deux polymérisés en amont d'un promoteur minimal contrôlant l'expression d'un gène rapporteur (Higashino *et al.*, 1993; Xin *et al.*, 1992). Les gènes *erm* et *er81* ont eux été isolés par l'utilisation de la technique de PCR. *er81*, dans une étude cherchant à identifier

d'autres protéines Ets capables d'interagir, comme GABP $\alpha$ , avec GABP $\beta$  (Brown and McKnight, 1992). *erm*, dans notre laboratoire, alors que le but initial de ce travail était le clonage de *pea3* chez l'humain (Monté *et al.*, 1994). Les différents gènes sont clonés chez la souris et l'homme, *erm* et *er81* chez le poulet (résultats non publiés de notre équipe), *x-er81* chez le xénope (communication personnelle de H. Steinbeisser) et *z-pea3* chez le poisson zèbre (communication personnelle de A Sharrocks). Ces protéines partagent au niveau du domaine Ets un minimum de 95% d'identité de séquence.

## **IB Les données de caractérisation moléculaire**

*In vitro*, le domaine Ets de Er81 (et plus récemment celui de z-Pea3 et h-Erm) a été utilisé pour sélectionner la séquence d'ADN optimale de fixation. Il s'avère qu'elle est très proche de celle sélectionnée à l'aide des domaines Ets des protéines GABP $\alpha$ , ou Er71 ou encore Ets-1 (voir fig.3). Cependant, GABP $\alpha$  reste la seule protéine Ets capable d'interagir avec GABP $\beta$  (Brown and McKnight, 1992). D'autres partenaires protéiques semblent pouvoir coopérer avec les protéines du groupe PEA3 pour réguler la transcription au niveau de sites de réponse composites. Ainsi, Erm coopère avec c-Jun pour la régulation d'un site artificiel juxtaposant un site ets et un site de réponse à l'AMP cyclique (Nakae *et al.*, 1995). Le récepteur des androgènes et Erm sont capables d'interagir *in vitro*. Cette interaction pourrait intervenir dans la répression de la transcription du gène codant la collagénase humaine de type I par le récepteur aux androgènes (Schneikert *et al.*, 1996).

La caractérisation moléculaire fonctionnelle de ces protéines a été réalisée pour les protéines Erm et Er81. Pour la protéine Erm, deux régions semblent intervenir dans la régulation de ses capacités de fixation à l'ADN : la région C-terminale en aval du domaine Ets et une région centrale dont la séquence n'est pas conservée avec les autres protéines du groupe PEA3 (Laget *et al.*, 1996). Par utilisation de délétants dans le contexte des protéines naturelles ou de chimères Gal4, les tests de transactivation ont permis de mettre en évidence deux domaines responsables de l'activation de la transcription : un domaine de type acide situé dans la région N-terminale des protéines et un domaine situé dans la région C-terminale déjà cité (Defossez *et al.*, 1998; Janknecht, 1996; Laget *et al.*, 1996).

Ces deux domaines sont des domaines fonctionnels conservés et présentent plus de 60% d'identité de séquence entre les diverses protéines du groupe PEA3. L'activité de facteur de transcription des trois protéines semble être modulée par leur phosphorylation par différentes kinases telles les MAP-kinases qui relaient notamment l'activation de la protéine Ras (Janknecht, 1996 pour Er81, Janknecht *et al.*, 1996 pour Erm et O'Hagan *et al.*, 1996 pour Pea3).

## IC Quelques données fonctionnelles

Peu d'éléments sont actuellement connus même si un rôle vient d'être proposé pour Pea3 dans la différenciation musculaire (Taylor *et al.*, 1997). Chez l'adulte, diverses études réalisées à l'aide de la technique de Northern blot indiquent que *erm* est un gène exprimé plutôt de façon ubiquiste, que l'expression de *er81* semble restreinte au coeur, aux poumons et au cerveau., et enfin que *pea3* est très faiblement exprimé dans les tissus adultes.

Cependant, le patron d'expression transcriptionnelle des trois gènes, établi à l'aide de la technique d'hybridation *in situ*, au cours de l'embryogenèse de souris illustre leur importance biologique potentielle. Au cours de l'ontogenèse murine, leurs sites d'expression nombreux concernent les tissus dérivés des trois feuilletts embryonnaires, ectodermiques, mésodermiques et endodermiques, et apparaissent tôt dans l'organogenèse. Si divers organes en développement sont le site d'une co-expression des trois membres, l'observation plus fine semble indiquer une spécificité d'expression dans la combinaison des expressions des trois gènes, et/ou vis-à-vis des compartiments cellulaires concernés (voir Chotteau-Lelievre *et al.*, 1997 et de Launoit *et al.*, 1997, donnés en annexe).

Par ailleurs, la caractérisation des translocations t(7;22) et t(17;22) associées à de rares cas de tumeurs d'Ewing semblent indiquer que *er81* et *pea3* sont des oncogènes activés par la fusion de leur domaine Ets au domaine de type CTDpolIII de la protéine Ews (Jeon *et al.*, 1995; Kaneko *et al.*, 1996; Urano *et al.*, 1996). Cependant, peu d'expériences ont utilisé les chimères Ews-Pea3 ou Ews-Er81. L'expression de la protéine Ews-Er81 en cellules NIH3T3 indique qu'à la différence des protéines Ews-Fli-1 ou Ews-Erg, la protéine Ews-Er81 ne serait pas transformante (cité par Braun *et al.*, 1995 et voir précédemment). D'autres données semblent néanmoins associer les membres du groupe PEA3 et

la transformation cancéreuse. En effet, la lignée MCF-7 est une lignée de cellules mammaires transformées capables d'induire la formation de tumeurs suite à leur injection sous-cutanée en souris nue. Notre équipe a montré que cette lignée n'exprime pas les membres du groupe PEA3 (Baert *et al.*, 1997). L'expression stable de Pea3 dans ces cellules entraîne l'apparition de métastases de manière secondaire à la formation de tumeur en souris nue (Kaya *et al.*, 1996). L'étude d'un autre modèle animal de tumorigenèse mammaire corrèle le développement de tumeurs mammaires induites par l'expression de l'oncogène *neu* à la sur-expression du gène *pea3* (Trimble *et al.*, 1993).

## II LE SUJET DE CE MEMOIRE EN SITUATION

Le travail que j'ai réalisé s'inscrit dans le cadre de l'étude des protéines du groupe PEA3 à laquelle se consacre, en partie, l'équipe au sein de laquelle j'ai effectué ma thèse, depuis l'isolement de *erm* (Monté *et al.*, 1994). Plusieurs questions, d'ailleurs récurrentes pour chaque protéine de la famille Ets, structurent les approches mises en place :

- quelles sont les relations intra-moléculaires et inter-moléculaires qui modulent leur activité de facteur de transcription? Deux travaux de thèse ont été réalisés dans notre équipe sur l'identification des domaines transactivateurs et régulateurs de la fixation à l'ADN en prenant Erm comme spécimen moléculaire d'étude (Defossez *et al.*, 1998; Laget *et al.*, 1996). Deux types de suites sont donnés à leurs travaux : d'une part, l'étude de la régulation par phosphorylation de la transactivation médiée par Erm et son intégration à différentes voies de signalisation (Janknecht *et al.*, 1996) et d'autre part, la recherche de partenaires protéiques de Erm.

- quelles sont les fonctions biologiques auxquelles les protéines du groupe PEA3 participent? Deux approches sont développées en système animal : d'une part, l'établissement de lignées de souris pour lesquelles le gène *er81* aura été invalidé et d'autre part, grâce à la technique de transgenèse ciblée, l'étude de l'incidence de l'expression de Er81 ou Pea3 au niveau de la glande mammaire.

- Quels sont les gènes cibles de ces facteurs de transcription? C'est cette question qui définit plus précisément l'objet de mon travail de thèse. En effet, j'ai participé, dans le cadre d'une

collaboration avec l'équipe canadienne de Marie Audette, à l'étude du caractère fonctionnel de sites ets présents dans le promoteur du gène *ICAM-1*, au niveau d'une région importante pour l'expression de ce gène. J'ai, par ailleurs, développé la construction d'outils permettant le contrôle des fonctions des protéines Erm et Er81 au niveau post-traductionnel. L'utilisation de ces outils sera double : la recherche de gènes cibles de ces protéines et l'étude du caractère direct de leur régulation, ainsi que, en parallèle, une étude fonctionnelle de ces protéines en système cellulaire.

### **III RESULTATS**

#### **IIIA Régulation transcriptionnelle du gène ICAM-1 par les facteurs de transcription de la famille Ets**

La protéine ICAM-1 (pour intercellular adhesion molecule 1) est une protéine membranaire d'adhérence cellulaire de la superfamille des immunoglobulines. Elle médie des interactions entre cellules par l'intermédiaire de sa liaison à un autre type de molécule d'adhérence, les intégrines du système immunitaire, de type  $\alpha\beta_2$ . L'expression des intégrines de type  $\alpha\beta_2$ ,  $\alpha_L\beta_2$ ,  $\alpha_M\beta_2$ , et  $\alpha_X\beta_2$  est restreinte à la surface des leucocytes. Leur interaction avec ICAM-1 intervient lors d'étapes clefs des réponses immunitaire et inflammatoire, comme en témoignent les altérations génétiques héréditaires humaines au niveau de la sous-unité  $\beta_2$ , associées au syndrome de type I de déficience d'adhérence des leucocytes (voir Springer, 1994 pour une revue).

De nombreux événements semblent pouvoir moduler les paramètres de l'interaction entre ces deux types de molécules d'adhérence. Divers signaux influencent l'équilibre conformationnel des intégrines entre un état activé "adhésif" et un état non activé de basse affinité pour le partenaire concerné (pour une revue concernant les observations ayant amené cette hypothèse, voir Diamond & Springer, 1994). Ce type de régulation allostérique pourrait mettre en oeuvre des interactions avec des protéines du cytosquelette (Peter & O'Toole, 1995) ou des protéines adaptatrices telles que la Cytohésine-1, qui module les capacités d'adhérence de l'intégrine  $\alpha_L\beta_2$  (ou LFA-1) vis-à-vis de ICAM-1 (Kolanus *et al.*, 1996).

Quant à la protéine ICAM-1, son expression à la surface des cellules endothéliales activées au cours de la réponse inflammatoire, conditionne le recrutement des lymphocytes circulants sur les lieux de l'infection ou de la blessure. L'expression de ICAM-1 à la surface des cellules présentatrices de l'antigène, et l'interaction ICAM-1/LFA-1 sont indispensables à l'activation lymphocytaire T lors de l'étape de présentation de l'antigène au cours de la réponse immunitaire (Springer, 1994).

L'expression de la protéine ICAM-1 semble être essentiellement régulée au niveau transcriptionnel (voir l'introduction de Ledebur & Parks, 1995), et de nombreux travaux se sont donc attachés à identifier les séquences d'ADN importantes pour la régulation transcriptionnelle du gène *ICAM-1* (voir Stratowa & Audette, 1995, pour une revue). C'est dans ce cadre particulier que s'inscrit la caractérisation de site de réponse de type ets au sein du promoteur du gène *ICAM-1*, à laquelle j'ai participé. Cette étude était motivée d'une part, par l'absence de données concernant la régulation de ce gène par des facteurs de transcription de la famille Ets, et d'autre part, par la description de l'expression de la protéine ICAM-1 en tant que marqueur de cellules cancéreuses au stade métastatique (Johnson *et al.*, 1989; Natali *et al.*, 1990; Natali *et al.*, 1997).

Grâce à la technique de co-transfection transitoire dans des cellules de rein de lapin RK13 et de choriocarcinome humain JEG-3, nous avons montré que lorsque les protéines Ets-1, Ets-2, PEA3 et ERM étaient exprimées en présence d'un plasmide rapporteur de type luciférase sous le contrôle de séquences (1.3 kb) du promoteur du gène *ICAM-1*, l'activité transcriptionnelle était significativement augmentée par rapport à celle enregistrée en absence de sur-expression des protéines Ets. En revanche, dans les mêmes conditions, le facteur Spi-1/Pu-1 n'est pas capable de réguler ce promoteur. Une série de mutants de délétion nous a permis d'identifier une région, comprise entre les nucléotides -176 et -44 en amont du site d'initiation de la transcription, essentielle vis-à-vis de cette activation. Grâce aux techniques d'empreintes à la DNase et de retard sur gel, nous avons pu identifier deux sites ets reconnus par ERM en position -158 et -138. La transfection dans les cellules RK13 d'un plasmide rapporteur comprenant les nucléotides -176 à -44 du promoteur de gène *ICAM-1* sauvage ou muté au

niveau des sites ets en position -158 et/ou -138 a montré que le site -158 était, parmi ces deux sites et dans ce contexte cellulaire, le site ets majeur de la régulation observée.

La caractérisation de sites ets importants dans la régulation de promoteurs isolés restreint rarement la régulation observée à un membre particulier de la famille Ets. En effet, l'étude de la régulation transcriptionnelle spécifique utilise des techniques de sur-expression largement suspectées de ne refléter qu'une approximation grossière des conditions physiologiques. En particulier, elles ne permettent pas d'apprécier l'importance du paramètre quantitatif qui, *in vivo*, est éventuellement limitant dans la définition de la spécificité moléculaire de chaque protéine Ets. Néanmoins, nos résultats présentent les premiers arguments d'une implication des membres de la famille Ets dans la régulation transcriptionnelle du gène *ICAM-1*.

Ces résultats font l'objet d'une publication sous presse dans la revue « Oncogene ».

### **III B Construction d'un facteur de transcription à activité conditionnelle du groupe PEA3 de la famille Ets**

Les études menées sur les fragments de promoteurs isolés sont une nécessité imposée par les limites techniques d'étude de la régulation transcriptionnelle spécifique en cellules. Elles fournissent des éléments de réponse à deux types de questions concernant la régulation transcriptionnelle spécifique des gènes :

- compte tenu du gène régulé, quelles sont les séquences en *cis* qui conditionnent le contrôle transcriptionnel d'un gène?
- compte tenu du facteur de transcription étudié, comment s'effectue la régulation en *trans*?

Dans ce cadre particulier, un facteur de transcription à activité conditionnelle est un outil de choix pour permettre l'identification de gènes cibles au sein du génome considéré dans sa totalité, dans un contexte cellulaire donné.

C'est pourquoi, nous avons cherché à construire une version des gènes *erm* et *er81* permettant l'expression de facteurs de transcription à activité conditionnelle. Dans ce mémoire, seuls les résultats concernant la construction d'un mutant à activité conditionnelle de Erm sont présentés.

Parmi les techniques permettant le contrôle conditionné de l'expression d'une protéine, nous avons retenu une approche qui établit un contrôle au niveau post-traductionnel par opposition à un contrôle exercé au niveau transcriptionnel. En effet, ainsi que souhaite l'illustrer la deuxième partie introductive de ce mémoire, seul ce type de démarche permet d'établir un lien direct entre la protéine régulée et les fonctions cellulaires contrôlées.

Les récepteurs nucléaires à ligand sont des protéines naturelles dont l'activité de facteur de transcription est modulée en présence du ligand approprié. Le domaine de liaison de l'hormone (DLH) est le domaine qui médie cette régulation. L'efficacité de la régulation exercée par le DLH du récepteur aux oestrogènes, en fusion traductionnelle avec d'autres protéines, est démontrée par de nombreux exemples d'application : la protéine résultante est inactive en absence d'hormone et elle est rapidement activée suite au traitement hormonal.

Ainsi, nous avons réalisé des constructions qui permettent l'expression de protéines chimères ErmER qui présentent le DLH du récepteur aux oestrogènes fusionné en position C-terminale de la protéine Erm. Le caractère conditionnel de l'activité de facteur de transcription de ErmER a été établi au moyen de tests de transactivation par transfection transitoire en cellules HeLa : les propriétés transactivatrices de la chimère sont régulées de manière dose-dépendante par le  $17\beta$ -oestradiol. De plus, nous montrons que le composé EM-139, antagoniste pur du récepteur aux oestrogènes, est un composé antagoniste de la chimère ErmER. Son utilisation pourrait permettre d'optimiser le statut inactivé de la chimère, dans des conditions de culture où l'absence d'activité oestrogénique est difficile à obtenir.

La caractérisation des constructions plasmidiques permettant l'expression de la chimère ErmER fait l'objet d'une publication dans la revue « Biochem. Biophys. Res. Com. ».

## **III C**      **Articles**

**III C1**      **Article 1 : La transcription du gène codant la protéine ICAM-1 est régulée par les facteurs de transcription Ets.**

**III C2**      **Article 2 : Un mutant conditionnel du facteur de transcription Ets, Erm, par fusion au domaine de liaison du ligand du récepteur aux oestrogènes.**

ONCOGENE, sous presse

**THE TRANSCRIPTION OF THE INTERCELLULAR  
ADHESION MOLECULE-1 IS REGULATED BY ETS  
TRANSCRIPTION FACTORS**

**Yvan de LAUNOIT<sup>(1,\*)</sup>, Marie AUDETTE<sup>(2,\*)</sup>,  
Hélène PELCZAR<sup>(1)</sup>, Serge PLAZA<sup>(3)</sup> and Jean-Luc BAERT<sup>(1)</sup>**

1. UMR 319 CNRS - Institut Pasteur de Lille, Institut de Biologie, 1 rue Calmette, BP 447, 59021 Lille, Cedex - France.
2. Laboratory of Molecular Endocrinology, CHUL Research Center, 2705 Laurier Boulevard, G1V 4G2 Ste Foy, PQ - Canada.
3. EP 560 CNRS - Institut Pasteur de Lille, Institut de Biologie, 1 rue Calmette, BP 447, 59021 Lille, Cedex - France.

\* : Should be both considered as first author.

**Running title** : Ets proteins activate ICAM-1 transcription.

**Key words** : ICAM-1, Ets, ERM, transcription factor

Correspondence should be addressed to : Yvan de Launoit  
UMR 319 CNRS - Institut Pasteur de Lille,  
Institut de Biologie, 1 rue Calmette,  
BP 447, 59021 Lille, Cedex - France.  
phone: (011) 33 3 20 87 78 78  
fax : (011) 33 3 20 87 79 08  
email : delaunoi@infobiogen.fr

## ABSTRACT

The Ets family of transcription factors comprises several members which are involved to regulate gene transcription. Although several consensus binding sites for Ets proteins can be found in a wide series of promoter, only a limited number of them are indeed activated by these transcription factors. The human intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) plays a crucial role in immune responses by enabling the binding of effector cells to various target cell types. ICAM-1 is constitutively expressed at different levels in the absence of stimuli in different cell types, and its expression is upregulated by several proinflammatory cytokines. We have here examined the transcriptional regulation of human ICAM-1 expression by Ets proteins, and more particularly by ERM, a member of this family of transcription factors. Transient transfection assays revealed that Ets-2 and ERM significantly activate the transcription of the ICAM-1 promoter, whereas the less-related Ets family member, Spi-1/Pu.1, failed to do so. Transfection of a series of ICAM-1 promoter deletion mutants together with ERM expression plasmids have shown that an Ets responsive element is located within the first 176 bp upstream from the translational start site. Electrophoretic mobility shift assays and DNase I footprinting analysis have enabled us to identify two Ets binding sites at positions -158 and -138 from the ATG, respectively. Site directed mutagenesis of these elements has shown that the distal site is the major element required for the ERM-mediated activation of the ICAM-1 promoter. We can thus conclude that expression of ICAM-1 can be regulated by Ets transcription factors.

## INTRODUCTION

The Ets family of transcription factors is an ubiquitously expressed group of proteins involved to regulate gene transcription in normal and cancerous tissues as well as during embryonic development. The hallmark of these transcription factors is a DNA-binding domain - the ETS domain - of  $\approx 85$  amino acids (Karim *et al.*, 1990), which recognizes the core sequence GGAA/T, present in the regulatory region of a wide array of responsive genes, including membrane receptors, growth factors, transcription factors, and extracellular metalloproteinases (Wasylyk *et al.*, 1993, Janknecht & Nordheim, 1993, Crépieux *et al.*, 1994). The Ets family comprises several members classified into different groups with respect to their sequence homology within the ETS domain. The PEA3 group (for review, see de Launoit *et al.*, 1997) is composed of three members: PEA3 (Xin *et al.*, 1992, Higashino *et al.*, 1993), ER81 (Brown & McKnight, 1992, Jeon *et al.*, 1995, Monté *et al.*, 1995) and ERM (Monté *et al.*, 1994). These three factors share more than 95% identity within the ETS domain (Monté *et al.*, 1994).

The human intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1, CD54), a member of the immunoglobulin supergene family, is an adhesion receptor of the immune system which mediates antigen-independent cell-cell contact between effector cells expressing the  $\beta 2$ -integrin molecules LFA-1 and Mac-1, and target cells of various origins (Rothlein *et al.*, 1986, Marlin & Springer, 1987, Diamond *et al.*, 1990). Interaction between LFA-1 or Mac-1 and ICAM-1 is essential for immune responses. For instance, it increases the avidity of the interaction between the T-cell receptor and antigen presented in the context of class II MHC molecules (Altman *et al.*, 1989). ICAM-1- $\beta 2$ -integrin interaction is also required for T-cell cytotoxicity, and leukocyte trafficking and migration into inflamed tissues (for review, see Dustin *et al.*, 1988, Albelda *et al.*, 1994). ICAM-1 expression is regulated by inflammatory mediators such as tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), as well as by bacterial liposaccharide, phorbol esters and retinoic acid (RA) (for review, see Stratowa & Audette, 1995 and references therein). The stimulation of the ICAM-

l protein expression correlates with increased levels of ICAM-1 mRNA, thus suggesting that ICAM-1 expression could occur at the transcriptional level (Simmons *et al.*, 1988).

The 5'-regulatory region of the human ICAM-1 gene has been cloned and characterized (Stade *et al.*, 1990, Voraberger *et al.*, 1991, Wawryk *et al.*, 1991), and two transcriptional start sites have been mapped, respectively 41 bp and 319 bp upstream from the translational start site (Voraberger *et al.*, 1991). The analysis of the 6 kb-region upstream from the ATG indicated the presence of one silencing and four enhancing elements contributing to the constitutive promoter activity (Jahnke *et al.*, 1995). Deletion mutant analyses of the 5'-regulatory region of the ICAM-1 gene demonstrated the crucial role of the TATA-box located at position -70, 30 bp upstream from the proximal start site. Several responsive elements for binding transcription factors have been identified in the promoter region of the ICAM-1 gene. Indeed, ICAM-1 is regulated by RA in an RA receptor- $\beta$ /retinoid X receptor- $\alpha$ -dependent fashion through an RA response element (RARE) located at position -266 (Aoudjit *et al.*, 1994, Aoudjit *et al.*, 1995). The NF- $\kappa$ B binding site situated at position -228, which binds p65 homodimers as well as p65/p50 and p65/c-rel heterodimers (Hou *et al.*, 1994, Ledebur & Parks, 1995, Aoudjit *et al.*, 1997) is essential for TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  induction (Voraberger *et al.*, 1991, Ledebur & Parks, 1995, Aoudjit *et al.*, 1997). A palindromic sequence present at position -116 was identified as an IFN $\gamma$  activating site recognized by p91/STAT1 (Caldenhoven *et al.*, 1994).

The ICAM-1 promoter also harbors several GGAA/T motifs, the core sequence for binding the Ets family of transcription factors. However, very little is known about the possible regulation of the ICAM-1 gene by transcription factors from the Ets family which regulate the transcription of a wide variety of genes (for review, see Crépieux *et al.*, 1994). Recently, an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-responsive element was identified between nucleotides -981 and -769, a region which was found to harbor an AP-1/Ets composite element. However, neither the induction of Ets or AP-1 family members by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, nor their binding to the composite element have been demonstrated (Roebuck *et al.*, 1995).

In an investigation of the role of Ets transcription factors in the regulation of ICAM-1, we found that Ets-2 and ERM dramatically activate ICAM-1 transcription in mammalian cells. An Ets-binding site was mapped to position -158, which was largely responsible for the ERM-mediated activation of gene transcription. Finally, we showed that mutation of this site resulted in decreased transcriptional activity and abrogated ERM binding.

## MATERIALS AND METHODS

### Expression and reporter vectors.

The ERM<sub>87-510</sub>, ERM<sub>355-510</sub>, ERM<sub>1-449</sub> and ERM<sub>87-449</sub> truncated proteins were generated by PCR and subcloned into the pSG5 expression vector as described (Janknecht *et al.*, 1996). Plasmid pBHluc1.3 harboring the ICAM-1 promoter, and promoter constructs inserted upstream from the luciferase gene, have been previously described (Voraberger *et al.*, 1991) and were kindly provided by Dr. C. Stratowa, Bender+Co, Vienna, Austria. ICAM-1 promoter region mapping between positions -178 to -44 was amplified by PCR using the 5'-CCCGGGCACCCTGTCAGTCCGGAAATAACTGCA-3' upstream and the 5'-GTCGACTGGGGCGCGTGATCCTTTATAGCGCTA-3' downstream primers, and was cloned into the PCRII vector (InVitrogen, San Diego, CA), to generate the WT-PCRII plasmid. WT-PCRII was then digested with SmaI-BglII endonucleases and the resulting fragment was subcloned into the SmaI-BglII sites of the pGL2-Basic vector (Promega, Madison, WI), upstream from the luciferase gene, thus leading to the recombinant plasmid WT-bas. The same strategy was employed to specifically introduce mutations within the Ets binding sites at positions -158 and -138. The upstream primers:

5'-CCCGGGCACCCTGTCAGTCCCCAAATAACTGCA-3'

and 5'-CCCGGGCACCCTGTCAGTCCGGAAATAACTGCAGCATTTGTTGGGGAG-3'

were used with the above described downstream primer, to obtain MUT<sub>158</sub>-bas and MUT<sub>138</sub>-

bas recombinant plasmids respectively. Double Ets mutant MUT<sub>158-138</sub>-bas was also generated by means of the upstream primer:

5'CCCGGGCACCCTGTCAGTCCCCAAATAACTGCAGCATTGTTGGGGAG-3'.

The pBfes.luc plasmid containing three copies of the 40-mer oligonucleotide corresponding to the Ets-responsive element of the *fes* promoter (Ray-Gallet *et al.*, 1995) cloned upstream from the luciferase gene was kindly provided by Dr. F. Moreau-Gachelin (Paris, France). The pSG5-Spi-1/Pu.1 encoding the chicken Spi-1/Pu.1 open reading frame was kindly provided by Dr Jean Coll (Lille).

### **Transfection assays.**

Rabbit kidney carcinoma RK13 (ATCC N° CCL37), human choriocarcinoma JEG-3 (ATCC N° HTB-36) and JAR (ATCC N° HTB-144) cell cultures were routinely maintained in Dulbecco medium with 10% fetal calf serum and kept at 37°C in an H<sub>2</sub>O saturated 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Transfections were performed by the lipofectamine procedure (Gibco-BRL, Cergy Pontoise, France) in 35-mm-dishes as described (Crépieux *et al.*, 1993, Monté *et al.*, 1995). All the assays were normalized to the β-galactosidase activity of the RSV-βGal vector and all the experiments were performed at least twice using at least two different plasmid preparations. For each figure, we report data obtained from a representative experiment.

### **Electrophoretic mobility-shift assays (EMSA).**

One μg of pSG5-ERM<sub>1-510</sub> plasmid was transcribed with 10 units of T7 RNA polymerase. The resulting ERM RNA was translated in 25 μl of rabbit reticulocyte lysate reaction mixture containing 40 μCi [<sup>35</sup>S]-methionine as specified by the manufacturer (Promega, Madison, WI) for 1.5 h at 30°C. Proteins produced in reticulocyte lysates or in bacteria were incubated for one hour on ice in a final volume of 20μl with 20mM HEPES pH 7.9, 20% v/v glycerol, 0.1mM EDTA, 1mM DTT, 1μg/20μl poly (dI:dC), 50mM NaCl and end-labeled double-stranded oligonucleotide probe comprising the Polyomavirus enhancer

sequence 5'-GATCTTCGAAAGGAAGTTCGAG-3' (PEA3<sub>MAX</sub>) (Monté *et al.*, 1994) or the ICAM-1 promoter sequences:

5'-AGCGGCCAGCGAGGGAGGATGACCCTCTCGGCCCGG-3' (-210 to -174),

5'-GGCACCCCTGTCAGTCCGGAAATAACTGCAG-3' (-175 to -145),

5'-GGCACCCCTGTCAGTCCCCAAATAACTGCAG-3' (-175 to -145\*),

5'-CTGCAGCATTGTTCCGGAGGGGAAGGCGCGAGG-3' (-150 to -117), and

5'-GAAGGCGCGAGGTTTCCGGGAAAGCAGCACCGCCCC-3' (-128 to -93).

The gel shift competition experiments were performed by the same procedure using 50 to 300 fold-excess of the indicated double-stranded primer.

DNA-protein complexes were resolved on a 10% polyacrylamide gel made in 0.2X TBE and run overnight at 150V (4°C).

### DNase I Footprinting

DNase I footprinting was performed as previously described (Plaza *et al.*, 1995a). The WT-PCRII vector was used to map the Ets binding sites. The footprinting probe was prepared by end-labeling the HindIII digested WT-PCRII plasmid with the Klenow fragment of DNA polymerase I (Boehringer-Mannheim, Germany) in the presence of [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP and -dATP (50  $\mu$ Ci each). After a secondary restriction with XbaI the fragment was purified from a 5% non-denaturing polyacrylamide gel. The end-labeled DNA probe (2ng) was incubated at 20°C for 1h with approximately 5 $\mu$ g of GST or GST-ERM<sub>355-510</sub> fusion protein, and 1 $\mu$ g of poly (dI:dC) in a 100 $\mu$ l volume of 0.5X DB buffer (10mM HEPES (pH 7.9) 30mM KCl, 0.12mM EDTA, 0.06mM EGTA, 10% (v/v) glycerol, 1mM dithiothreitol and 1mM PMSF) containing 5mM MgCl<sub>2</sub> and 2.5mM CaCl<sub>2</sub>. Digestion was performed with 20ng of DNase I (BRL) for 30 s at 20°C. The reaction was terminated by the addition of 30 $\mu$ l of 50mM EDTA and 0.5mg/ml of proteinase K. After phenol-chloroform extraction the samples were precipitated twice with ethanol and analyzed on 6% polyacrylamide sequencing gel before autoradiography.

## RESULTS

### Activation of the human ICAM-1 promoter by Ets proteins.

Transient transfection assays were performed in RK13 rabbit kidney cells to determine whether Ets proteins transactivate the ICAM-1 promoter. As shown in figure 1A, Ets-2 and ERM activated the pBHLuc1.3 reporter plasmid by 6.7- and 9.5-fold respectively. In contrast, the Spi-1/Pu.1 Ets transcription factor was unable to increase the transactivation. To confirm that Spi-1/Pu.1 is functional in RK-13 cells, the reporter plasmid containing the Ets-binding site of the *fes* promoter was cotransfected with the Ets expression plasmids. As shown in figure 1B, Ets-2, ERM and Spi-1/Pu.1 activated the *fes* transcription 14.3-, 17.2- and 19.0-fold respectively. This indicates that the Ets proteins such as Ets-1 (data not shown), Ets-2, PEA3 (data not shown) and ERM are able to activate the human ICAM-1 promoter, whereas the less-related Ets family member, Spi-1/Pu.1, which is a transactivating factor in RK13 cells, failed to activate this promoter.

Transient transfection assays were performed in JEG-3 human choriocarcinoma and RK13 rabbit kidney cells to localize Ets binding site(s) in the ICAM-1 promoter. Luciferase activity driven by the ICAM-1 promoter and some deletion mutants is reported in Table I. The basal activation level of pBHLuc1.3 reporter plasmid transfected with pSG5 vector was referred to 1 in both cell lines. In JEG-3 cells, the reporter plasmids B, C, E and N exhibited almost the same basal transactivation level as that of pBHLuc1.3, whereas plasmid D activation was 3.7-fold higher. The transcriptional activity of ICAM-1 promoter reporter plasmids pBHLuc1.3, B, C, D, and E was strongly stimulated 49.6-, 31.9-, 38.7-, and 34.9-fold respectively upon the transfection of the ERM expression plasmid. Plasmid N was stimulated 6.9-fold. In the RK13 cells, the basal activity of the ICAM-1 promoter and its deletion mutants B, C, D was virtually the same, whereas that of plasmids E and N was 30% and 10% of the pBHLuc1.3 level. ERM also stimulated the transcriptional activity of the ICAM-1 promoter reporter constructs, although RK13 are less responsive than JEG3 cells. Indeed, 6.5-, 4.5-, 4.7-, 8.3- and 4.7-fold increase were obtained with plasmids pBHLuc1.3 and B, C, D, and E respectively,

whereas plasmid N did not respond to ERM. These results indicate that the main ERM responsive element(s) is(are) located within the first 176 bp upstream from the ATG.

We have recently shown that ERM contains two transactivation domains respectively at the N-terminal ( $\alpha$ ) and the C-terminal (Ct) domains that act synergistically on artificial Ets responsive elements (Laget *et al.*, 1996, Janknecht *et al.*, 1996). Here, we examined whether these two domains were required for ICAM-1 promoter transactivation. We thus used the E reporter plasmid to compare the transactivation capacities of different truncated ERM proteins (Figure 2A). As illustrated in figure 2B, the relative luciferase activity measured from the E reporter increased 32.4- and 4.8-fold in JEG-3 and RK13 cells transfected with the plasmid encoding the full-length ERM (ERM<sub>1-510</sub>), respectively as compared to cells transfected with the pSG5 plasmid as control. The transactivation observed in JEG-3 transfected with the plasmids encoding for the ERM<sub>87-510</sub> and ERM<sub>355-510</sub> truncated proteins, both of which lack the first 87 amino acids, increased 6.1- and 14.8-fold, respectively, as compared to the transactivation induced by pSG5 plasmid alone. In RK13 cells, the corresponding transactivation levels were 1.9 and 1.0, respectively. The construct encoding the ERM<sub>1-449</sub> truncated protein, which only lacks the Ct domain, transactivated less than the full-length ERM, although it still retains a significant degree of transactivation activity. In fact, in JEG-3 and RK13 cells the ERM<sub>1-449</sub> truncated protein stimulated 14.8- and 2.8-fold the transactivation on the E reporter plasmid, respectively, as compared to the pSG5 plasmid alone. In both cell lines transfected with ERM<sub>87-449</sub> expression plasmids, which lack both transactivation domains, the transactivation level was not over the basal value (Figure 2B). These data thus indicate that in the context of the -176 to -44 region of the ICAM-1 promoter, ERM activates gene transcription through two transactivation domains corresponding to the amino-terminal and carboxy-terminal domains.

***In vitro* mapping of the Ets binding sites within the -178 to -44 region of the ICAM-1 promoter.**

As illustrated in figure 3A, the region of the ICAM-1 promoter corresponding to the WT-bas plasmid (-178 to -44 bp upstream from the translation start site) contains several putative Ets binding sites GGAA. To map the DNA sequences recognized by the ERM<sub>355-510</sub> GST-fusion protein, we performed DNase I footprinting experiments using an end-labeled DNA probe comprising the region between nucleotides -178 to -44 (Fig. 3B). We observed two main footprinted regions corresponding to the arrows. At position -136, the protected nucleotide corresponded to the second C of the TTCC Ets reverse core sequence whereas at position -155, it corresponded to the second A of the GGAA Ets core sequence. Two hypersensitive nucleotides were also mapped at position -130 and -159 (stars) in the vicinity of each of the two protected nucleotides (Fig. 3). The same results were obtained with the GST-ERM<sub>1-510</sub> fusion protein (data not shown).

We then performed EMSA with labeled double-stranded oligonucleotides covering this region. As shown in figure 4A, *in vitro* translated ERM<sub>1-510</sub> protein strongly bound to the -175 to -145 region (arrow) but not the three other oligonucleotides corresponding to nucleotides -210 to -174, -150 to -117 and -128 to -93. This binding is specific since it was displaced by an excess of nonradiolabeled oligonucleotide, whereas an unrelated oligonucleotide did not compete with the binding (data not shown). As a positive control, we showed that ERM bound to the PEA3<sub>MAX</sub> oligonucleotide which is recognized by Ets family members (Monté *et al.*, 1994). Since the -175 to -145 region contained the GGAA Ets binding site which is protected at position -155, we mutated this site in the -175 to -145 oligonucleotide by replacing the GG by CC to generate the -175 to -145\* oligonucleotide. Although ERM bound to the -175 to -145 wild-type oligonucleotide, it was unable to bind to the mutated -175 to -145\* probe (Fig. 4B).

The second protected nucleotide at position -136 was located within the TTCC Ets reverse core consensus site. EMSA performed with the -150 to -117 bp fragment as a probe enabled us to

detect a specific binding with the GST-ERM<sub>11-510</sub> fused protein (Fig. 4C). However, this binding was weaker than that obtained with the -175 to -145 oligonucleotide (data not shown). That we detected a signal on the -150 to -117 bp fragment with GST-ERM<sub>11-510</sub> fusion protein and not with the ERM protein produced in reticulocyte lysates was due to the different amounts of protein produced and could indicate that this site only has a weak affinity for ERM. As indicated in figure 4C by competition experiments, the specific binding between GST-ERM<sub>11-510</sub> fused protein and the -175 to -145 or the -150 to -117 probes is strongly competed by the -175 to -145 unlabeled primer. This is illustrated by the data showing that the 50 fold-excess of this unlabeled primer dramatically reduce the binding observed with both probes. In contrast, although excess of the -150 to -117 unlabeled primer decrease the binding of both probes, this displacement effect is at least 4-fold less intense than with the -175 to -145 unlabeled primer. These data suggest that the GGAA and the TTCC sites located in the ICAM-1 promoter at positions -158 and -138, respectively are the Ets binding sites which might be responsible for the activation of this promoter by ERM, although the -175 to -145 site seems to be the site which the highest affinity for this transcription factor.

#### **Mutation of the Ets binding site at position -158 of the ICAM-1 promoter diminishes ICAM-1 gene transcription.**

To determine whether both Ets binding sites at positions -158 and -138 are transcriptionally functional, we subcloned the wild-type -178 to -44 region upstream from the luciferase gene leading to the WT-bas plasmid. Each Ets binding sites or both were mutated in the WT-bas plasmid by replacing the GG of the core sequence by CC, thus leading to MUT<sub>158</sub>-bas, MUT<sub>138</sub>-bas and MUT<sub>158-138</sub>-bas recombinant plasmids.

We then tested in RK13 cells, previously characterized in our group relatively to its Ets-dependent transcriptional activity, whether the -158 site is activated by the endogenous Ets proteins. As illustrated in figure 5, the basal transactivation level obtained with the MUT<sub>158</sub> reporter plasmid was two-fold lower than that obtained with the control plasmid. In contrast, the transactivation level obtained with the MUT<sub>138</sub> reporter plasmid was similar to that obtained

with the control plasmid (WT), whereas the level obtained with the MUT<sub>158-138</sub> reporter plasmid was identical to that with the MUT<sub>158</sub> reporter plasmid (Fig. 5). This experiment shows that the Ets-binding site located at position -158 is the major functional Ets binding site of the ICAM-1 promoter and demonstrates that endogenous Ets proteins contribute to the basal activity of the ICAM-1 promoter.

Results obtained with these reporter plasmids in cotransfection with ERM are reported in figure 6. ERM increased WT-bas transactivation in JEG-3 and RK13 cells 25.2- and 5.7-fold, respectively. In contrast, when MUT<sub>158</sub> was used as the reporter plasmid, the transactivation induced by ERM was only 6.1- and 1.2-fold in JEG-3 and RK13 cells respectively. The mutation of the second Ets site at position -138 reduced the transactivation induced by ERM significantly but less efficiently, since it increased MUT<sub>138</sub> plasmid transactivation in the JEG-3 and RK13 cells 17.4- and 2.2-fold, respectively. This reflects the relative affinity of ERM for this latter site and supports the results obtained in EMSA (Fig 4). As shown with the MUT<sub>158-138</sub> construct when compared with the MUT<sub>158</sub> construct, mutations of both Ets sites did not reduce ERM-induced transactivation any further (Fig. 6). Taken together, these data clearly indicate that the Ets binding site located at position -158 of the human ICAM-1 promoter is mainly responsible for the ERM-mediated increase in transcriptional activity.

## DISCUSSION

We demonstrate here that members of the Ets family of transcription factors can play a role in human ICAM-1 gene regulation by identifying a functional Ets binding site in the ICAM-1 promoter. The ICAM-1 promoter (Voraberger *et al.*, 1991) contains several GGAA/T motifs, the cognate DNA sequence for the binding of Ets proteins (for review see, Crépieux *et al.*, 1994). In the present study, we demonstrate that the Ets proteins Ets-1 (data not shown), Ets-2, ER81, PEA3 (data not shown) and ERM strongly activate the ICAM-1 promoter, whereas the myeloid specific Ets protein, Spi-1/Pu.1, did not activate this promoter. That Spi-1/Pu.1 does not transactivate the ICAM promoter can be explained by its more distant relationship with the other Ets family members (Laudet *et al.*, 1993). Although most of the Ets proteins have the ability to bind the GGAA/T cores sequence, flanking nucleotides are important to specifically optimize the binding of certain Ets family members. The ICAM-1 Ets binding site identified here significantly diverges from that described to optimize Spi1/Pu.1 binding (Ray-Gallet *et al.*, 1995).

Whereas the truncation of plasmid pBHLuc1.3 to give plasmids B, C, D, and E resulted in variations in their respective basal transcriptional activity, their responsiveness to ERM remained roughly the same in both the JEG-3 and the RK-13 cells. This observation suggested that the region by which ERM acts directly or indirectly in ICAM-1 activation mapped between position -176 and -44. Several putative Ets binding sites are present in this region, two of which were found to bind ERM. In fact, we confirmed that the -193 putative Ets binding site identified by Ledebur and Parks (Ledebur & Parks, 1995) was non-functional, whereas the -158 and -138 Ets binding sites were identified by two independent methods as the DNA motifs responsible for direct interaction with ERM. With respect to the ability of ERM to bind specifically to the PEA3<sub>MAX</sub> (Monté *et al.*, 1995) sequence derived from the polyomavirus enhancer, gel shift analysis enabled us to identify a high affinity Ets binding site at position -158 and a lower affinity one at position -138 by means of bacterially expressed ERM protein.

DNase footprinting experiments enabled us to determine that the first G from the GGAA motif at position -155 is protected, as is the second G of the inverse Ets motif at position -136. These two protected sequences present both hypersensitive sites at C<sub>159</sub> and G<sub>130</sub>. The recent elucidation of the structure of the ETS domain-DNA complex is understood in terms of steric interference with the extensive contacts formed by helix H3 of the ETS domain with GG in the major groove (Werner *et al.*, 1995). The specificity of a particular promoter response element for a given Ets family member is determined by the nucleotide sequence flanking the core GGAA/T motif. These sequences are 5'-TCCGGAAATA-3' around site -155 and 5'-TCCGGAACAA-3' around site -136. Both sequences were recovered by target detection assay with several Ets proteins such as ER81, which is the closely ERM-related Ets protein (Brown & McKnight, 1992).

The mutation of the Ets binding site at position -158 abrogated the binding to both the ERM and the other Ets proteins (data not shown), and decreased the ERM-mediated transactivation of the WT-bas plasmid. However in the JEG-3 cells, this mutation did not completely abolish the ERM-dependent effect. Moreover, the -150 to -44 promoter region was still able to be slightly activated by ERM, thus suggesting that other sequences in this region are involved in the Ets-mediated regulation of ICAM-1 gene in JEG-3 cells. ERM may indeed regulate the transcription of other transactivating factors, binding downstream position -150, to upregulate ICAM-1 gene transcription. This remains to be elucidated.

Transient transfection experiments were carried out in two cell types: JEG-3 cells do not contain PEA3 group member mRNA (Monté *et al.*, 1994, Monté *et al.*, 1995), whereas RK13 cells do contain significant amount of at least ERM proteins as assessed by immunoprecipitation (data not shown). This thus explains the high level of induction by ERM in JEG-3 cells as compared to RK13. The human choriocarcinoma JAR cell line which does not express PEA3 group members has been similarly tested and high level of induction by co-transfected ERM has also been obtained (data not shown).

To further investigate the biological relevance of the Ets-mediated increased ICAM-1 gene promoter activity, we have tested whether endogenous Ets indeed contribute to the basal

activity of the ICAM-1 promoter. Disruption of the site at position -158 significantly decreased by 50% the basal activity of the promoter in RK13 cells.

Since ERM and Ets-2 (data not shown) activates the ICAM-1 promoter through the Ets binding site at position -158, this thus indicates that cofactors putatively required for Ets activity are present in these cell lines RK13 and JEG3 cells. We showed here that on a constitutive basis, ICAM-1 gene can be regulated by several Ets family members. Whether they contribute to optimize the cytokine-mediated increased ICAM-1 gene transcription remains to be determined. Cooperative functions between specific Ets family members and other DNA-binding proteins are important to optimize gene expression. This was shown for instance for Ets-1 and Ets-2, which functionally cooperate with c-Fos and c-Jun to activate transcription from the Ets-AP1 motif present in the polyoma virus enhancer (Wasylyk *et al.*, 1990). Moreover, a direct physical interaction between Ets and AP-1 proteins has been demonstrated (Bassuk & Leiden, 1995, and references therein). Although ERM can act synergistically with c-Jun for optimal Ets-binding site activation (Nakae *et al.*, 1995), the -176 to -44 region of the ICAM-1 promoter does not contain any consensus AP-1 site. The first imperfect consensus AP-1 site is in fact located at position -324, which is not included in deletion reporter plasmid E, and therefore rules out a putative cooperation between ERM and c-Jun/c-Fos in the context of the ICAM-1 transcription (table 1). We thus co-transfected ERM or Ets-2 with c-Jun and c-Fos expression plasmids and no significant increase in reporter transactivation was observed (data not shown). Thus, it seems that ICAM-1 regulation by the Ets proteins tested is independent of the other transcription factors currently characterized.

The Ets proteins are implicated in metastatic spreading as transcriptional regulators of the metalloproteinases (MMP) stromelysin I, and type I and IV collagenases (Gutman & Wasylyk, 1990, Wasylyk *et al.*, 1991, Sato & Seiki, 1993). It was recently demonstrated in human cells that the closely ERM-related factor PEA3 (E1A-F) is able to activate these latter three genes (Higashino *et al.*, 1993). Moreover, when PEA3 is over-expressed in the MCF-7

mammary cancer cells, the endogenous MMP 92 kDa type IV collagenase is upregulated. Altogether, these results provide evidence of an important role for Ets-related transcription factors, and more particularly the PEA3 group members, in tumor cell invasion. Strong ICAM-1 expression is found in solid tumors such as melanomas and renal carcinomas and in a lesser extent in gastric, breast and colorectal carcinomas (Vogetseder *et al.*, 1989, Natali *et al.*, 1990, Johnson, 1991). As far as melanoma are concerned, *de novo* ICAM-1 expression correlates with increased risk of metastasis (Johnson *et al.*, 1989). This suggests that the regulation of ICAM-1 gene by Ets proteins, particularly the PEA3 group members, might be linked through its co-regulation with MMPs during the metastasis process, and so might enable melanoma cells to invade the adjacent tissue and then to disseminate. Similarly, Ets family members might also contribute to co-regulating adhesion molecule and protease expression in inflamed joints associated with tissue destruction.

## ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Isabelle Damour, Nancy Brochu, Laurent Pouilly and Chantal Vercamer for their invaluable technical assistance. We are grateful to Dr Tom Parks and Dr Jean Coll for critical reading of the manuscript. This work has been carried out on the basis of grants awarded in part by the "Institut Pasteur de Lille" (France), the "Centre National de la Recherche Scientifique" (France), the "Association pour la Recherche contre le Cancer", the "Fédération des GEFLUC", the "Ligue Contre le Cancer" (France), the Canadian Arthritis Society (Canada) and the "Fonds de la Recherche en Santé du Québec" (Canada).

## LEGENDS TO FIGURES

**Figure 1.** Ets proteins can activate human ICAM-1 promoter. Reporter plasmids pBHluc1.3 containing 1.3 kb of the ICAM-1 promoter (Voraberger *et al.*, 1991) and pBfes.luc containing three copies of the 40-mer oligonucleotide corresponding to the Ets-responsive element of the *fes* promoter (Ray-Gallet *et al.*, 1995) were cloned upstream from the luciferase gene. Two hundred thousand rabbit RK13 kidney carcinoma cells were transiently transfected by the lipofectamine technique with (A) 0.2  $\mu$ g RSV- $\beta$ Gal plasmid, 0.2  $\mu$ g of the pBHluc1.3 reporter gene and 0.6  $\mu$ g of one of the pSG5 expression vectors, or (B) 0.2  $\mu$ g RSV- $\beta$ Gal plasmid, 0.2  $\mu$ g of the pBfes.luc reporter gene, 0.57  $\mu$ g pSG5 control vector and 0.03  $\mu$ g of one of the pSG5 expression vectors. The expression vectors used were the pSG5 control vector (control), the pSG5-Ets-2 vector (Ets-2) encoding the human Ets-2 protein, the pSG5-ERM vector (ERM) encoding the human ERM protein and the pSG5-Spi-1/Pu.1 vector (Spi-1/Pu.1) encoding the chicken Spi-1/Pu.1 protein. Twenty-four hours later, cellular proteins were collected as described in the Materials and Methods section and relative luciferase activity was assessed. The data presented are mean  $\pm$  SEM from two different experiments, each performed with three different plasmid preparations. The activity of cells transfected with the pSG5 expression vector was designated 1.

**Figure 2.** Mapping of the ERM regions responsible for ICAM-1 promoter activation.

**A.** Schematic representation of the structure of ERM. The activation and ETS homology domains are indicated, and the positions of the different construct extremities are delineated by arrows. **B.** Seventy % confluent JEG-3 and RK13 cells were transfected in 35 mm dishes by the lipofectamine technique using 8  $\mu$ l lipofectamine (Gibco-BRL kit) with 0.6  $\mu$ g expression vector for ERM (pSG5 control or the pSG5-ERM truncation vectors), 0.2  $\mu$ g RSV- $\beta$ Gal vector and 0.2  $\mu$ g of the E (-176 to -44) reporter plasmid. Twenty-four hours later, the cells were harvested and luciferase and  $\beta$ -galactosidase activities were determined.

Data obtained on two independent experiments with three different plasmid preparations are presented as fold activation with respect to the pSG5 control plasmid alone.

**Figure 3.** DNase I footprinting of the -176 to -44 region from the human ICAM-1 promoter using ERM protein.

**A.** Sequence of the 177 nucleotides located upstream from the transcription initiation start site (numbered -41: arrow). The putative Ets binding sites are underlined and the TATA box is boxed.

**B.** DNase I footprinting was performed as described (Plaza *et al.*, 1995a, Plaza *et al.*, 1995b). Two ng of the end-labeled HindIII-XbaI restriction fragment of the WT plasmid (nucleotide -178 to -44 of the ICAM-1 promoter) was incubated in the presence or absence of GST or GST-ERM<sub>355-510</sub> fusion protein followed by digestion with DNase I. After extraction, the samples were precipitated and analyzed on 6% polyacrylamide sequencing gel before autoradiography for 24 h. Footprints were calibrated with Maxam & Gilbert (lane G+A). The two main protected nucleotide regions are indicated by arrows, and the two main hypersensitive nucleotides by stars. The nucleotide sequences corresponding to the protected regions are presented on the left.

**Figure 4.** DNA-binding activity of *in vitro* translated and recombinant human ERM on ICAM-1 promoter.

**A.** Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) of human ERM synthesized in rabbit reticulocyte lysates. Double-stranded, end-labeled oligonucleotide primers corresponding to regions -210 to 174, -175 to -145, -150 to -117 and -128 to -93 of the ICAM-1 promoter and part of the sequence of the Polyomavirus enhancer (PEA<sub>3MAX</sub>) were used as probes. The ERM protein-DNA complex (arrow) was separated from the free probe on a non-denaturing 6% polyacrylamide gel.

**B.** EMSA was performed as in A with oligonucleotide -175 to -145 harboring mutations within the Ets binding site where GGAA was replaced by CCAA (-175 to -145\*). The wild-type -175 to -145 oligonucleotide was used as positive control.

C. EMSA was performed as in A with 5  $\mu\text{g}$  of bacterially produced GST-ERM<sub>11-510</sub> fused protein and 1ng of <sup>32</sup>P-labeled double-stranded primers corresponding to regions -175 to -145 (-175 to -145 Probe) or -150 to -117 (-150 to -117 Probe) of the ICAM-1 promoter. The arrow corresponds to the protein-DNA complex and the free probe is not shown. The relative DNA-binding affinities were appreciated with increasing amounts of one of the two unlabeled double stranded primers. The primer excess varies from 50- to 300-fold.

**Figure 5.** Constitutive transactivation on wild-type or mutant ICAM-1 promoter.

The RK13 cells were transfected as described in table 1 with 0.6  $\mu\text{g}$  of the pSG5 vector, 0.2  $\mu\text{g}$  RSV- $\beta$ Gal vector and 0.2  $\mu\text{g}$  of the wild-type (WT) or mutant -178 to -44 ICAM-1 promoter-pGL2 reporter plasmids described in figure 5. The data obtained on four independent experiments with three different plasmid preparations are presented as fold activation with respect to the WT-bas reporter plasmid (100%).

**Figure 6.** ERM-mediated transactivation on wild-type or mutant ICAM-1 promoter.

The JEG-3 and RK13 cells were transfected as described in table 1 and figure 1 with 0.6  $\mu\text{g}$  of the expression vectors (pSG5 or pSG5-ERM), 0.2  $\mu\text{g}$  RSV- $\beta$ Gal vector and 0.2  $\mu\text{g}$  of the wild-type (WT) or mutant -178 to -44 ICAM-1 promoter-pGL2 reporter plasmids. The MUT<sub>158</sub>-bas or MUT<sub>138</sub>-bas recombinant plasmids were mutated in the two Ets binding sites by replacing the GG of the GGAA core sequence by CC at position -158 (MUT<sub>158</sub>) or the CC of the TTCC core sequence by GG at position -138 (MUT<sub>138</sub>). The MUT<sub>158-138</sub>-bas (MUT<sub>158-138</sub>) recombinant plasmid corresponds to the double mutant. The data obtained on two independent experiments with three different plasmid preparations are presented as fold activation with respect to the pSG5 control plasmid alone.

Table I

Effect of ERM on transcriptional activity of ICAM-1 promoter deletion mutants

| Plasmids                              | Luciferase activity |               | Fold increase<br>basal/ERM activated |
|---------------------------------------|---------------------|---------------|--------------------------------------|
|                                       | Basal               | ERM-activated |                                      |
| <b><u>JEG-3 Cells</u></b>             |                     |               |                                      |
| pBHluc1.3 (-1393->-44)                | 1.0±0.2             | 49.6±8.5      | 49.6                                 |
| plasmid B (-769->-44)                 | 2.0±0.7             | 63.7±7.4      | 31.9                                 |
| plasmid C (-469->-44)                 | 1.7±0.5             | 65.8±15.4     | 38.7                                 |
| plasmid D (-393->-44)                 | 3.4±1.0             | 126.1±25.3    | 37.1                                 |
| plasmid E (-176->-44)                 | 1.5±0.3             | 52.3±0.4      | 34.9                                 |
| Plasmid N (-1393->-857,<br>-150->-44) | 1.0±0.1             | 6.9±0.4       | 6.9                                  |
| <b><u>RK-13 Cells</u></b>             |                     |               |                                      |
| pBHluc1.3 (-1393->-44)                | 1.0±0.2             | 6.5±0.7       | 6.5                                  |
| plasmid B (-769->-44)                 | 0.7±0.1             | 3.2±0.6       | 4.5                                  |
| plasmid C (-469->-44)                 | 1.0±0.3             | 4.7±0.6       | 4.7                                  |
| plasmid D (-393->-44)                 | 0.9±0.1             | 7.5±0.9       | 8.3                                  |
| plasmid E (-176->-44)                 | 0.3±0.1             | 1.4±0.3       | 4.7                                  |
| Plasmid N (-1393->-857,<br>-150->-44) | 0.1±0.1             | 0.1±0.1       | 1                                    |

Reporter plasmid pBHluc1.3 containing the ICAM-1 promoter as well as deletion mutant plasmids B, C, D, E, and N (Voraberger *et al.*, 1991) were cloned upstream from the luciferase gene. The endpoints of fragments are numbered relative to the translation start site (A from ATG = +1). Two hundred thousand rabbit RK13 kidney carcinoma or human JEG-3 choriocarcinoma cells were transiently transfected by the lipofectamine technique with 0.2 µg of the indicated luciferase reporter genes in the presence of 0.6 µg of pSG5 expression vector, and 0.2 µg RSV-βGal plasmid. Twenty-four hours later, cellular proteins were collected as described in the Materials and Methods section and relative luciferase activity corresponding to each deletion promoter construct in the presence of pSG5 (basal) or pSG5-ERM (ERM) was assessed. The data presented are mean ± SEM from at least four different experiments, each performed with three different plasmid preparations. The activity of cells transfected with the -1393 to -44 reporter plasmid and the pSG5 expression vector was designated 1.

## REFERENCES

- Albelda SM, Smith CW and Ward PA (1994). *FASEB J.*, **8**, 504-512.
- Altman DM, Hogg N, Trowsdale J and Wilkinson D (1989). *Nature*, **338**, 512-514.
- Aoudjit F, Bossé M, Stratowa C, Voraberger G and Audette M (1994). *Int. J. Cancer*, **58**, 543-549.
- Aoudjit F, Brochu N, Bélanger B, Stratowa C, Hiscott J and Audette M (1997) *Cell Growth Diff.*, **8**, 335-342.
- Aoudjit F, Brochu N, Morin N, Poulin G, Stratowa C and Audette M (1995). **6**, 515-521.
- Bassuk AG and Leiden JM (1995). *Immunology*, **3**, 223-237.
- Brown TA and McKnight SL (1992). *Genes & Dev.*, **6**, 2502-2512.
- Caldenhoven E, Coffey P, Yuan J, van de Stolpe A, Horn F, Kruijer W and van der Saag PT (1994). *J. Biol. Chem.*, **269**, 21146-21154.
- Crépieux P, Coll J and Stéhelin D (1994). *Crit. Reviews Oncology*, **5**, 615-638.
- Crépieux P, Leprince D, Flourens A, Albagli O, Ferreira E and Stéhelin D (1993). *Gene Expression*, **3**, 215-225.
- de Launoit Y, Baert JL, Chotteau A, Monté D, Defossez PA, Coutte L, Pelczar H and Leenders F. *Biochem. Mol. Med.*, **61**, 127-135
- Diamond MS, Staunton DE, de Fougerolles AR, Stacker SA, Garcia-Aguilar J, Hibbs ML and Springer TA (1990). *J. Cell. Biol.*, **111**, 3129.
- Dustin ML, Singer KH, Tuck DT and Springer TA (1988). *J. Exp. Med.*, **167**, 1323-1340.
- Gutman A and Wasylyk B (1990). *The Embo J.*, **9**, 2241-2246.
- Higashino F, Yoshida K, Kamio K and Fujinaga K (1993). *Nucleic Acids Res.*, **21**, 547-553.
- Hou J, Baichwal V and Cao Z (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 11641-11645.
- Jahnke A, van de Stolpe A, Caldenhoven E and Johnson JP (1995). *Eur. J. Biochem.*, **228**, 439-446.
- Janknecht R, Monté D, Baert D and de Launoit Y (1996). *Oncogene*, **13**, 1745-1754.

- Janknecht R and Nordheim A (1993). *Biochim. Biophys. Acta*, **1155**, 346-356.
- Jeon I-S, Davis JN, Braun BS, Sublett JE, Roussel MF, Denny CT and Shapiro DN (1995). *Oncogene*, **10**, 1229-1234.
- Johnson JP (1991). *Chem. Immunol.*, **50**, 143-163.
- Johnson JP, Stade BG, Holzmann B, Schwäble W and Riethmüller G (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 641-644.
- Karim FD, Urness LD, Thummel CS, Klemsz MJ, McKercher SR, Celada A, Van Beveren C, Maki RA, Gunther K, Nye JA and Graves BJ (1990). *Genes & Dev.*, **4**, 1451-1453.
- Laget MP, Defossez PA, Albagli O, Baert JL, Dewitte F, Stéhelin D and de Launoit Y (1996). *Oncogene*, **12**, 1325-1336.
- Laudet V, Niel C, Duterque M, Leprince D and Stéhelin D (1993). *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **190**, 8-14.
- Ledebur HC and Parks TP (1995). *J. Biol. Chem.*, **270**, 933-943.
- Marlin SD and Springer TA (1987). *Cell*, **5**, 813.
- Monté D, Baert JL, Defossez PA, de Launoit Y and Stéhelin D (1994). *Oncogene*, **9**, 1397-1406.
- Monté D, Coutte L, Baert JL, Angeli I, Stéhelin D and de Launoit Y (1995). *Oncogene*, **11**, 771-779.
- Nakae K, Nakajima K, Inazawa J, Kitaoka T and Hirano T (1995). *J. Biol. Chem.*, **270**, 23795-23800.
- Natali P, Nicotra MR, Cavaliere R, Bigotti A, Romano G, Temponi M and Ferrone S (1990). *Cancer Res.*, **50**, 1271-1278.
- Plaza S, Dozier C, Langlois MC and Saule S (1995a). *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 892-903.
- Plaza S, Turque N, Dozier C, Bailly M and Saule S (1995b). *Oncogene*, **10**, 329-340.
- Ray-Gallet D, Mao C, Tavitian A and Moreau-Gachelin F (1995). *Oncogene*, **11**, 303-313.
- Roebuck KA, Rahman A, Lakshminarayanan V, Janakidevi K and Malik AB (1995). *J. Biol. Chem.*, **270**, 18966-18974.

- Rothlein R, Dustin ML, Marlin SD and Springer TA (1986). *J. Immunol.*, **137**, 1270.
- Sato H and Seiki M (1993). *Oncogene*, **8**, 395-405.
- Simmons D, Makgoba MW and Seed B (1988). *Nature*, **331**, 624-627.
- Stade BG, Messer G, Riethmüller G and Johnson JP (1990). *Immunobiology*, **182**, 79.
- Stratowa C and Audette M (1995). *Immunobiol.*, **193**, 293-304.
- Vogetseder W, Feichtinger TF, Schultz W, Schwäble W, Tabaczewski P, Mitterer M, Böck G, Marth C, Dapunt O, Mikuz G and Dierich MP (1989). *Int. J. Cancer*, **43**, 768-773.
- Voraberger G, Schäfer R and Stratowa C (1991). *J. Immunol.*, **147**, 2777-2786.
- Wasylyk B, Hahn SL and Giovane A (1993). *Eur. J. Biochem.*, **211**, 7-18.
- Wasylyk B, Wasylyk C, Flores P, Bègue A, Leprince D and Stéhelin D (1990). *Nature*, **346**, 191-193.
- Wasylyk C, Gutman A, Nicholson R and Wasylyk B (1991). *The Embo J.*, **10**, 1127-1134.
- Wawryk SO, Cockerill PN, Wicks IP and Boyd AW (1991). *Int. Immunol.*, **3**, 83.
- Werner MH, Clore GM, Fisher CL, Fisher RJ, Trinh L, Shiloach J and Gronenborn AM (1995). *Cell*, **83**, 761-771.
- Xin JH, Cowie A, Lachance P and Hassell JA (1992). *Genes & Dev.*, **6**, 481-496.

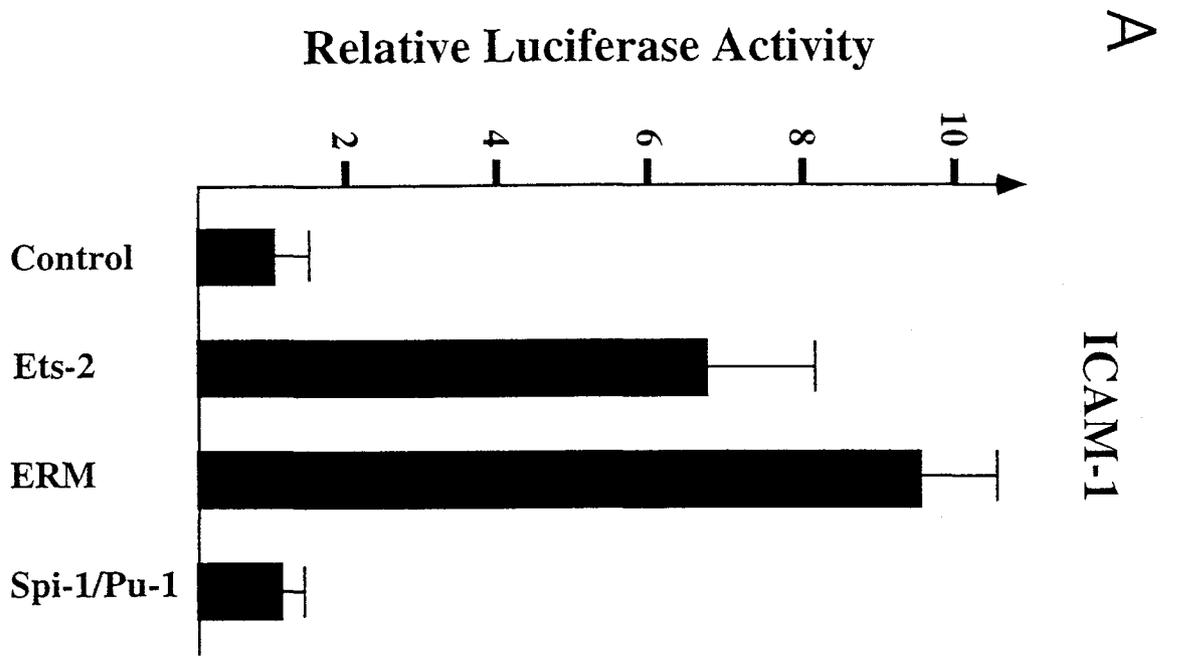


Figure 1

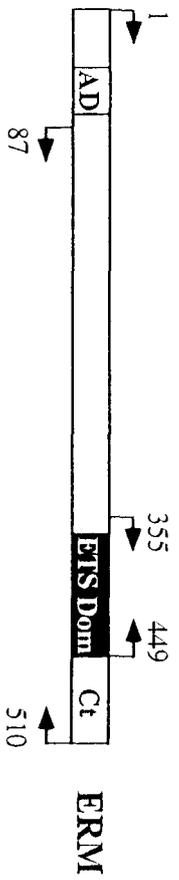
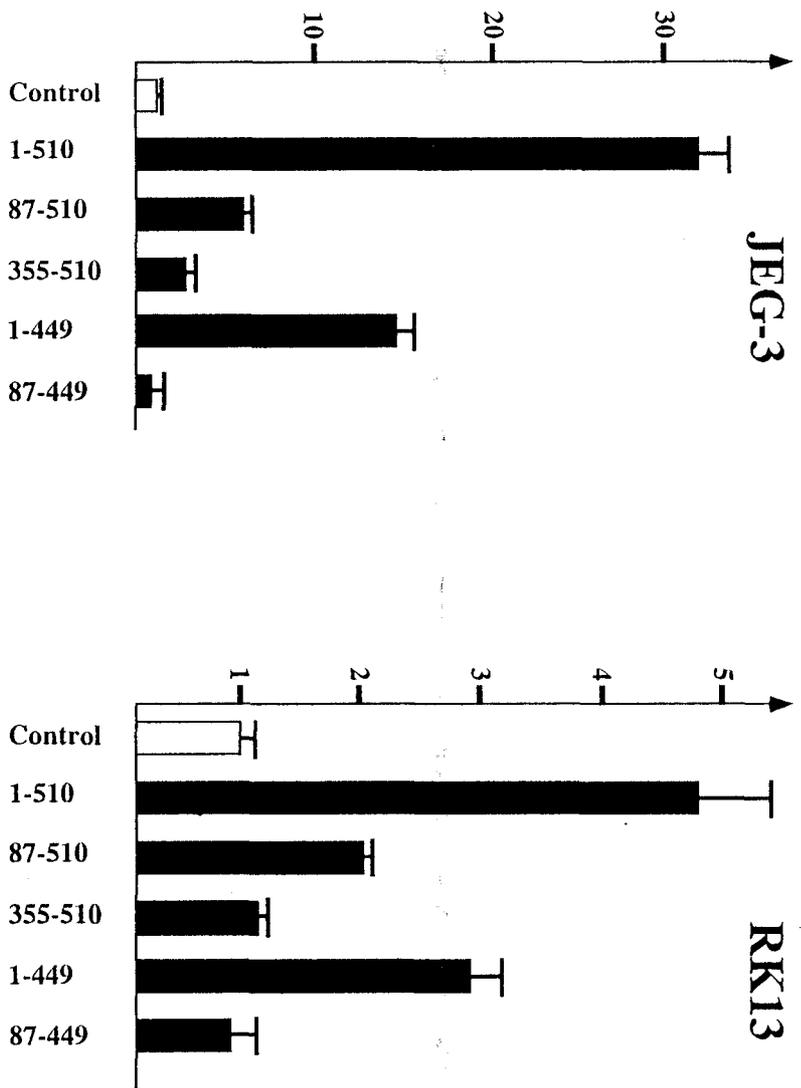
**A****B**

Figure 2

**A**

CCGGGCACCCTGTCAGTCCGGAATAACTGCAGCATTGTTCCGGA  
-177  
GGGAAGGCGCGAGGTTTCCGGAAAGCAGCACCGCCCCTTGGCCC  
-131  
CCAGGTGGCTAGCGCTATAAAGGATCACGCGCCCCAGTCGACGCT  
-85  
TATA-box

**B**

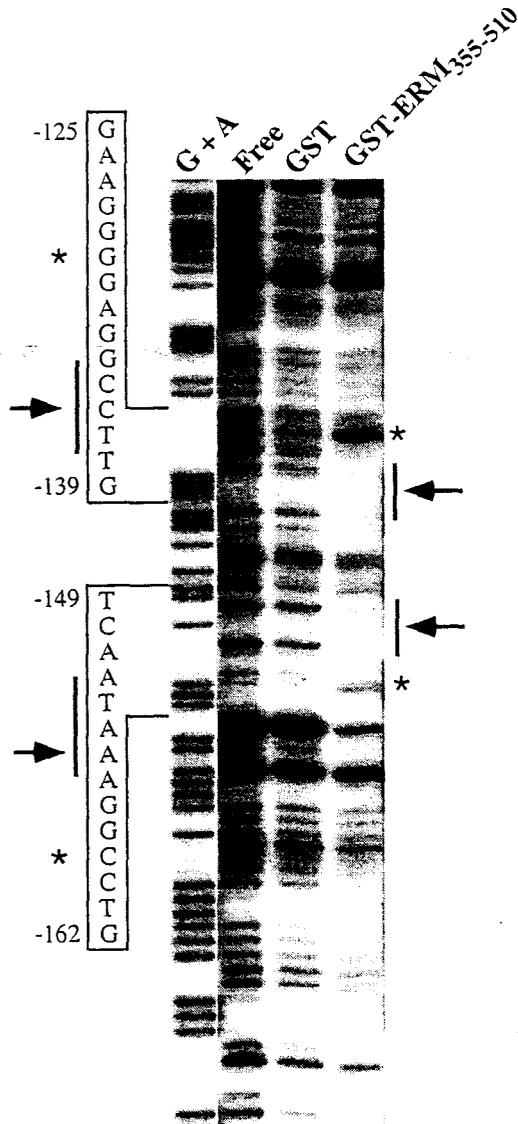


Figure 3

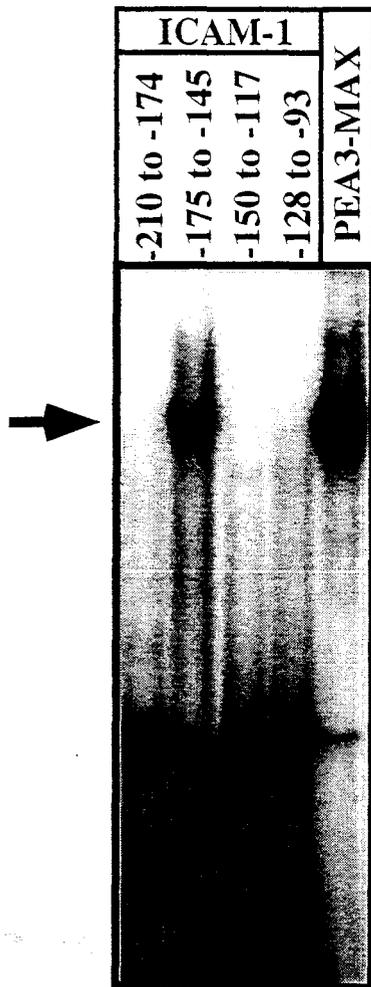
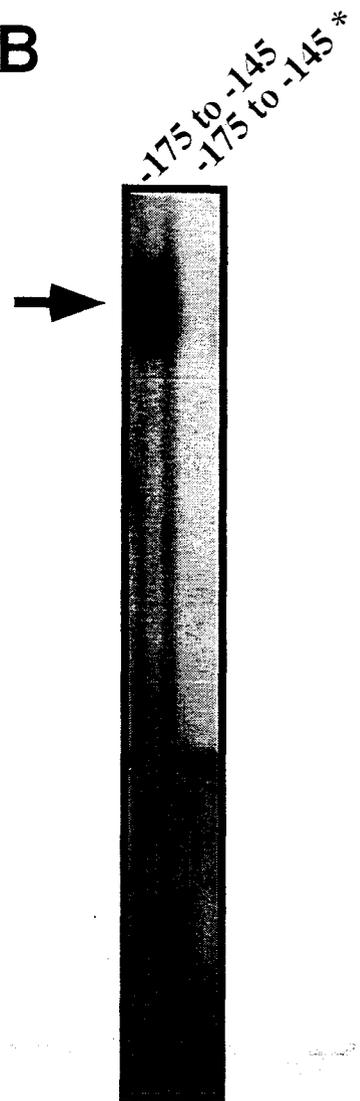
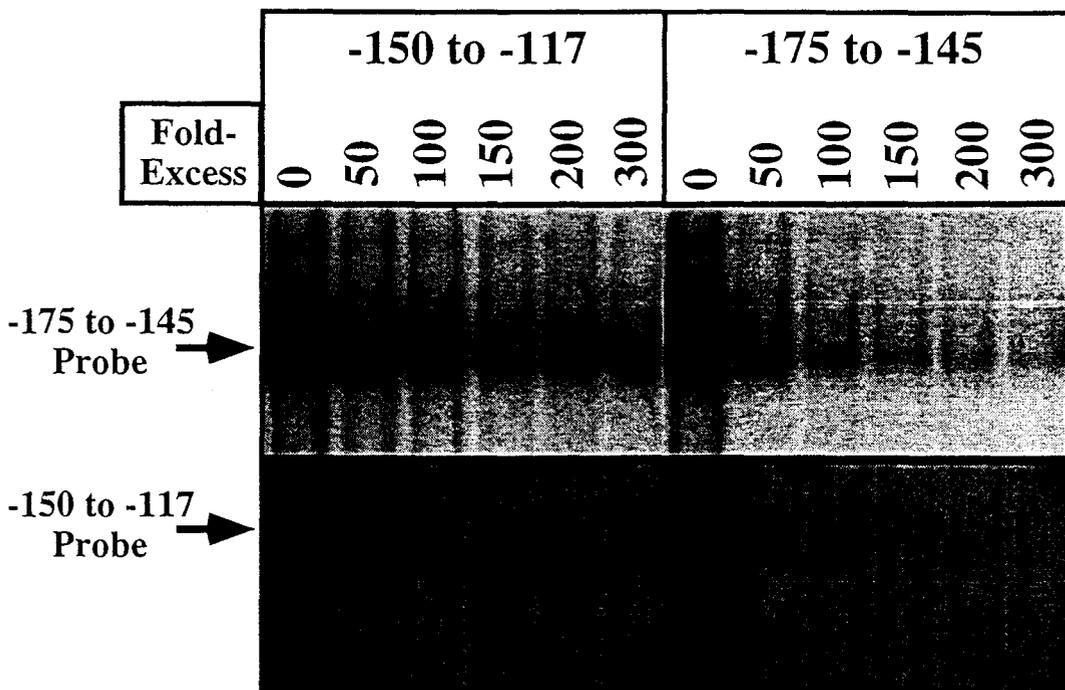
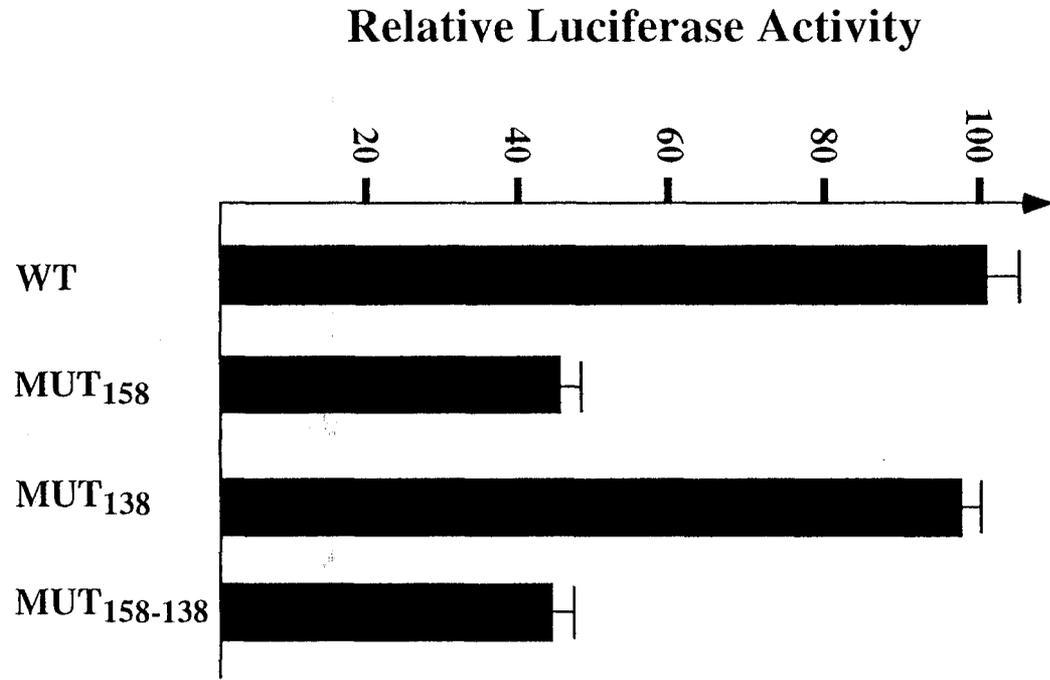
**A****B****C**

Figure 5



Relative Luciferase  
Fold Activation

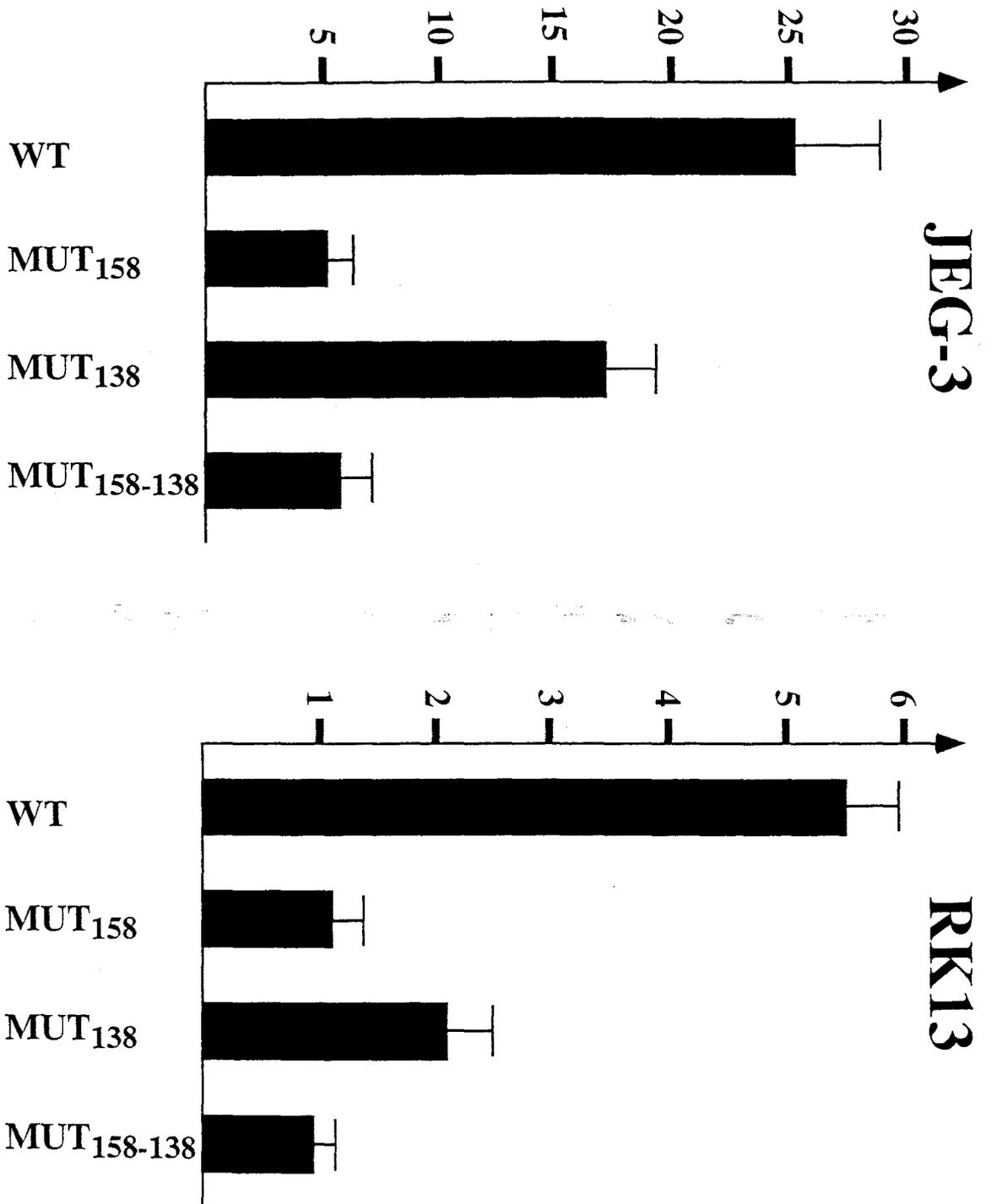


Figure 6

## A Conditional Version of the Ets Transcription Factor Erm by Fusion to the Ligand Binding Domain of the Oestrogen Receptor

Hélène Pelczar,\* Olivier Albagli,† Anne Chotteau-Lelievre,\*‡  
Isabelle Damour,\* and Yvan de Launoit\*<sup>1</sup>

\**Mécanismes du Développement et de la Cancérisation, UMR 319 CNRS/Institut Pasteur de Lille - Institut de Biologie de Lille, 1 rue Calmette, BP 447, 59021 Lille Cedex, France;* †*INSERM U 124, IRCL, Place de Verdun, 59045 Lille Cedex, France;* and ‡*Centre de Biologie Cellulaire, Unité Dynamique des Cellules Embryonnaires et Cancéreuses, Bâtiment SN3, USTL, Villeneuve d'Ascq, France*

Received August 9, 1997

The fusion of a wide range of proteins to the ligand-binding domain of nuclear receptors has been shown to impart ligand-dependent inducible activity of the resulting chimera. Transcriptional regulators of the ETS family are involved in both normal and oncogenic processes. In order to address the role of Erm, a "PEA3 subgroup" member of this family, we generated a chimera between Erm and the widely used ligand-binding domain of the oestrogen receptor (ER). The chimera, ErmER, consists of Erm protein fused at its C-terminal end to the ER domain. We show that ErmER displays a ligand-dependent transcriptional activity on *ets* responsive elements. The efficiency of ErmER mediated transactivation is modulated by the hormone concentration while its weak leakiness is reduced by using the steroidal anti-oestrogen EM-139. Our results define ErmER as the first conditional version of an Ets transcription factor, providing a useful tool to decipher Erm biological role and to identify potential Erm target genes. © 1997 Academic Press

**Key Words:** Erm; Ets; transcription factor; oestrogen receptor; EM-139; Chimera.

The *ets* family members are genes encoding transcription factors involved in both transcriptional activation and repression. They share the family hallmark domain named the Ets domain, responsible for their specific DNA binding to sequences centred on the GGAA/T core. Based on sequence identity data, several subgroups of highly related *ets* members have been defined (1, 2). The "PEA3 subgroup" is composed of *pea3*

(3), *erm* (4) and *er81* (5) classified by virtue of their close similarity to *pea3*. In addition to the Ets domain, two conserved transactivating domains have been defined within Erm and Er81: the N-terminal acidic domain and the region localised in the C-terminal tail of the proteins just downstream of the Ets domain (6, 7). Furthermore, both Erm and Er81 have been shown to be targets for signalling pathways through MAP kinases (7, 8), while Erm is activated by protein kinase A (8).

Although Erm transcriptional properties *in vitro*, as well as *erm* embryonic spatio-temporal expression (9, for a review, see 10) have been well characterised, little is known about the biological processes in which Erm could be involved. It has been proposed that they could contribute to the metastatic processes in particular in the cancers of the mammary gland (11, 12). The availability of a selective and tightly regulated Erm-inducible system would be helpful to further address the question of Erm role. Such a molecular tool is provided by the translational fusion of proteins to the ligand-binding domain of several nuclear receptors (13). As exemplified for the transcription factors Myc (14), Myb (15), Fos (16), Jun (17), v-Rel (18), p53 (19), MyoD (20) or NF-M (21), the chimeric proteins display a ligand-regulated activity, as they are usually inert without hormone while they become active in the presence of the appropriate ligand.

Following this strategy, we created an inducible version of Erm by fusing the ligand binding domain (ER) of the oestrogen receptor at the C-terminal end of the full-length Erm. Here we describe the basic properties of the resulting chimera ErmER. Our results demonstrate that ErmER transcriptional activity on *ets* sites is oestrogen-dependent. Furthermore, by using the pure steroidal anti-oestrogen EM-139 (22) we were able

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: delaunoi@infobiogen.fr. Fax: (int) 33 320 87 79 08.

to reduce ErmER basal activity, suggesting that the weak ErmER leakiness is due to a residual oestrogen-like activity from the culture medium. Taken together, our results define ErmER as a useful tool to clarify the biological role of Erm.

## MATERIALS AND METHODS

**Plasmids.** The Erm derivatives were expressed from expression vectors pTL1 and pCDNA3 (InVitrogen).

*erm* EcoRI cDNA sequence (4) was cloned into the EcoRI site of the pCDNA3. To construct the chimera ErmER, the stop codon within the EcoRI fragment of *erm* cDNA was replaced by a BamHI site using PCR with oligonucleotide 5'-GGGATCCCAAGCAAAGCC-TTCGGCATAGGGGAG-3' as antisense primer; the BamHI-SstI fragment derived from the HE14 construction (23) and containing the ER sequence was cloned in-frame with Erm modified sequence using the new BamHI site. The ErmER sequence was inserted into the EcoRI and SstI sites of the pTL1. It was inserted into the EcoRI and XhoI sites of the pCDNA3 plasmid by using an adaptor between the ER 3' end SstI site and the pCDNA3 XhoI site (Detailed information upon request).

The TORU-luc plasmid (8) was used as a reporter plasmid.

**Cell culture and transfection.** Human cervical carcinoma HeLa cells were grown at 37°C and in water-saturated 5% CO<sub>2</sub> atmosphere, in Dulbecco's modified medium (DMEM) supplemented with 10% foetal calf serum (Gibco BRL). These cells do not express the endogenous oestrogen receptor, as assessed by dose response experiments to an oestrogen treatment on cells transfected by a reporter plasmid containing an oestrogen responsive element (data not shown).

Transfection experiments were carried out in 6 well-plates using either optiMEM (Gibco BRL) or DMEM without red phenol (Gibco BRL) containing 4g/l glucose. Before transfection, cells grown at 50% confluence were washed twice (5 min and 1 h) in the corresponding transfection medium. Cells were then transfected for 5 h using 500 ng expression vector and 150 ng reporter plasmid in 1 µg total DNA and 10 µl lipofectamine (Gibco BRL) in 1ml transfection medium. Finally, transfection medium was replaced by fresh medium containing 17β-oestradiol (Sigma) or EM-139 (22) from 1000-fold concentrated stock solutions in ethanol at the concentration mentioned in the figure legends.

For the immunofluorescence analyses, cells were grown on 14mm coverslips before transfection.

**Luciferase assay.** Cells were lysed in 500 µl of Reporter Lysis Buffer (Promega) 24h to 48h after transfection. Cell extracts were analysed as described (6). The data presented here are the mean ± sem of at least 3 independent experiments.

**Immunoprecipitation.** Twenty four h after transfection, cells were starved for 1h in Met+Cys free MEM (ICN) and then labelled with 100µCi/ml (<sup>35</sup>S)Met+(<sup>35</sup>S)Cys (Amersham) for 3h in 0.5ml Met+Cys free medium. Cells were lysed and immunoprecipitations were performed as described (12), by using anti-Erm<sub>12-226</sub> (8) and anti-Erm<sub>355-510</sub> (12) antibodies.

**Immunofluorescence analysis.** All the following steps were separated by three PBS 1X washes at room temperature. Twenty four h after transfection, cells growing on 14mm coverslips were fixed in 4% paraformaldehyde PBS 1X for 15 min at room temperature, permeabilized with 0.25% Triton PBS 1X for 5 min at room temperature, and neutralised in PBS 1X containing 50 mM NH<sub>4</sub>Cl for 5 min at room temperature. Preparations were blocked in 2% foetal calf serum PBS 1X (blocking buffer) for 30 min at 4°C. The rabbit polyclonal anti-Erm<sub>12-226</sub> antibody raised against Erm (8) was applied at 1/500 dilution in blocking buffer for 60 min at 4°C. Preparations were washed 3 times in blocking buffer and incubated with 1/200 diluted mouse anti rabbit FITC conjugated antibody (Jackson) in blocking

buffer for 45 min at 4°C. Cell nuclei were then stained with Hoechst 33258 (Sigma) at 4 mg/l in PBS 1X for 5 min (data not shown). Cells were mounted in Moviol 4.88 (Sigma) containing 25 mg/ml 1,4-diazabicyclo(2.2.2)octane (Sigma) as an anti-bleed-through agent and examined at x63 magnification with a Zeiss Axiovert microscope equipped with epi-illumination.

## RESULTS AND DISCUSSION

### *ErmER Fusion Protein*

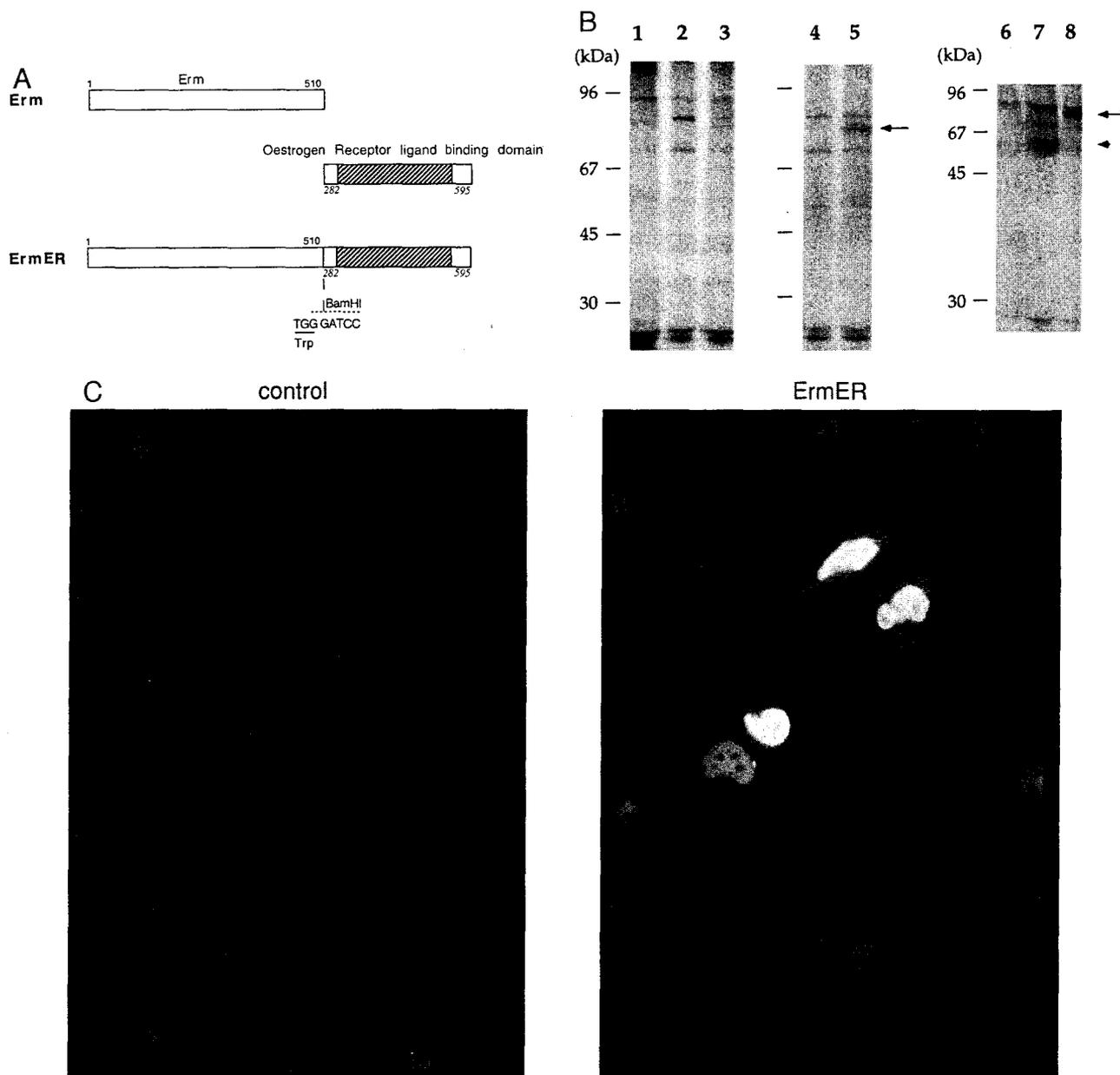
The hormone binding domain (ER) of the human oestrogen receptor HE0 (23) was fused to the C-terminus of the human Erm protein as shown in figure 1A. This chimeric fusion was cloned in two expression vectors: the pTL1 and the commercial pCDNA3 vectors. These constructions were efficiently expressed in rabbit reticulocyte lysates (data not shown), as well as in radiolabelled transiently transfected HeLa cells (fig. 1B). Figure 1B shows that HeLa cells appeared to be devoid of any detectable Erm, as no specific common band was revealed after immunoprecipitation using two different anti-Erm polyclonal antibodies, and SDS-PAGE analysis. In this cellular context, the proteins encoded by the constructions displayed the expected migration profile, i.e. 72kDa for Erm and 90kDa for ErmER, approximately. We next performed immunofluorescence analyses to investigate the subcellular location of the chimera upon oestrogen and anti-oestrogen treatments. Figure 1C shows the diffuse nuclear location of the ErmER chimera, as compared to the cells transfected by the empty vector (fig. 1C, control). This location was not affected by the presence of either 10<sup>-7</sup>M 17β-oestradiol or 10<sup>-7</sup>M EM-139 (data not shown) and was comparable to the Erm location already described (8).

### *ErmER Oestrogen-Dependent Transcriptional Activity*

The ability of ErmER to transactivate through an *ets* responsive element was tested by cotransfecting ErmER expression plasmids with the TORU-Luc reporter plasmid containing the well characterised *ets* responsive element derived from the polyoma virus enhancer (24).

All the pCDNA3 constructions were transfected in parallel. Figure 2A shows that the ErmER-mediated transactivation activity was hormonally induced in a dose-dependent manner, as compared to the luciferase reporter activity corresponding to cells transfected by the empty plasmid without 17β-oestradiol addition. At high concentration of 17β-oestradiol ErmER was as efficient as wild-type Erm. Similar results were obtained when using a reporter sequence derived from the LTR of the HTLV-1 virus (25) as an *ets* responsive element (data not shown).

We also tested oestrogen free controlled conditions by placing the cells in red phenol/serum free MEM for 20h after transfection. In this context, luciferase reporter activity due to endogenous transcriptional activ-



**FIG. 1.** ErmER fusion protein. **(A)** Schematic representation of ErmER fusion. The ligand-binding domain of the oestrogen receptor (hatched box) was fused to the full length Erm protein (empty box). The numbers indicate amino acid positions of the protein moieties. The translational fusion was made by using a BamHI site (see Materials and Methods section). The tryptophan mentioned (Trp) is at the Erm C-terminal amino acid position in place of the wild-type tyrosine. **(B)** Erm and ErmER expression in transiently transfected HeLa cells. Lanes 1-3, untransfected control HeLa cell extracts devoid of any detectable Erm. Lanes 4-8, HeLa cell extracts after transfection by: pTL1 (lane 4), pTL1-ErmER (lane 5), pCDNA3 (lane 6), pCDNA3-Erm (lane 7), pCDNA3-ErmER (lane 8); migration positions of the encoded proteins are indicated either by an arrow head for Erm or by an arrow for ErmER. Radiolabelled cell lysates were twice immunoprecipitated using two polyclonal antibodies raised against the N-terminal part, anti-Erm<sub>12-226</sub>, (lane 1) or the C-terminal part, anti-Erm<sub>355-510</sub>, (lanes 2-8) of Erm. In lane 3, immunoprecipitation was performed in the presence of 10  $\mu$ g of the corresponding antigen as described previously (12). The positions and sizes of the molecular weight standards are indicated at the left of each gel exposure. **(C)** Diffuse nuclear location of ErmER. HeLa cells transiently expressing ErmER were compared to HeLa cells transfected by the corresponding empty expression plasmid (control). Immunofluorescence analyses using anti-Erm<sub>12-226</sub> antibody were carried out 24h after transfection. The same location of ErmER chimera was observed after 10<sup>-7</sup>M 17 $\beta$ -oestradiol, 10<sup>-7</sup>M EM-139 or no hormonal treatment.

ity was 20-fold lower than in optiMEM conditions (data not shown) and ErmER transcriptional activity displayed a 14-fold induction upon 10<sup>-7</sup>M 17 $\beta$ -oestradiol addition (fig. 2B).

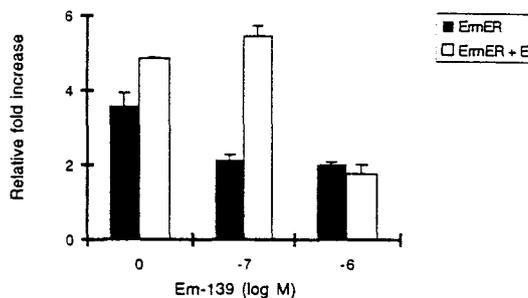
Thus, as for other proteins fused to the ligand-binding domain of a nuclear receptor (13), the function of Erm displayed an oestrogen dose-dependent inducible activity, upon its fusion to the ER domain.

### Anti-Oestrogen EM-139 Blocked ErmER Activity

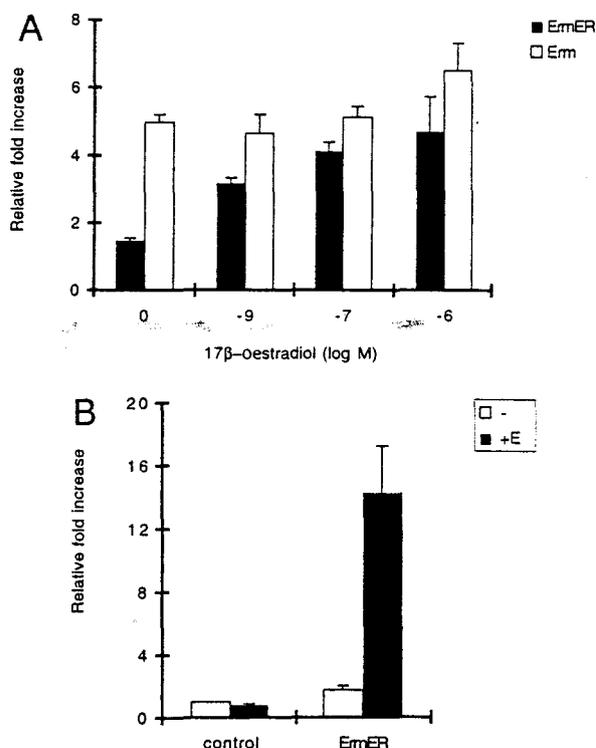
When using the pTL1-ErmER construction, we observed a significant basal (without  $17\beta$ -oestradiol addition) luciferase activity (fig. 3).

Such a leaky behaviour has been already described for other chimeric proteins using ER, as exemplified by TLS-CHOP-ER (26) or p53-ER (19). This basal activity can reflect a residual oestrogen-like activity from the culture medium and/or an intrinsic leakiness of the chimera.

In the case of ErmER, we wish to know whether its basal activity was under oestrogen control or not. To this end, we tested the effect of the anti-oestrogen EM-139 (22). Figure 3 shows that ErmER basal activity was reduced by the addition of  $10^{-7}$ M EM-139 while ErmER induction at  $10^{-7}$ M  $17\beta$ -oestradiol was not affected. Of note,  $10^{-6}$ M EM-139 fully antagonised



**FIG. 3.** Antagonistic action of EM-139 on ErmER transcriptional activity. Transfections were performed in optiMEM using pTL1 and pTL1-ErmER (ErmER) constructions.  $10^{-7}$ M  $17\beta$ -oestradiol (+E) and EM-139 anti-oestrogen at the mentioned concentrations were added 16h after transfection. Twenty-four hours later, the cells were harvested for luciferase assays. The fold-inductions are relative to the empty pTL1 values that did not show any significant differences upon hormonal treatment.



**FIG. 2.** Oestrogen dependent transcriptional activity of ErmER. **A)** Dose response of  $17\beta$ -oestradiol. pCDNA3-ErmER (ErmER) and pCDNA3-Erm (Erm) expression vectors were cotransfected with FORU-Luc reporter plasmid into HeLa cells using optiMEM medium.  $17\beta$ -oestradiol at the mentioned concentrations was added 16h after transfection. Twenty-four hours later, the cells were harvested for luciferase assays. The fold-inductions are relative to the empty pCDNA3 values that did not show any significant differences upon  $17\beta$ -oestradiol treatment. **(B)** ErmER transcriptional induction in oestrogen-free conditions. Transfection experiments were performed using pTL1 (control) and pTL1-ErmER (ErmER) plasmids in red phenol and serum free MEM. Twenty-four hours after transfection,  $10^{-7}$ M  $17\beta$ -oestradiol (+E) was added to the medium, and 20h later the cells were harvested for luciferase assays. The fold-inductions are relative to the control vector without hormone addition.

ErmER inducible activity. Thus, the antagonistic effect of EM-139 on ErmER transcriptional activity indicates that ErmER basal activity is, at least in part, due to a residual oestrogen-like activity from the culture medium. This conclusion was further strengthened by the fact that when using pCDNA3 constructions, the weak leakiness of ErmER was totally abolished in the presence of  $10^{-6}$ M EM-139 (data not shown).

Taken together, this demonstrates that the use of EM-139 could help setting up low basal activity condition for ErmER. Consequently, EM-139 will be useful to optimize the cell culture conditions imparting the on and off status to ErmER.

In conclusion, while many putative target genes have been proposed for the Ets factors, none of them were conclusively shown to be directly regulated as endogenous "resident" genes. Our results demonstrate that the fusion of Erm to the ligand-binding domain of the oestrogen receptor imparts oestrogen dependence to its activity. This defines ErmER as a molecular tool to address the biological functions of Erm. In particular, by combining the oestrogen induction of the chimera and the inhibition of the protein-neosynthesis, ErmER should allow the identification of Erm direct target within chromatin-embedded genes.

### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank P. Dhordain, C. Dozier, and J. Coll for their critical reading of this manuscript, T. Lufkind, M. Eilers, and F. Labrie for the gift of reagents. This work was supported by grants from the "Association pour la Recherche contre le Cancer" (France), the "Ligue contre le Cancer" (France), and the "Centre National de la Recherche Scientifique" (France).

### REFERENCES

- Lautenberger, J. A., Burdett, L. A., Gunnell, M. A., Qi, S., Watson, D. K., O'Brien, S. J., and Papas, T. S. (1992) *Oncogene* 7, 1713-1719.

2. Laudet, V., Niel, C., Duterque-Coquillaud, M., Leprince, D., and Stéhelin, D. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **190**, 8-14.
3. Xin, J. H., Cowie, A., Lachance, P., and Hassell, J. A. (1992) *Genes Dev.* **6**, 481-496.
4. Monté, D., Baert, J. L., Defossez, P. A., de Launoit, Y., and Stéhelin, D. (1994) *Oncogene* **9**, 1397-1406.
5. Brown, T. A., and McKnight, S. L. (1992) *Genes Dev.* **6**, 2502-2512.
6. Laget, M. P., Defossez, P. A., Albagli, O., Baert, J. L., Dewitte, F., Stéhelin, D., and de Launoit, Y. (1996) *Oncogene* **12**, 1325-1336.
7. Janknecht, R. (1996) *Mol. Cell. Biol.* **16**, 1550-1556.
8. Janknecht, R., Monte, D., Baert, J. L., and de Launoit, Y. (1996) *Oncogene* **13**, 1745-1754.
9. Chotteau, A., Desbiens, X., Pelczar, H., Defossez, P. A., and de Launoit, Y. (1997) *Oncogene* **15**, 937-952.
10. de Launoit, Y., Baert, J. L., Chotteau, A., Monte, D., Defossez, P. A., Coutte, L., Pelczar, H., and Leenders, F. (1997) *Biochem. Mol. Med.*, in press.
11. Kaya, M., Yoshida, K., Higashino, F., Mitaka, T., Ishii, S., and Fujinaga, K. (1996) *Oncogene* **12**, 221-227.
12. Baert, J. L., Monté, D., Musgrove, E. A., Albagli, O., Sutherland, R. L., and de Launoit, Y. (1997) *Int. J. Cancer* **70**, 590-597.
13. Mattioni, T., Louvion, J. F., and Picard, D. (1994) *Methods Cell Biol.* **335**-352.
14. Eilers, M., Picard, D., Yamamoto, K. R., and Bishop, J. M. (1989) *Nature* **340**, 66-68.
15. Burk, O., and Klempnauer, K. H. (1991) *EMBO J.* **10**, 3713-3719.
16. Superti-Furga, G., Bergers, G., Picard, D., and Busslinger, M. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 5114-5118.
17. Fialka, I., Schwarz, H., Reichmann, E., Oft, M., Busslinger, M., and Beug, H. (1996) *J. Cell Biol.* **132**, 1115-1132.
18. Boehmelt, G., Walker, A., Kabrun, N., Mellitzer, G., Beug, H., Zenke, M., and Enrietto, P. J. (1992) *EMBO J.* **11**, 4641-4652.
19. Roemer, K., and Friedman, T. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 9252-9256.
20. Hollenberger, S. M., Cheng, P. F., and Weintraub, H. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 8028-8032.
21. Muller, C., Kowenz-Leutz, E., Grieser-Ade, S., Graf, T., and Leutz, A. (1995) *EMBO J.* **14**, 6127-6135.
22. de Launoit, Y., Dauvois, S., Dufour, M., Simard, J., and Labrie, F. (1991) *Cancer Res.* **51**, 2797-2802.
23. Kumar, V., Green, S., Staub, A., and Chambon, P. (1986) *EMBO J.* **5**, 2231-2236.
24. Wasylyk, B., Wasylyk, C., Flores, P., Begue, A., Leprince, D., and Stéhelin, D. (1990) *Nature* **346**, 191-193.
25. Gegonne, A., Punyammalee, B., Rabault, B., Bosselut, R., Seneca, S., Crabeel, M., and Ghysdael, J. (1992) *New Biol.* **4**, 512-519.
26. Zinszner, H., Albalat, R., and Ron, D. (1994) *Genes Dev.* **8**, 2513-2526.

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Ces deux études illustrent deux approches différentes de la régulation spécifique de la transcription. Dans le cadre de la caractérisation de la régulation transcriptionnelle du gène *ICAM-1* nous avons été amenés à étudier un fragment de promoteur isolé. Nous avons montré le caractère fonctionnel du site ets situé en position -158 en amont du site d'initiation de la transcription de *ICAM-1*. Afin de disposer d'un système conditionnel d'expression de la protéine Erm, nous avons construit un mutant de Erm, ErmER, dont nous avons montré que les fonctions de facteur de transcription étaient placées sous le contrôle des oestrogènes.

### Régulation transcriptionnelle du gène *ICAM-1*

Les résultats concernant la régulation transcriptionnelle du gène humain *ICAM-1* constituent les premiers arguments en faveur d'une régulation directe de ce gène par des facteurs de transcription de type Ets : en effet, nous avons caractérisé en système cellulaire, l'influence de la mutation spécifique du site ets situé en position -158 dans le contexte du fragment -176 -44 du promoteur de ce gène. Vis-à-vis du niveau basal, ou de l'activation dépendante d'un facteur de transcription Ets, cette mutation entraîne la diminution de l'activité de transcription placée sous le contrôle des séquences définies.

Des résultats obtenus dans d'autres lignées cellulaires, confirment l'importance de ce site quant à l'activité transcriptionnelle basale de ce promoteur. Néanmoins, dans ces nouveaux contextes cellulaires, l'activation de la transcription dépendante de Erm semble indifférente à la mutation des sites -158 ou -138. Ces résultats suggèrent donc que les facteurs de transcription de la famille Ets pourraient intervenir directement mais aussi indirectement dans le cadre de l'activation de ce promoteur. De plus, dans ces mêmes cellules, il semble que l'expression ectopique de Erm suffise à augmenter l'expression endogène de la protéine *ICAM-1*. Ces résultats prometteurs permettent d'envisager l'étude de la régulation transcriptionnelle de

ICAM-1 dans le contexte du génome cellulaire pris dans sa totalité, que ce soit en système d'expression transitoire, ou stable, d'un facteur de transcription de la famille Ets.

Par ailleurs ces résultats s'intègrent à l'ensemble des données de caractérisation concernant le promoteur isolé de *ICAM-1*, dont la régulation transcriptionnelle est essentiellement étudiée en réponse à différentes cytokines du système immunitaire. En particulier, des sites de réponse au  $\text{TNF}\alpha$  (pour « tumor necrosis factor ») ou à l' $\text{IFN}\gamma$  (pour interféron) ont été étudiés dans le voisinage du site ets que nous avons caractérisé (voir Stratowa and Audette, 1995 pour une revue des travaux antécédents à 1995, Ledebur and Parks, 1995, Aoudjit *et al.*, 1997, et Paxton *et al.*, 1997 pour le site NF $\kappa$ -B -190 de réponse au  $\text{TNF}\alpha$ , Naik *et al.*, 1997 pour le site -116 de liaison à un facteur de type Stat-1 en réponse à l'interféron  $\gamma$ ). Nous avons observé qu'il n'y avait pas d'effet synergique entre les activations transcriptionnelles dépendantes d'une part des facteurs de transcription Ets et d'autre part des protéines c-Jun/c-Fos. L'étude des interactions éventuelles, entre les voies de signalisation des cytokines des réponses inflammatoire et immunitaire et l'expression d'un facteur de transcription Ets, précisera les modalités de la régulation du promoteur du gène *ICAM-1*. Elle pourrait, par ailleurs, permettre de caractériser des coopérations fonctionnelles nouvelles pour les facteurs de transcription de la famille Ets impliqués.

Vis-à-vis des expériences complémentaires concernant la régulation transcriptionnelle du gène *ICAM-1*, nous disposons, de plus, d'un système conditionnel d'expression de Erm, la protéine chimère ErmER, qui est un outil unique au regard des protéines de la famille Ets pour l'étude du caractère direct des régulations transcriptionnelles qu'elles contrôlent.

### **Un facteur de transcription inductible, ErmER**

Nous avons construit des vecteurs plasmidiques permettant l'expression en système cellulaire d'une version conditionnelle de la protéine Erm, ErmER. Par le biais de la fusion traductionnelle au domaine de liaison du ligand du récepteur humain aux oestrogènes, les propriétés d'activateur de la transcription de la protéine humaine Erm ont été placées sous le

contrôle des oestrogènes. Ces constructions définissent la première version inductible d'un facteur de transcription de la famille Ets, au moyen d'un contrôle exercé au niveau post-traductionnel.

*- les statuts activé et inactivé de la chimère ErmER*

Le différentiel entre l'état activé et l'état non activé définit un des paramètres importants des systèmes inductibles. Dans le cadre de la caractérisation moléculaire fonctionnelle de la chimère ErmER, nous avons cherché à déterminer si toute l'activité transactivatrice de ErmER était placée sous le contrôle des oestrogènes. Nous avons ainsi montré que dans les conditions de culture utilisées, l'activité transactivatrice basale de la chimère ErmER était liée à une activité oestrogénique résiduelle du milieu de culture et non pas à un contrôle partiel exercé par le DLH du récepteur aux oestrogènes.

La difficulté que nous avons rencontrée à établir des lignées cellulaires exprimant de manière stable la chimère ErmER révèle sans doute l'importance de la mise au point des conditions de culture permettant un contrôle efficace des fonctions de Erm en absence d'hormone. En effet, nous maintenons les cellules dans un milieu contenant une activité oestrogénique provenant du sérum de veau fœtal complet ou épuisé sur charbon. Dans les premières expériences réalisées en présence de sérum de veau complet aucun clone cellulaire sélectionné pour la présence du vecteur d'expression n'exprimait la protéine chimérique ErmER ni le transcrit qui la code. La caractérisation de clones cellulaires sélectionnés en présence de sérum de veau fœtal épuisé sur charbon actif est en cours. Nous envisageons de procéder à une sélection des clones cellulaires en présence de l'anti-oestrogène pur, EM-139, dont nous avons montré l'effet antagoniste vis-à-vis des propriétés de transactivation de la chimère.

Par ailleurs, nous comptons caractériser plus en détail l'action de l'EM-139 vis-à-vis de la chimère. Selon sa structure biochimique, l'EM-139 est à rapprocher de l'ICI qui a été présenté au cours de l'introduction de ce mémoire. L'ICI est un anti-oestrogène pur dont on peut penser

qu'il stabilise le récepteur aux oestrogènes sauvage dans une des conformations les plus proches de son état inactif (vis-à-vis de la transcription) (McDonnell *et al.*, 1995). Il semble donc intéressant de caractériser les propriétés de la chimère en présence d'un anti-oestrogène pur, selon l'hypothèse d'une stabilisation de la chimère dans une conformation qui la convertirait en présence d'anti-oestrogène en une protéine transcriptionnellement inactive aux propriétés dominantes vis-à-vis de la protéine Erm sauvage. Ces tests pourront s'établir en transfection transitoire en étudiant l'effet de la co-transfection de Erm et de ErmER sur la transactivation dépendante de sites ets.

Nous avons établi que les fonctions de transactivation de la chimère ErmER sont inductibles en présence d'oestrogènes, selon une réponse dépendante de la quantité d'oestrogènes. Cette propriété définit un autre atout de ce type de système inductible. Par opposition aux contrôles de type noir/blanc, le contrôle exercé par les DLH donne accès à une régulation de type quantitatif vis-à-vis des fonctions qu'ils régulent. Cette propriété que Erm partage avec les récepteurs nucléaires est d'ailleurs utilisée dans un système d'expression conditionnel qui est lui établi au niveau transcriptionnel et qui utilise le récepteur à l'ecdysone (No *et al.*, 1996).

L'ensemble de ces résultats devrait permettre de définir plus précisément les limites techniques de l'outil que nous avons construit, vis-à-vis de ses propriétés à activer (en présence d'oestrogènes), ou à entrer en compétition (en présence d'un anti-oestrogène pur) avec, la transcription dépendante de site ets.

#### *- Les perspectives de l'application de l'outil chimère*

L'autre orientation que prendra ce travail concerne l'utilisation de l'outil ErmER en système cellulaire d'expression stable de la chimère. Les systèmes conditionnels ont deux types d'avantage sur les systèmes constitutifs d'expression. Ils autorisent l'approche de fonctions

contre-sélectionnées par une expression constitutive. Ils permettent l'établissement d'un différentiel d'expression « propre », puisque l'histoire des populations de cellules comparées ne se différencie qu'après l'induction de l'expression. Disposer d'un système inductible d'expression établi au niveau post-traductionnel, par rapport à un contrôle transcriptionnel, c'est avoir accès au caractère direct des régulations observées. Dans le cas des facteurs de transcription, c'est donc le seul type d'outil qui permet de définir des gènes cibles dont l'expression est activée au niveau transcriptionnel de manière directe (par opposition à une activation secondaire qui nécessiterait l'intervention d'une étape de néosynthèse protéique).

La recherche et l'identification des gènes cibles de Erm tirera partie de deux approches expérimentales d'étude de cellules exprimant de façon stable la chimère ErmER. D'une part, une recherche sans *a priori* permettant la sélection d'ADNc correspondant à des ARN messagers dont l'expression est spécifiquement induite ou spécifiquement éteinte en réponse au traitement hormonal. Et d'autre part, l'étude de la régulation transcriptionnelle de gènes déjà identifiés dans le cadre, notamment, d'études menés sur des fragments de promoteurs isolés, comme des gènes cibles potentiels de facteurs de transcription de la famille Ets. A ce titre, le gène *ICAM-1* est un candidat de choix.

Les études classiques de la régulation transcriptionnelle permettent rarement de restreindre la régulation observée à un seul membre de la famille Ets (voir, pour une revue, Ghysdael and Boureux, 1997). Pour aborder la question de la spécificité fonctionnelle des protéines du groupe PEA3, nous avons réalisé et caractérisé une chimère Er81ER construite sur le même schéma que celui de ErmER. Au limite des systèmes d'expression près, l'étude en parallèle des chimères ErmER et ER81ER permettra éventuellement de dégager des spécificités fonctionnelles entre Erm et Er81, dans le cadre de la régulation spécifique de la transcription ou plus généralement vis-à-vis du contrôle de fonctions cellulaires. En effet, en dehors des aspects moléculaires, ces chimères constituent un outil de choix pour approcher les fonctions biologiques à la réalisation desquelles Erm et Er81 participent.

## REFERENCES

- Albagli O**, Analyse phylogénétique et fonctionnelle des domaines transactivateurs N-terminaux des onco-protéines p68-c-Ets1 et p58-c-Ets2 : caractérisation d'un motif conservé essentiel et modèle d'évolution. Mémoire de thèse de doctorat en Sciences de la Vie et de la Santé de l'université Pierre et Marie Curie-Paris VI, soutenue le 7 novembre 1995.
- Alexandrow MG, Kawabata M, Aakre M & Moses HL**. 1995. Overexpression of the c-Myc oncoprotein blocks the growth-inhibitory response but is required for the mitogenic effects of transforming growth factor beta 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **92**: 3239-43.
- Aoudjit F, Brochu N, Belanger B, Stratowa C, Hiscott J & Audette M**. 1997. Regulation of intercellular adhesion molecule-1 gene by tumor necrosis factor-alpha is mediated by the nuclear factor-kappaB heterodimers p65/p65 and p65/c-Rel in the absence of p50. *Cell Growth Differ*. **8**: 335-42.
- Ashburner M**. 1974. Sequential gene activation by ecdysone in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. II. The effects of inhibitors of protein synthesis. *Dev Biol*. **39**: 141-57.
- Baert JL, Monté D, Musgrove EA, Albagli O, Sutherland RL & de Launoit Y**. 1997. Expression of the PEA3 group of Ets-related transcription factors in human breast cancer cells. *Int. J. Cancer*. **70**: 590-597.
- Bailly RA, Bosselut R, Zucman J, Cormier F, Delattre O, Roussel M, Thomas G & Ghysdael J**. 1994. DNA-binding and transcriptional activation properties of the EWS-FLI-1 fusion protein resulting from the t(11;22) translocation in Ewing Sarcoma. *Mol Cell Biol*. **14**: 3230-41.
- Barber DL, DeMartino JC, Showers MO & D'Andrea AD**. 1994. A dominant negative erythropoietin (EPO) receptor inhibits EPO- dependent growth and blocks F-gp55-dependent transformation. *Mol Cell Biol*. **14**: 2257-65.
- Beato M, Herrlich P & Schutz G**. 1995. Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell*. **83**: 851-7.
- Ben David Y & Bernstein A**. 1991b. Friend virus-induced erythroleukemia and the multistage nature of cancer. *Cell*. **66**: 831-4.
- Ben David Y, Giddens EB & Bernstein A**. 1990a. Identification and mapping of a common proviral integration site Fli-1 in erythroleukemia cells induced by Friend murine leukemia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **87**: 1332-6.
- Ben David Y, Giddens EB, Letwin K & Bernstein A**. 1991a. Erythroleukemia induction by Friend murine leukemia virus: insertional activation of a new member of the ets gene family, Fli-1, closely linked to c-ets-1. *Genes Dev*. **5**: 908-18.

- Ben David Y, Lavigueur A, Cheong GY & Bernstein A.** 1990b. Insertional inactivation of the p53 gene during friend leukemia: a new strategy for identifying tumor suppressor genes. *New Biol.* **2**: 1015-23.
- Bergers G, Reikerstorfer A, Braselmann S, Graninger P & Busslinger M.** 1994. Alternative promoter usage of the Fos-responsive gene Fit-1 generates mRNA isoforms coding for either secreted or membrane-bound proteins related to the IL-1 receptor. *Embo J.* **13**: 1176-88.
- Berry M, Metzger D & Chambon P.** 1990. Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promoter-context dependent agonistic activity of the anti-oestrogen 4-hydroxytamoxifen. *Embo J.* **9**: 2811-8.
- Bertolotti A, Lutz Y, Heard DJ, Chambon P & Tora L.** 1996. hTAF(II)68, a novel RNA/ssDNA-binding protein with homology to the pro-oncoproteins TLS/FUS and EWS is associated with both TFIID and RNA polymerase II. *Embo J.* **15**: 5022-31.
- Boehmelt G, Madruga J, Dorfler P, Briegel K, Schwarz H, Enrietto PJ & Zenke M.** 1995. Dendritic cell progenitor is transformed by a conditional v-Rel estrogen receptor fusion protein v-RelER. *Cell.* **80**: 341-52.
- Boehmelt G, Walker A, Kabrun N, Mellitzer G, Beug H, Zenke M & Enrietto PJ.** 1992. Hormone-regulated v-rel estrogen receptor fusion protein: reversible induction of cell transformation and cellular gene expression. *Embo J.* **11**: 4641-52.
- Bosselut R, Duvall JF, Gégonne A, Bailly M, Hémar A, Brady J & Ghysdael J.** 1990. The product of the c-ets1 proto-oncogene and the related Ets2 protein act as transcriptional activators of the long terminal repeat of human T cell leukemia virus HTLV-1. *EMBO J.* **9**: 3137-44.
- Boulukos KE, Pognonec P, Begue A, Galibert F, Gesquiere JC, Stehelin D & Ghysdael J.** 1988. Identification in chickens of an evolutionarily conserved cellular ets-2 gene (c-ets-2) encoding nuclear proteins related to the products of the c-ets proto-oncogene. *Embo J.* **7**: 697-705.
- Braun BS, Frieden R, Lessnick SL, May W & Denny CT.** 1995. Identification of target genes for the Ewing's sarcoma EWS/FLI fusion protein by representational difference analysis. *Mol Cell Biol.* **15**: 4623-30.
- Bresnick EH, Dalman FC, Sanchez ER & Pratt WB.** 1989. Evidence that the 90-kDa heat shock protein is necessary for the steroid binding conformation of the L cell glucocorticoid receptor. *J Biol Chem.* **264**: 4992-7.
- Briegel K, Bartunek P, Stengl G, Lim KC, Beug H, Engel JD & Zenke M.** 1996. Regulation and function of transcription factor GATA-1 during red blood cell differentiation. *Development.* **122**: 3839-50.
- Brown TA & McKnight SL.** 1992. Specificities of protein-protein and protein-DNA interaction of GABP alpha and two newly defined ets-related proteins. *Genes Dev.* **6**: 2502-12.

**Buijs A, Sherr S, van BS, van BS, van, der, Plas, D, Geurts, van, Kessel, A., Riegman P, Lekanne DR, Zwarthoff E, Hagemeijer A & et al.** 1995. Translocation (12;22) (p13;q11) in myeloproliferative disorders results in fusion of the ETS-like TEL gene on 12p13 to the MN1 gene on 22q11 [published erratum appears in *Oncogene* 1995 Aug 17;11(4):809]. *Oncogene*. **10**: 1511-9.

**Burk O & Klempnauer KH.** 1991. Estrogen-dependent alterations in differentiation state of myeloid cells caused by a v-myb/estrogen receptor fusion protein. *Embo J*. **10**: 3713-9.

**Calvio C, Neubauer G, Mann M & Lamond AI.** 1995. Identification of hnRNP P2 as TLS/FUS using electrospray mass spectrometry. *Rna*. **1**: 724-33.

**Carroll M, Tomasson MH, Barker GF, Golub TR & Gilliland DG.** 1996. The TEL/platelet-derived growth factor beta receptor (PDGF beta R) fusion in chronic myelomonocytic leukemia is a transforming protein that self-associates and activates PDGF beta R kinase-dependent signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **93**: 14845-50.

**Chabot B, Blanchette M, Lapierre I & La Branche H.** 1997. An intron element modulating 5' splice site selection in the hnRNP A1 pre-mRNA interacts with hnRNP A1. *Mol Cell Biol*. **17**: 1776-86.

**Chang CH, Scott GK, Kuo WL, Xiong X, Suzdaltseva Y, Park JW, Sayre P, Erny K, Collins C, Gray JW & Benz CC.** 1997. ESX: a structurally unique Ets overexpressed early during human breast tumorigenesis [In Process Citation]. *Oncogene*. **14**: 1617-22.

**Chen T, Bunting M, Karim FD & Thummel CS.** 1992. Isolation and characterization of five *Drosophila* genes that encode an ets-related DNA binding domain. *Dev Biol*. **151**: 176-91.

**Chotteau-Lelievre A, Desbiens X, Pelczar H, Defosse PA & de Launoit Y.** 1997. Differential expression patterns of the PEA3 group transcription factors through murine embryonic development. *Oncogene*. **15**: 937-52.

**Christopherson KS, Mark MR, Bajaj V & Godowski PJ.** 1992. Ecdysteroid-dependent regulation of genes in mammalian cells by a *Drosophila* ecdysone receptor and chimeric transactivators. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **89**: 6314-8.

**Clark SP & Mak TW.** 1983. Complete nucleotide sequence of an infectious clone of Friend spleen focus-forming provirus: gp55 is an envelope fusion glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **80**: 5037-41.

**Crozat A, Aman P, Mandahl N & Ron D.** 1993. Fusion of CHOP to a novel RNA-binding protein in human myxoid liposarcoma. *Nature*. **363**: 640-4.

**Dalton S & Treisman R.** 1992. Characterization of SAP-1, a protein recruited by serum response factor to the c-fos serum response element. *Cell*. **68**: 597-612.

**Danielian PS, White R, Lees JA & Parker MG.** 1992. Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors [published erratum appears in *EMBO J* 1992 Jun;11(6):2366]. *Embo J*. **11**: 1025-33.

- de Launoit Y, Baert JL, Chotteau A, Monte D, Defossez PA, Coutte L, Pelczar H & Leenders F.** 1997. Structure-function relationships of the PEA3 group of Ets-related transcription factors. *Biochem Mol Med.* **61:** 127-35.
- Defossez PA, Baert JL, Monnot M & de Launoit Y.** 1998. The ETS family member ERM contains an alpha helical acidic transactivation domain that contacts TAFII60. *Nucleic Acid Res.* **in press:**
- Degnan BM, Degnan SM, Naganuma T & Morse DE.** 1993. The ets multigene family is conserved throughout the Metazoa. *Nucleic Acids Res.* **21:** 3479-84.
- Delattre O, Zucman J, Plougastel B, Desmaze C, Melot T, Peter M, Kovar H, Joubert I, de Jong P, Rouleau G, Aurias A & Thomas G.** 1992. Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumors. *Nature.* **359:** 162-5.
- Diamond MS & Springer TA.** 1994. The dynamic regulation of integrin adhesiveness. *Curr Biol.* **4:** 506-17.
- Dickson B.** 1995. Nuclear factors in sevenless signalling. *Trends Genet.* **11:** 106-111.
- Eilers M, Picard D, Yamamoto KR & Bishop JM.** 1989. Chimaeras of myc oncoprotein and steroid receptors cause hormone-dependent transformation of cells. *Nature.* **340:** 66-8.
- Engelke U, Wang DM & Lipsick JS.** 1997. Cells transformed by a v-Myb-estrogen receptor fusion differentiate into multinucleated giant cells. *J Virol.* **71:** 3760-6.
- Evans RM.** 1988. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science.* **240:** 889-95.
- Fankhauser CP, Briand PA & Picard D.** 1994. The hormone binding domain of the mineralocorticoid receptor can regulate heterologous activities in cis. *Biochem Biophys Res Commun.* **200:** 195-201.
- Fialka I, Schwarz H, Reichmann E, Oft M, Busslinger M & Beug H.** 1996. The estrogen-dependent c-JunER protein causes a reversible loss of mammary epithelial cell polarity involving a destabilization of adherens junctions. *J Cell Biol.* **132:** 1115-32.
- Francis MK, Phinney DG & Ryder K.** 1995. Analysis of the hormone-dependent regulation of a JunD-estrogen receptor chimera. *J Biol Chem.* **270:** 11502-13.
- Fridell R, Truant R, Thorne L, Benson R & Cullen B.** 1997. Nuclear import of hnRNP A1 is mediated by a novel cellular cofactor related to karyopherin-ss [In Process Citation]. *J Cell Sci.* 1325-31.
- Friedrich R, Friedrich U & Maennle G.** 1991. Construction and properties of an "artificial" spleen focus-forming virus. *Virology.* **183:** 343-50.
- Gegonne A, Bosselut R, Bailly RA & Ghysdael J.** 1993. Synergistic activation of the HTLV-1 LTR Ets-responsive region by transcription factors Ets-1 and Sp1. *EMBO J.* **12:** 1169-78.

**Ghysdael J & Boureux A.** 1997. The ETS family of transcriptional regulators. In *Oncogenes as transcriptional regulators*, pp. 29-88. Edited by M. Yaniv & J. Ghysdael. Switzerland: Birkhäuser Verlag Basel.

**Giguere V, Hollenberg SM, Rosenfeld MG & Evans RM.** 1986. Functional domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell*. **46**: 645-52.

**Giovane A, Pintzas A, Maira SM, Sobieszczuk P & Wasyluk B.** 1994. Net, a new *ets* transcription factor that is activated by Ras. *Genes Dev*. **8**: 1502-13.

**Godowski PJ, Picard D & Yamamoto KR.** 1988. Signal transduction and transcriptional regulation by glucocorticoid receptor-LexA fusion proteins. *Science*. **241**: 812-6.

**Godowski PJ, Rusconi S, Miesfeld R & Yamamoto KR.** 1987. Glucocorticoid receptor mutants that are constitutive activators of transcriptional enhancement [published erratum appears in *Nature* 1987 Mar 5-11;326(6108):105]. *Nature*. **325**: 365-8.

**Goebel MK.** 1990. The PU.1 transcription factor is the product of the putative oncogene Spi-1 [comment]. *Cell*. **61**: 1165-6.

**Golay J, Introna M & Graf T.** 1988. A single point mutation in the *v-ets* oncogene affects both erythroid and myelomonocytic cell differentiation. *Cell*. **55**: 1147-58.

**Golub TR, Barker GF, Bohlander SK, Hiebert SW, Ward DC, Bray WP, Morgan E, Raimondi SC, Rowley JD & Gilliland DG.** 1995. Fusion of the TEL gene on 12p13 to the AML1 gene on 21q22 in acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **92**: 4917-21.

**Golub TR, Barker GF, Lovett M & Gilliland DG.** 1994. Fusion of PDGF receptor beta to a novel *ets*-like gene, *tel*, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation. *Cell*. **77**: 307-16.

**Golub TR, Goga A, Barker GF, Afar DE, McLaughlin J, Bohlander SK, Rowley JD, Witte ON & Gilliland DG.** 1996. Oligomerization of the ABL tyrosine kinase by the Ets protein TEL in human leukemia. *Mol Cell Biol*. **16**: 4107-16.

**Grandori C, Mac J, Siebelt F, Ayer DE & Eisenman RN.** 1996. Myc-Max heterodimers activate a DEAD box gene and interact with multiple E box-related sites in vivo. *Embo J*. **15**: 4344-57.

**Green S & Chambon P.** 1987. Oestradiol induction of a glucocorticoid-responsive gene by a chimaeric receptor. *Nature*. **325**: 75-8.

**Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P & Chambon P.** 1986. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to *v-erb-A*. *Nature*. **320**: 134-9.

**Gugneja S, Virbasius JV & Scarpulla RC.** 1995. Four structurally distinct, non-DNA-binding subunits of human nuclear respiratory factor 2 share a conserved transcriptional activation domain. *Mol Cell Biol*. **15**: 102-11.

- Gunther CV, Nye JA, Bryner RS & Graves BJ.** 1990. Sequence-specific DNA binding of the proto-oncoprotein ets-1 defines a transcriptional activator sequence within the long terminal repeat of the Moloney murine sarcoma virus. *Genes and Development.* **4:** 667-79.
- Hennig G, Behrens J, Truss M, Frisch S, Reichmann E & Birchmeier W.** 1995. Progression of carcinoma cells is associated with alterations in chromatin structure and factor binding at the E-cadherin promoter in vivo. *Oncogene.* **11:** 475-84.
- Higashino F, Yoshida K, Fujinaga Y, Kamio K & Fujinaga K.** 1993. Isolation of a cDNA encoding the adenovirus E1A enhancer binding protein: a new human member of the ets oncogene family. *Nucleic Acids Res.* **21:** 547-53.
- Hipskind RA, Rao VN, Mueller CG, Reddy ES & Nordheim A.** 1991. Ets-related protein Elk-1 is homologous to the c-fos regulatory factor p62TCF. *Nature.* **354:** 531-4.
- Ho IC, Bhat NK, Gottschalk LR, Lindsten T, Thompson CB, Papas TS & Leiden JM.** 1990. Sequence-specific binding of human Ets-1 to the T cell receptor alpha gene enhancer. *Science.* **250:** 814-8.
- Ho IC & Leiden JM.** 1990. The T alpha 2 nuclear protein binding site from the human T cell receptor alpha enhancer functions as both a T cell-specific transcriptional activator and repressor. *J Exp Med.* **172:** 1443-9.
- Hoatlin ME, Kozak SL, Lilly F, Chakraborti A, Kozak CA & Kabat D.** 1990. Activation of erythropoietin receptors by Friend viral gp55 and by erythropoietin and down-modulation by the murine Fv-2r resistance gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **87:** 9985-9.
- Hollenberg SM, Cheng PF & Weintraub H.** 1993. Use of a conditional MyoD transcription factor in studies of MyoD trans-activation and muscle determination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90:** 8028-32.
- Hollenberg SM & Evans RM.** 1988. Multiple and cooperative trans-activation domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell.* **55:** 899-906.
- Hollenberg SM, Weinberger C, Ong ES, Cerelli G, Oro A, Lebo R, Thompson EB, Rosenfeld MG & Evans RM.** 1985. Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature.* **318:** 635-41.
- Horwitz KB, Jackson TA, Bain DL, Richer JK, Takimoto GS & Tung L.** 1996. Nuclear receptor coactivators and corepressors. *Mol Endocrinol.* **10:** 1167-77.
- Howard JC, Yousefi S, Cheong G, Bernstein A & Ben David Y.** 1993. Temporal order and functional analysis of mutations within the Fli-1 and p53 genes during the erythroleukemias induced by F-MuLV. *Oncogene.* **8:** 2721-9.
- Husain M, Bein K, Jiang L, Alper SL, Simons M & Rosenberg RD.** 1997. c-Myb-dependent cell cycle progression and Ca<sup>2+</sup> storage in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* **80:** 617-26.

- Ichikawa H, Shimizu K, Hayashi Y & Ohki M.** 1994. An RNA-binding protein gene, TLS/FUS, is fused to ERG in human myeloid leukemia with t(16;21) chromosomal translocation. *Cancer Res.* **54**: 2865-8.
- Immanuel D, Zinszner H & Ron D.** 1995. Association of SARFH (sarcoma-associated RNA-binding fly homolog) with regions of chromatin transcribed by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol.* **15**: 4562-71.
- Izaurrealde E, Jarmolowski A, Beisel C, Mattaj IW, Dreyfuss G & Fischer U.** 1997. A role for the M9 transport signal of hnRNP A1 in mRNA nuclear export. *J Cell Biol.* **137**: 27-35.
- Jackson P, Baltimore D & Picard D.** 1993. Hormone-conditional transformation by fusion proteins of c-Abl and its transforming variants. *Embo J.* **12**: 2809-19.
- Jackson TA, Richer JK, Bain DL, Takimoto GS, Tung L & Horwitz KB.** 1997. The partial agonist activity of antagonist-occupied steroid receptors is controlled by a novel hinge domain-binding coactivator L7/SPA and the corepressors N-CoR or SMRT. *Mol Endocrinol.* **11**: 693-705.
- Janknecht R.** 1996. Analysis of the ERK-stimulated ETS transcription factor ER81. *Mol Cell Biol.* **16**: 1550-6.
- Janknecht R, Monte D, Baert JL & de Launoit Y.** 1996. The ETS-related transcription factor ERM is a nuclear target of signaling cascades involving MAPK and PKA. *Oncogene.* **13**: 1745-54.
- Jeon IS, Davis JN, Braun BS, Sublett JE, Roussel MF, Denny CT & Shapiro DN.** 1995. A variant Ewing's sarcoma translocation (7;22) fuses the EWS gene to the ETS gene ETV1. *Oncogene.* **10**: 1229-34.
- Johnson JP, Stade BG, Holzmann B, Schwable W & Riethmuller G.** 1989. De novo expression of intercellular-adhesion molecule 1 in melanoma correlates with increased risk of metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **86**: 641-4.
- Jooss KU & Muller R.** 1995. Deregulation of genes encoding microfilament-associated proteins during Fos-induced morphological transformation. *Oncogene.* **10**: 603-8.
- Jousset C, Carron C, Boureux A, Quang CT, Oury C, Dusanter FI, Charon M, Levin J, Bernard O & Ghysdael J.** 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. *Embo J.* **16**: 69-82.
- Kaneko Y, Yoshida K, Handa M, Toyoda Y, Nishihira H, Tanaka Y, Sasaki Y, Ishida S, Higashino F & Jujinaga K.** 1996. Fusion of an ETS-family gene, E1A-F, to EWS by t(17;22)(q12;q12) chromosome translocation in an undifferentiated sarcoma of infancy. *Genes Chrom. Cancer.* **15**: 115-21.
- Kastner P, Mark M & Chambon P.** 1995. Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic studies telling us about their role in real life? *Cell.* **83**: 859-69.

- Kaya M, Yoshida K, Higashino F, Mitaka T, Ishii S & Fujinaga K.** 1996. A single ets-related transcription factor, E1AF, confers invasive phenotype on human cancer cells. *Oncogene*. **12**: 221-7.
- Kempkes B, Spitkovsky D, Jansen DP, Ellwart JW, Kremmer E, Delecluse HJ, Rottenberger C, Bornkamm GW & Hammerschmidt W.** 1995. B-cell proliferation and induction of early G1-regulating proteins by Epstein-Barr virus mutants conditional for EBNA2. *Embo J*. **14**: 88-96.
- Kempkes B, Zimmer SU, Eissner G, Pawlita M, Falk M, Hammerschmidt W & Bornkamm GW.** 1996. Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 (EBNA2)-oestrogen receptor fusion proteins complement the EBNA2-deficient Epstein-Barr virus strain P3HR1 in transformation of primary B cells but suppress growth of human B cell lymphoma lines. *J Gen Virol*. 227-37.
- Kerkhoff E & Rapp UR.** 1997. Induction of cell proliferation in quiescent NIH 3T3 cells by oncogenic c-Raf-1. *Mol Cell Biol*. **17**: 2576-86.
- Klemsz M, Hromas R, Raskind W, Bruno E & Hoffman R.** 1994. PE-1, a novel ETS oncogene family member, localizes to chromosome 1q21- q23. *Genomics*. **20**: 291-4.
- Klemsz MJ, McKercher SR, Celada A, Van Beveren C & Maki RA.** 1990. The macrophage and B cell-specific transcription factor PU.1 is related to the ets oncogene [see comments]. *Cell*. **61**: 113-24.
- Kodandapani R, Pio F, Ni CZ, Piccialli G, Klemsz M, McKercher S, Maki RA & Ely KR.** 1996. A new pattern for helix-turn-helix recognition revealed by the PU.1 ETS- domain-DNA complex. *Nature*. **380**: 456-60.
- Kolanus W, Nagel W, Schiller B, Zeitlmann L, Godar S, Stockinger H & Seed B.** 1996. Alpha L beta 2 integrin/LFA-1 binding to ICAM-1 induced by cytohesin-1, a cytoplasmic regulatory molecule. *Cell*. **86**: 233-42.
- Kolm PJ & Sive HL.** 1995. Efficient hormone-inducible protein function in *Xenopus laevis*. *Dev Biol*. **171**: 267-72.
- Kovar H, Aryee DN, Jug G, Henockl C, Schemper M, Delattre O, Thomas G & Gardner H.** 1996. EWS/FLI-1 antagonists induce growth inhibition of Ewing tumor cells in vitro. *Cell Growth Differ*. **7**: 429-37.
- Krust A, Green S, Argos P, Kumar V, Walter P, Bornert JM & Chambon P.** 1986. The chicken oestrogen receptor sequence: homology with v-erbA and the human oestrogen and glucocorticoid receptors. *Embo J*. **5**: 891-7.
- Kumar V & Chambon P.** 1988. The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer. *Cell*. **55**: 145-56.
- Kumar V, Green S, Stack G, Berry M, Jin JR & Chambon P.** 1987. Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell*. **51**: 941-51.
- Kumar V, Green S, Staub A & Chambon P.** 1986. Localisation of the oestradiol-binding and putative DNA-binding domains of the human oestrogen receptor. *Embo J*. **5**: 2231-6.

**Labelle Y & Delattre O.** 1997. Chromosome translocations generating chimeric transcription factors, unique genetic events with pleiotropic cellular consequences. In *Oncogenes as transcriptional regulators*, pp. 77-105. Edited by M. Yaniv & J. Ghysdael. Switzerland: Birkhäuser Verlag Basel.

**Ladanyi M & Gerald W.** 1994. Fusion of the EWS and WT1 genes in the desmoplastic small round cell tumor. *Cancer Res.* **54**: 2837-40.

**Laget MP,** Caractérisation d'un membre de la famille Ets, le facteur de transcription Erm : propriétés de liaison à l'ADN et pouvoir transactivateur. Mémoire de thèse de doctorat en Sciences de la Vie et de la Santé de l'université de Lille I, soutenue le 24 octobre 1995.

**Laget MP, Defossez PA, Albagli O, Baert JL, Dewitte F, Stehelin D & de Launoit Y.** 1996. Two functionally distinct domains responsible for transactivation by the Ets family member ERM. *Oncogene.* **12**: 1325-36.

**Lai ZC & Rubin GM.** 1992. Negative control of photoreceptor development in *Drosophila* by the product of the yan gene, an ETS domain protein. *Cell.* **70**: 609-20.

**LaMarco K, Thompson CC, Byers BP, Walton EM & McKnight SL.** 1991. Identification of Ets- and notch-related subunits in GA binding protein [see comments]. *Science.* **253**: 789-92.

**Larcher C, Kempkes B, Kremmer E, Prodinger WM, Pawlita M, Bornkamm GW & Dierich MP.** 1995. Expression of Epstein-Barr virus nuclear antigen-2 (EBNA2) induces CD21/CR2 on B and T cell lines and shedding of soluble CD21. *Eur J Immunol.* **25**: 1713-9.

**Lavigne A & Bernstein A.** 1991. p53 transgenic mice: accelerated erythroleukemia induction by Friend virus. *Oncogene.* **6**: 2197-201.

**Ledebur HC & Parks TP.** 1995. Transcriptional regulation of the intercellular adhesion molecule-1 gene by inflammatory cytokines in human endothelial cells. Essential roles of a variant NF-kappa B site and p65 homodimers. *J Biol Chem.* **270**: 933-43.

**Leprince D, Duterque-Coquillaud M, Li RP, Henry C, Flourens A, Debuire B & Stehelin D.** 1988. Alternative splicing within the chicken c-ets-1 locus: implications for transduction within the E26 retrovirus of the c-ets proto-oncogene. *J Virol.* **62**: 3233-41.

**Leprince D, Geronne A, Coll J, De Taisne C, Schneeberger A, Lagrou C & Stehelin D.** 1983. A putative second cell-derived oncogene of the avian leukemia virus E26. *Nature.* **306**: 395-7.

**Lessnick SL, Braun BS, Denny CT & May WA.** 1995. Multiple domains mediate transformation by the Ewing's sarcoma EWS/FLI-1 fusion gene. *Oncogene.* **10**: 423-31.

**Li HP, Zhang X, Duncan R, Comai L & Lai MM.** 1997. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 binds to the transcription- regulatory region of mouse hepatitis virus RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**: 9544-9.

- Li JP, D'Andrea AD, Lodish HF & Baltimore D.** 1990. Activation of cell growth by binding of Friend spleen focus-forming virus gp55 glycoprotein to the erythropoietin receptor. *Nature*. **343**: 762-4.
- Liang H, Mao X, Olejniczak ET, Nettesheim DG, Yu L, Meadows RP, Thompson CB & Fesik SW.** 1994. Solution structure of the ets domain of Fli-1 when bound to DNA. *Nature Struct. Biol.* **1**: 871-6.
- Littlewood TD, Hancock DC, Danielian PS, Parker MG & Evan GI.** 1995. A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins. *Nucleic Acids Res.* **23**: 1686-90.
- Logie C & Stewart AF.** 1995. Ligand-regulated site-specific recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**: 5940-4.
- Lopez M, Oettgen P, Akbarali Y, Dendorfer U & Libermann TA.** 1994. ERP, a new member of the ets transcription factor/oncoprotein family : characterization and differential expression during B-lymphocyte development. *Mol Cell Biol.* **14**: 3292-309.
- Lyon JJ & Watson RJ.** 1996. Interference of Myb transactivation activity by a conditional dominant negative protein: functional interference in a cytotoxic T-cell line results in G1 arrest. *Gene.* **182**: 123-8.
- Mader S, Kumar V, de Verneuil H & Chambon P.** 1989. Three amino acids of the oestrogen receptor are essential to its ability to distinguish an oestrogen from a glucocorticoid-responsive element. *Nature.* **338**: 271-4.
- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M & Chambon P.** 1995. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell.* **83**: 835-9.
- Mao X, Miesfeldt S, Yang H, Leiden JM & Thompson CB.** 1994. The FLI-1 and chimeric EWS-FLI-1 oncoproteins display similar DNA binding specificities. *J Biol Chem.* **269**: 18216-22.
- Mattioni T, Jackson PK, Bhini, Hooft van Huijsduijnen O & Picard D.** 1995. Cell cycle arrest by tyrosine kinase Abl involves altered early mitogenic response. *Oncogene.* **10**: 1325-33.
- Mattioni T, Louvion JF & Picard D.** 1994. Regulation of protein activities by fusion to steroid binding domains. *Methods Cell Biol.* 335-52.
- May WA, Gishizky ML, Lessnick SL, Lunsford LB, Lewis BC, Delattre O, Zucman J, Thomas G & Denny CT.** 1993b. Ewing sarcoma 11;22 translocation produces a chimeric transcription factor that requires the DNA-binding domain encoded by FLI1 for transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**: 5752-6.
- May WA, Lessnick SL, Braun BS, Klemsz M, Lewis BC, Lunsford LB, Hromas R & Denny CT.** 1993a. The Ewing's sarcoma EWS/FLI-1 fusion gene encodes a more potent transcriptional activator and is a more powerful transforming gene than the FLI-1. *Mol Cell Biol.* **13**: 7393-8.

**McDonnell DP, Clemm DL, Hermann T, Goldman ME & Pike JW.** 1995. Analysis of estrogen receptor function in vitro reveals three distinct classes of antiestrogens. *Mol Endocrinol.* **9:** 659-69.

**McDonnell DP, Nawaz Z & O'Malley BW.** 1991. In situ distinction between steroid receptor binding and transactivation at a target gene. *Mol Cell Biol.* **11:** 4350-5.

**Metzger D, White JH & Chambon P.** 1988. The human oestrogen receptor functions in yeast. *Nature.* **334:** 31-6.

**Metzger D, Berry M, Ali S & Chambon P.** 1995a. Effect of antagonists on DNA binding properties of the human estrogen receptor in vitro and in vivo. *Mol Endocrinol.* **9:** 579-91.

**Metzger D, Clifford J, Chiba H & Chambon P.** 1995b. Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92:** 6991-5.

**Miller J, McLachlan AD & Klug A.** 1985. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *Embo J.* **4:** 1609-14.

**Miyazaki Y, Sun X, Uchida H, Zhang J & Nimer S.** 1996. MEF, a novel transcription factor with an Elf-1 like DNA binding domain but distinct transcriptional activating properties. *Oncogene.* **13:** 1721-9.

**Monté D, Baert JL, Defosse PA, de Launoit Y & Stéhelin D.** 1994. Molecular cloning and characterization of human ERMp, a new member of the ETS family closely related to mouse PEA3 and ER81 transcription factors. *Oncogene.* **9:** 1397-406.

**Moreau-Gachelin F, Ray D, Mattei MG, Tambourin P & Tavitian A.** 1989. The putative oncogene Spi-1: murine chromosomal localization and transcriptional activation in murine acute erythroleukemias [published erratum appears in *Oncogene* 1990 Jun;5(6):941]. *Oncogene.* **4:** 1449-56.

**Moreau-Gachelin F, Tavitian A & Tambourin P.** 1988. Spi-1 is a putative oncogene in virally induced murine erythroleukaemias. *Nature.* **331:** 277-80.

**Moreau-Gachelin F, Wendling F, Molina T, Denis N, Titeux M, Grimber G, Briand P, Vainchenker W & Tavitian A.** 1996. Spi-1/PU.1 transgenic mice develop multistep erythroleukemias. *Mol Cell Biol.* **16:** 2453-63.

**Morohoshi F, Arai K, Takahashi EI, Tanigami A & Ohki M.** 1996. Cloning and mapping of a human RBP56 gene encoding a putative RNA binding protein similar to FUS/TLS and EWS proteins. *Genomics.* **38:** 51-7.

**Muller C, Kowenz-Leutz E, Grieser-Ade S, Graf T & Leutz A.** 1995. NF-M (chicken C/EBP beta) induces eosinophilic differentiation and apoptosis in a hematopoietic progenitor cell line. *EMBO J.* **14:** 6127-6135.

- Naik SM, Shibagaki N, Li LJ, Quinlan KL, Paxton LL & Caughman SW.** 1997. Interferon gamma-dependent induction of human intercellular adhesion molecule-1 gene expression involves activation of a distinct STAT protein complex. *J Biol Chem.* **272**: 1283-90.
- Nakabeppu Y, Oda S & Sekiguchi M.** 1993. Proliferative activation of quiescent Rat-1A cells by delta FosB. *Mol Cell Biol.* **13**: 4157-66.
- Nakae K, Nakajima K, Inazawa J, Kitaoka T & Hirano T.** 1995. ERM, a PEA3 subfamily of Ets transcription factors, can cooperate with c-Jun. *J Biol Chem.* **270**: 23795-800.
- Natali P, Nicotra MR, Cavaliere R, Bigotti A, Romano G, Temponi M & Ferrone S.** 1990. Differential expression of intercellular adhesion molecule 1 in primary and metastatic melanoma lesions. *Cancer Res.* **50**: 1271-8.
- Natali PG, Hamby CV, Felding-Habermann B, Liang B, Nicotra MR, Di Filippo F, Giannarelli D, Temponi M & Ferrone S.** 1997. Clinical significance of alpha(v)beta3 integrin and intercellular adhesion molecule-1 expression in cutaneous malignant melanoma lesions. *Cancer Res.* **57**: 1554-60.
- No D, Yao TP & Evans RM.** 1996. Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**: 3346-51.
- Nunn MF, Seeburg PH, Moscovici C & Duesberg PH.** 1983. Tripartite structure of the avian erythroblastosis virus E26 transforming gene. *Nature.* **306**: 391-5.
- O'Hagan RC, Tozer RG, Symons M, McCormick F & Hassell JA.** 1996. The activity of the Ets transcription factor PEA3 is regulated by two distinct MAPK cascades. *Oncogene.* **13**: 1323-33.
- Oettgen P, Akbarali Y, Boltax J, Best J, Kunsch C & Libermann TA.** 1996. Characterization of NERF, a novel transcription factor related to the Ets factor ELF-1. *Mol Cell Biol.* **16**: 5091-106.
- Oettgen P, Alani RM, Barcinski MA, Brown L, Akbarali Y, Boltax J, Kunsch C, Munger K & Libermann TA.** 1997. Isolation and characterization of a novel epithelium-specific transcription factor, ESE-1, a member of the ets family. *Mol Cell Biol.* **17**: 4419-33.
- Ohno T, Ouchida M, Lee L, Gatalica Z, Rao VN & Reddy ES.** 1994. The EWS gene, involved in Ewing family of tumors, malignant melanoma of soft parts and desmoplastic small round cell tumors, codes for an RNA binding protein with novel regulatory domains. *Oncogene.* **9**: 3087-97.
- Ohno T, Rao VN & Reddy ES.** 1993. EWS/Fli-1 chimeric protein is a transcriptional activator. *Cancer Res.* **53**: 5859-63.
- Okuda K, Golub TR, Gilliland DG & Griffin JD.** 1996. p210BCR/ABL, p190BCR/ABL, and TEL/ABL activate similar signal transduction pathways in hematopoietic cell lines. *Oncogene.* **13**: 1147-52.
- Ouchida M, Ohno T, Fujimura Y, Rao VN & Reddy ES.** 1995. Loss of tumorigenicity of Ewing's sarcoma cells expressing antisense RNA to EWS-fusion transcripts. *Oncogene.* **11**: 1049-54.

- Panagopoulos I, Hoglund M, Mertens F, Mandahl N, Mitelman F & Aman P.** 1996. Fusion of the EWS and CHOP genes in myxoid liposarcoma. *Oncogene*. **12**: 489-94.
- Papadopoulos P, Ridge SA, Boucher CA, Stocking C & Wiedemann LM.** 1995. The novel activation of ABL by fusion to an ets-related gene, TEL. *Cancer Res*. **55**: 34-8.
- Paul R, Schuetze S, Kozak SL, Kozak CA & Kabat D.** 1991. The Sfp1-1 proviral integration site of Friend erythroleukemia encodes the ets-related transcription factor Pu.1. *J Virol*. **65**: 464-7.
- Paxton LL, Li LJ, Secor V, Duff JL, Naik SM, Shibagaki N & Caughman SW.** 1997. Flanking sequences for the human intercellular adhesion molecule-1 NF- $\kappa$ B response element are necessary for tumor necrosis factor alpha- induced gene expression. *J Biol Chem*. **272**: 15928-35.
- Peeters P, Raynaud SD, Cools J, Wlodarska I, Grosgeorge J, Philip P, Monpoux F, Van RL, Baens M, Van, den, Berghe, H & Marynen P.** 1997. Fusion of TEL, the ETS-variant gene 6 (ETV6), to the receptor- associated kinase JAK2 as a result of t(9;12) in a lymphoid and t(9;15;12) in a myeloid leukemia [In Process Citation]. *Blood*. **90**: 2535-40.
- Pelczar H, Albagli O, Chotteau LA, Damour I & de Launoit Y.** 1997. A conditional version of the Ets transcription factor Erm by fusion to the ligand binding domain of the oestrogen receptor [In Process Citation]. *Biochem Biophys Res Commun*. **239**: 252-6.
- Peter K & O'Toole TE.** 1995. Modulation of cell adhesion by changes in alpha L beta 2 (LFA-1, CD11a/CD18) cytoplasmic domain/cytoskeleton interaction. *J Exp Med*. **181**: 315-26.
- Peter M, Couturier J, Pacquement H, Michon J, Thomas G, Magdelenat H & Delattre O.** 1997. A new member of the ETS family fused to EWS in Ewing tumors. *Oncogene*. **14**: 1159-64.
- Picard D, Salser SJ & Yamamoto KR.** 1988. A movable and regulable inactivation function within the steroid binding domain of the glucocorticoid receptor. *Cell*. **54**: 1073-80.
- Ponglikitmongkol M, White JH & Chambon P.** 1990. Synergistic activation of transcription by the human estrogen receptor bound to tandem responsive elements. *Embo J*. **9**: 2221-31.
- Prasad DD, Ouchida M, Lee L, Rao VN & Reddy ES.** 1994. TLS/FUS fusion domain of TLS/FUS-erg chimeric protein resulting from the t(16;21) chromosomal translocation in human myeloid leukemia functions as a transcriptional activation domain. *Oncogene*. **9**: 3717-29.
- Preston GA, Lyon TT, Yin Y, Lang JE, Solomon G, Annab L, Srinivasan DG, Alcorta DA & Barrett JC.** 1996. Induction of apoptosis by c-Fos protein. *Mol Cell Biol*. **16**: 211-8.
- Pribyl LJ, Watson DK, McWilliams MJ, Ascione R & Papas TS.** 1988. The Drosophila ets-2 gene: molecular structure, chromosomal localization, and developmental expression. *Dev Biol*. **127**: 45-53.
- Quang CT, Wessely O, Pironin M, Beug H & Ghysdael J.** 1997. Cooperation of spi-1/PU.1 with an activated erythropoietin receptor inhibits apoptosis and epo-dependent differentiation in primary erythroblasts and induces their kit ligand-dependent proliferation [In Process Citation]. *Embo J*. **16**: 5639-53.

**Rao VN, Huebner K, Isobe M, Rushdi A, Croce CM & Reddy ES.** 1989. *elk*, tissue-specific ets-related genes on chromosomes X and 14 near translocation breakpoints. *Science*. **244**: 66-70.

**Reddy ES, Rao VN & Papas TS.** 1987. The *erg* gene: a human gene related to the *ets* oncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **84**: 6131-5.

**Reichmann E, Schwarz H, Deiner EM, Leitner I, Eilers M, Berger J, Busslinger M & Beug H.** 1992. Activation of an inducible c-FosER fusion protein causes loss of epithelial polarity and triggers epithelial-fibroblastoid cell conversion. *Cell*. **71**: 1103-16.

**Rivera RR, Stuiver MH, Steenbergen R & Murre C.** 1993. Ets proteins: new factors that regulate immunoglobulin heavy-chain gene expression. *Mol Cell Biol*. **13**: 7163-9.

**Roemer K & Friedmann T.** 1993. Modulation of cell proliferation and gene expression by a p53-estrogen receptor hybrid protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **90**: 9252-6.

**Rosenwald IB, Rhoads DB, Callanan LD, Isselbacher KJ & Schmidt EV.** 1993. Increased expression of eukaryotic translation initiation factors eIF-4E and eIF-2 alpha in response to growth induction by c-myc. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **90**: 6175-8.

**Roussel M, Saule S, Lagrou C, Rommens C, Beug H, Graf T & Stehelin D.** 1979. Three new types of viral oncogenes of cellular origin specific for hematopoietic cell transformation. *Nature*. 452-5.

**Rusconi S & Yamamoto KR.** 1987. Functional dissection of the hormone and DNA binding activities of the glucocorticoid receptor. *Embo J*. **6**: 1309-15.

**Ruta M, Bestwick R, Machida C & Kabat D.** 1983. Loss of leukemogenicity caused by mutations in the membrane glycoprotein structural gene of Friend spleen focus-forming virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **80**: 4704-8.

**Samuels ML, Weber MJ, Bishop JM & McMahon M.** 1993. Conditional transformation of cells and rapid activation of the mitogen-activated protein kinase cascade by an estradiol-dependent human raf-1 protein kinase. *Mol Cell Biol*. **13**: 6241-52.

**Scherrer LC, Picard D, Massa E, Harmon JM, Simons SJ, Yamamoto KR & Pratt WB.** 1993. Evidence that the hormone binding domain of steroid receptors confers hormonal control on chimeric proteins by determining their hormone-regulated binding to heat-shock protein 90. *Biochemistry*. **32**: 5381-6.

**Schneikert J, Peterziel H, Defossez PA, Klocker H, de Launoit Y & Cato ACB.** 1996. Androgen receptor - Ets protein interaction: a novel mechanism for steroid hormone mediated down modulation of matrix-metalloproteinase expression. *J. Biol. Chem*. **271**: 23907-13.

**Schuermann M, Hennig G & Muller R.** 1993. Transcriptional activation and transformation by chimaeric Fos-estrogen receptor proteins: altered properties as a consequence of gene fusion. *Oncogene*. **8**: 2781-90.

- Schwabe JW & Rhodes D.** 1991. Beyond zinc fingers: steroid hormone receptors have a novel structural motif for DNA recognition. *Trends Biochem Sci.* **16:** 291-6.
- Sgouras DN, Athanasiou MA, Beal GJ, Fisher RJ, Blair DG & Mavrothalassitis GJ.** 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. *EMBO J.* **14:** 4781-93.
- Shimizu K, Ichikawa H, Tojo A, Kaneko Y, Maseki N, Hayashi Y, Ohira M, Asano S & Ohki M.** 1993. An *ets*-related gene, *ERG*, is rearranged in human myeloid leukemia with t(16;21) chromosomal translocation. *Proc Natl Acad Sci USA.* **90:** 10280-4.
- Singh H, LeBowitz JH, Baldwin AJ & Sharp PA.** 1988. Molecular cloning of an enhancer binding protein: isolation by screening of an expression library with a recognition site DNA. *Cell.* **52:** 415-23.
- Smith DF & Toft DO.** 1993. Steroid receptors and their associated proteins. *Mol Endocrinol.* **7:** 4-11.
- Sorensen PH, Lessnick SL, Lopez TD, Liu XF, Triche TJ & Denny CT.** 1994. A second Ewing's sarcoma translocation, t(21;22), fuses the EWS gene to another ETS-family transcription factor, ERG. *Nat Genet.* **6:** 146-51.
- Spitkovsky D, Steiner P, Lukas J, Lees E, Pagano M, Schulze A, Joswig S, Picard D, Tommasino M, Eilers M & et al.** 1994. Modulation of cyclin gene expression by adenovirus E1A in a cell line with E1A-dependent conditional proliferation. *J Virol.* **68:** 2206-14.
- Springer TA.** 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell.* **76:** 301-14.
- Stratowa C & Audette M.** 1995. Transcriptional regulation of the human intercellular adhesion molecule- 1 gene: a short overview. *Immunobiology.* **193:** 293-304.
- Superti-Furga G, Bergers G, Picard D & Busslinger M.** 1991. Hormone-dependent transcriptional regulation and cellular transformation by Fos-steroid receptor fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88:** 5114-8.
- Takebayashi H, Oida H, Fujisawa K, Yamaguchi M, Hikida T, Fukumoto M, Narumiya S & Kakizuka A.** 1996. Hormone-induced apoptosis by Fas-nuclear receptor fusion proteins: novel biological tools for controlling apoptosis in vivo. *Cancer Res.* **56:** 4164-70.
- Taylor JM, Dupont VE, Davies JD, Hassell JA, Houle JD, Gurley CM & Peterson CA.** 1997. A role for the ETS domain transcription factor PEA3 in myogenic differentiation. *Mol Cell Biol.* **17:** 5550-8.
- Tei H, Nihonmatsu I, Yokokura T, Ueda R, Sano Y, Okuda T, Sato K, Hirata K, Fujita SC & Yamamoto D.** 1992. pokkuri, a Drosophila gene encoding an E-26-specific (Ets) domain protein, prevents overproduction of the R7 photoreceptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **89:** 6856-60.

- Thompson AD, Braun BS, Arvand A, Stewart SD, May WA, Chen E, Korenberg J & Denny C.** 1996. EAT-2 is a novel SH2 domain containing protein that is up regulated by Ewing's sarcoma EWS/FLI1 fusion gene. *Oncogene*. **13**: 2649-58.
- Thompson CC, Brown TA & McKnight SL.** 1991. Convergence of Ets- and notch-related structural motifs in a heteromeric DNA binding complex. *Science*. **253**: 762-8.
- Thummel CS.** 1995. From embryogenesis to metamorphosis: the regulation and function of Drosophila nuclear receptor superfamily members. *Cell*. **83**: 871-7.
- Tora L, Mullick A, Metzger D, Ponglikitmongkol M, Park I & Chambon P.** 1989b. The cloned human oestrogen receptor contains a mutation which alters its hormone binding properties. *Embo J*. **8**: 1981-6.
- Tora L, White J, Brou C, Tasset D, Webster N, Scheer E & Chambon P.** 1989a. The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell*. **59**: 477-87.
- Trimble MS, Xin JH, Guy CT, Muller WJ & Hassell JA.** 1993. PEA3 is overexpressed in mouse metastatic mammary adenocarcinomas. *Oncogene*. **8**: 3037-42.
- Tsai MJ & O'Malley BW.** 1994. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem*. **63**: 451-86.
- Tzukerman M, Zhang XK, Hermann T, Wills-KN, Graupner G & Pfahl M.** 1990. The human estrogen receptor has transcriptional activator and repressor functions in the absence of ligand. *New Biol*. **2**: 613-20.
- Tzukerman MT, Esty A, Santiso MD, Danielian P, Parker MG, Stein RB, Pike JW & McDonnell DP.** 1994. Human estrogen receptor transactivational capacity is determined by both cellular and promoter context and mediated by two functionally distinct intramolecular regions. *Mol Endocrinol*. **8**: 21-30.
- Umek RM, Friedman AD & McKnight SL.** 1991. CCAAT-enhancer binding protein: a component of a differentiation switch. *Science*. **251**: 288-92.
- Umesono K & Evans RM.** 1989. Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell*. **57**: 1139-46.
- Urano F, Umezawa A, Hong W, Kikuchi H & Hata J.** 1996. A novel chimera gene between *EWS* and *E1A-F*, encoding the adenovirus E1A enhancer-binding protein, in extraosseous Ewing's sarcoma. *Biochem Biophys Res Com*. **219**: 608-12.
- Vater CA, Bartle LM, Dionne CA, Littlewood TD & Goldmacher VS.** 1996. Induction of apoptosis by tamoxifen-activation of a p53-estrogen receptor fusion protein expressed in E1A and T24 H-ras transformed p53-/- mouse embryo fibroblasts. *Oncogene*. **13**: 739-48.

- Virbasius JV, Virbasius CA & Scarpulla RC.** 1993. Identity of GABP with NRF-2, a multisubunit activator of cytochrome oxidase expression, reveals a cellular role for an ETS domain activator of viral promoters. *Genes Dev.* **7**: 380-92.
- Walter P, Green S, Greene G, Krust A, Bornert JM, Jeltsch JM, Staub A, Jensen E, Scrace G & Waterfield M.** 1985. Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **82**: 7889-93.
- Wasylyk B, Wasylyk C, Flores P, Bègue A, Leprince D & Stéhelin D.** 1990. The c-ets proto-oncogenes encode transcription factors that cooperate with c-Fos and c-Jun for transcriptional activation. *Nature.* **346**: 191-3.
- Watanabe H, Sawada J, Yano K, Yamaguchi K, Goto M & Handa H.** 1993. cDNA cloning of transcription factor E4TF1 subunits with Ets and notch motifs. *Mol Cell Biol.* **13**: 1385-91.
- Watson DK, McWilliams MJ, Lapis P, Lautenberger JA, Schweinfest CW & Papas TS.** 1988. Mammalian ets-1 and ets-2 genes encode highly conserved proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **85**: 7862-6.
- Webster NJ, Green S, Jin JR & Chambon P.** 1988. The hormone-binding domains of the estrogen and glucocorticoid receptors contain an inducible transcription activation function. *Cell.* **54**: 199-207.
- Weinberger C, Hollenberg SM, Ong ES, Harmon JM, Brower ST, Cidlowski J, Thompson EB, Rosenfeld MG & Evans RM.** 1985. Identification of human glucocorticoid receptor complementary DNA clones by epitope selection. *Science.* **228**: 740-2.
- Werner MH, Clore GM, Fisher CL, Fisher RJ, Trinh L, Shiloach J & Gronenborn AM.** 1995. The solution structure of the human ETS1-DNA complex reveals a novel mode of binding and true side-chain intercalation. *Cell.* **83**: 761-71.
- Xin JH, Cowie A, Lachance P & Hassell JA.** 1992. Molecular cloning and characterization of PEA3, a new member of the Ets oncogene family that is differentially expressed in mouse embryonic cells. *Genes Dev.* **6**: 481-96.
- Yamamoto KR.** 1985. Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. *Annu Rev Genet.* **19**: 209-52.
- Yi H, Fujimura Y, Ouchida M, Prasad DD, Rao VN & Reddy ES.** 1997. Inhibition of apoptosis by normal and aberrant Fli-1 and erg proteins involved in human solid tumors and leukemias. *Oncogene.* **14**: 1259-68.
- Zhang L, Lemarchandel V, Romeo PH, Ben-David Y & Greer P.** 1993. The Fli-1 proto-oncogene, involved in erythroleukemia and Ewing's sarcoma, encodes a transcriptional activator with DNA-binding specificities distinct from other Ets family members. *Oncogene.* **8**: 1621-30.
- Zhou MM, Meadows RP, Logan TM, Yoon HS, Wade WS, Ravichandran KS, Burakoff SJ & Fesik SW.** 1995. Solution structure of the Shc SH2 domain complexed with a tyrosine-phosphorylated peptide from the T-cell receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**: 7784-8.

- Zhou Q & Sharp PA.** 1995. Novel mechanism and factor for regulation by HIV-1 Tat. *Embo J.* **14:** 321-8.
- Zhou Q & Sharp PA.** 1996. Tat-SF1: cofactor for stimulation of transcriptional elongation by HIV-1 Tat. *Science.* **274:** 605-10.
- Zinszner H, Albalat R & Ron D.** 1994. A novel effector domain from the RNA-binding protein TLS or EWS is required for oncogenic transformation by CHOP. *Genes Dev.* **8:** 2513-26.
- Zinszner H, Immanuel D, Yin Y, Liang FX & Ron D.** 1997. A topogenic role for the oncogenic N-terminus of TLS: nucleolar localization when transcription is inhibited. *Oncogene.* **14:** 451-61.
- Zinszner H, Sok J, Immanuel D, Yin Y & Ron D.** 1997. TLS (FUS) binds RNA in vivo and engages in nucleo-cytoplasmic shuttling. *J Cell Sci.* 1741-50.
- Zucman J, Delattre O, Desmaze C, Epstein AL, Stenman G, Speleman F, Fletchers CD, Aurias A & Thomas G.** 1993b. EWS and ATF-1 gene fusion induced by t(12;22) translocation in malignant melanoma of soft parts. *Nat Genet.* **4:** 341-5.
- Zucman J, Melot T, Desmaze C, Ghysdael J, Plougastel B, Peter M, Zucker JM, Triche TJ, Sheer D, Turc-Carel C, Ambros P, Combaret V, Lenoir G, Aurias A, Thomas G & Delattre O.** 1993a. Combinatorial generation of variable fusion proteins in the Ewing family of tumors. *EMBO J.* **12:** 4481-7.

# ANNEXES

## MINIREVIEW

# Structure–Function Relationships of the PEA3 Group of Ets-Related Transcription Factors

Yvan de Launoit,<sup>1</sup> Jean-Luc Baert,\* Anne Chotteau,\*† Didier Monte,\*<sup>2</sup> Pierre-Antoine Defossez,\*<sup>3</sup>  
Laurent Coutte,\* H el ene Pelczar,\* and Frauke Leenders\*

\*UMR 319 CNRS, Institut Pasteur de Lille, Institut de Biologie, 1 rue Calmette, BP 447, 59021 Lille, France; and †Centre de Biologie Cellulaire, Equipe Dynamique des Cellules Embryonnaires et Canc ereuses, USTL, Villeneuve d'Ascq, France

Received April 7, 1997

THIS REVIEW IS DEDICATED TO THE LATE DR. MARIE-PIERRE LAGET

The PEA3 group of transcription factors belongs to the Ets family and is composed of PEA3, ERM, and ER81, which are more than 95% identical within the DNA-binding domain—the ETS domain—and which demonstrate 50% aa identity overall. We present here a review of the current knowledge of these transcription factors, which possess functional domains responsible for DNA-binding, DNA-binding inhibition, and transactivation. Recent data suggest that these factors are targets for signaling cascades, such as the Ras-dependent ones, and thus may contribute first to the nuclear response to cell stimulation and second to Ras-induced cell transformation. The expression of the PEA3 group members in numerous developing murine organs, and, especially, in epithelial–mesenchymal interaction events, suggests a key role in murine organogenesis. Moreover, their expression in certain breast cancer cells suggests a possible involvement of these genes in the appearance, progression, and invasion of malignant cells. © 1997 Academic Press

The ets genes encode a growing family of transcription factors that, among vertebrates, includes *c-ets-1*, *c-ets-2*, ER71, ERF, *pe1*, *erg*, *fli*, EFV, SAP-1, SAP-2/ERP/*net*, *elk-1*, GABP $\alpha$ /E4TF1, *tel*, *elf-1*, *nerf*, PEA3, ER81, ERM, Spi-1/Pu-1, and Spi-B (for review, see 1). The signature of the Ets family is the ETS domain, a region of approximately 85 amino acids (2) which has been widely conserved during evolution, and for which the structural motif has been determined through NMR analysis, allowing its classification in the helix–turn–helix superfamily of DNA-binding domains (3,4). Though most of the Ets family members bind to the core sequence 5'-GGAA/T-3', the ETS domain displays enough variability between the members of the family to allow their classification into different groups with respect to their sequence identity (1,5). A wide series of promoters has been characterized as containing active Ets-binding sites. For example, Ets proteins are involved in the regulation of the transcription of membrane receptors, growth factors, transcription factors, and extracellular matrix metalloproteinases (for more detail see 1,6,7). Except for very limited examples, the specificity of an Ets protein to the regulation of gene transcription has not yet been established. However, this specificity could be at three levels: (1) the expression sites of the Ets gene, (2) the DNA-binding specificity of

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed. Fax: (011) 33 3 20 87 79 08. E-mail: delaunoi@infobiogen.fr.

<sup>2</sup> Present address: Laboratoire d'Endocrinologie Moléculaire, CHUL Research Center, 2705 Boulevard Laurier, G1V 4G2 Québec, Canada.

<sup>3</sup> Present address: Department of Biology, Massachusetts Institute of Technology, 77 Massachusetts Avenue, Cambridge, MA 02139-4307.

its ETS domain, and (3) the presence of specific domains required for protein-protein interactions.

### THE PEA3 GROUP

The PEA3 group is composed of three members: PEA3 (also called E1AF or ETV4) (8,9), ER81 (also called ETV1) (10-12), and ERM (also called ETV5) (13). As illustrated in Fig. 1A, these three proteins are more than 95% identical in the ETS domain, more than 85% identical in the 32-residue acidic domain (AD) located in the amino-terminal part of the proteins, and almost 50% identical in the final 61 residues corresponding to the carboxy-terminal tail (Ct). Analysis of the sequence identity of the three PEA3 group members indicates that ERM and ER81 are more closely related to each other than to PEA3. As illustrated in Fig. 1B, it appears that a common ancestor of the three genes has undergone two successive duplications.

Human ERM is composed of 14 exons split into at least 65 kb of genomic DNA (14). We have also characterized the human ER81/ETV1 and E1AF/PEA3/ETV4 genomic organization and shown that the positions of the introns are well conserved among the three genes (unpublished data). Moreover, the ETS, the Ct, and the AD domains present conservation of the positions of the introns.

Concerning their chromosomal locations, ERM is situated at position 3q27-q29 (14,15) and E1AF/PEA3/ETV4 (16) at position 17q21; this latter is in the vicinity of the inherited breast cancer gene BRCA1 (17). ETV1/ER81 is located on chromosome band 7q21 (11).

### THE FUSION OF PEA3 GROUP GENES AND THE EWS GENE IN EWING'S SARCOMA

In almost all Ewing's sarcoma tumors, the RNA-binding protein gene *EWS* is fused to an *ets* gene, either *fli* or *erg* by a t(11;22)(q24;q12) or t(21;22)(q22;q12) chromosome translocation (18,19). ETV1/ER81 and E1AF/PEA3/ETV4 have recently been identified as translocation partners of EWS in different Ewing's sarcomas involving t(7;22)(p22;q12) (11) and t(17;22)(q12;q12) (20,21) translocations (Fig. 2). The expression of the EWS-Fli chimera protein is sufficient to transform cells *in vitro* (22-24). Previous studies have claimed that the intrinsic properties of the EWS-Fli protein render it oncogenic. However,

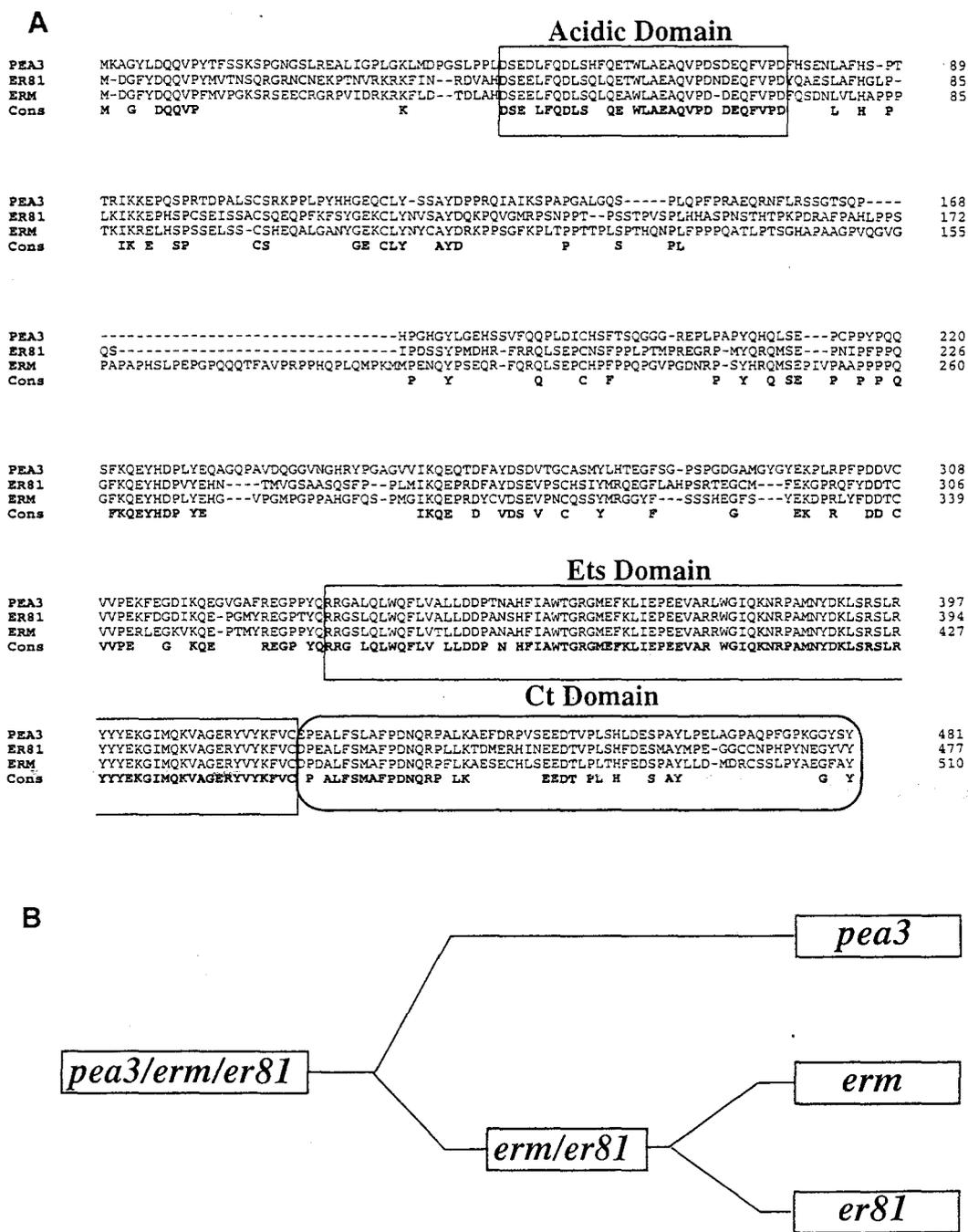
Braun *et al.* have shown that, under their experimental conditions, the EWS-Erg chimera protein is less transforming than the EWS-Fli chimera protein, while the EWS-ETV1 chimera protein is not transforming at all (23). We should mention here that the C-terminal region of these Ets proteins is transactivating by itself (see the section below). Together with the putative cooperation with the activating domain of EWS, these capacities could be crucial in inducing the transcription of genes linked to transformation.

### DNA-BINDING AND TRANSACTIVATION CAPACITIES

As for the other Ets family proteins, the PEA3 group members possess a DNA-binding domain responsible for their nuclear location, which confers on them the ability to bind to the DNA (25,26). It has been shown by means of gel shift analysis that the PEA3 group proteins bind to the DNA core consensus sequence GGAA/T recognized by almost all Ets proteins (8,10-13,27). Concerning the DNA-binding specificity of the Ets proteins, many *in vitro* target detection assay experiments have shown that the different Ets proteins recognize similar sequences outside the core sequence (10,28-31). Murine ER81 was shown to preferentially recognize the same nucleotide sequence outside the core GGAA/T core sequence, as do other Ets proteins such as GABP $\alpha$  and Ets-1 (10). As illustrated in Fig. 3, ERM contains two inhibitory domains for the DNA-binding activity which are adjacent to the ETS domain. These are the Ct domain and a central region spanning residues 203 to 290 (27). In contrast to the Ct domain conserved in the three PEA3 group members, the central region of ERM is not conserved except for two stretches of 6 and 13 residues.

In transient cotransfection assays these three PEA3 group proteins are able to increase transcription of reporter plasmids containing artificial multimerized Ets-responsive elements that may or may not be adjacent to an AP1 site (9,12,15,27,32), as well as reporter plasmids containing the functional promoter regions of the human stromelysin, the human type I and IV collagenases (33), the human vimentin (34), and the human ICAM-1 (35) genes.

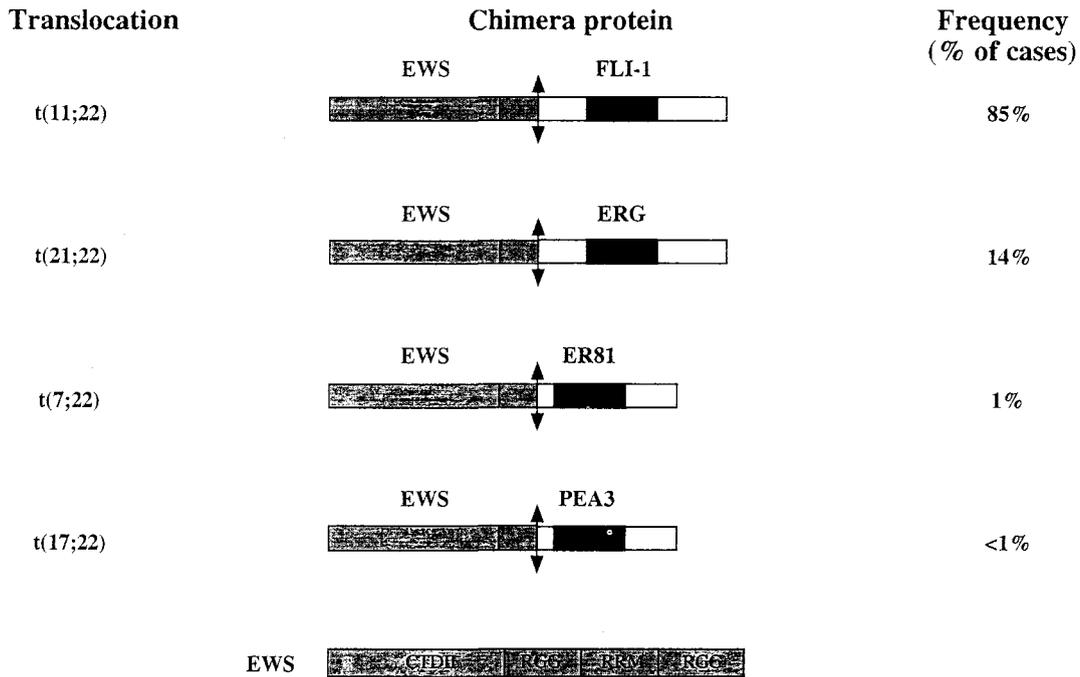
As illustrated in Fig. 3, the 32 conserved residues in the acidic domain and the 61 conserved residues in the carboxy-terminal domains are responsible for the transactivation properties of ERM (15,26,27), ER81 (25), and PEA3 (J. H. Chen, personal commu-



**FIG. 1.** (A) Sequence alignment of human PEA3 group proteins. Residues of PEA3, ER81, and ERM were aligned by computerized alignment software using the CLUSTAL package relative to the first putative amino terminus methionine. Conserved sequences for all three members are shown at the CONS line. The acidic, ETS, and Ct domains are boxed. (B) The genes of the PEA3 group probably appear after two duplications of a common ancestor.

nication). No other transactivation domains have been mapped in these factors, but a central region encompassing the DNA-binding inhibitory region decreases the transactivation capacity of the N-ter-

minal region containing the acidic domain (15,25,27). Moreover, the acidic and carboxy-terminal domains exhibit functional synergism, suggesting that they activate transcription through dif-

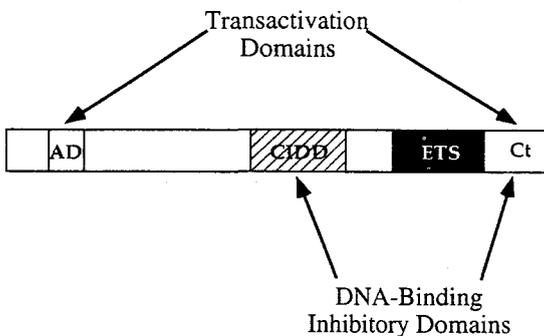


**FIG. 2.** Four Ets genes fused to the EWS gene in Ewing's sarcomas. The ETS domain corresponds to the DNA-binding domain of the Ets proteins. The CTDII corresponds to a hexapeptide repeat domain similar to RNA polymerase II. The RGG and RRM domains are two domains putatively involved in RNA binding.

ferent mechanisms (27). In fact, although both domains contain a high percentage of acidic residues, squelching and yeast transactivation experiments have demonstrated that the acidic domain is functionally related to acidic transactivation domains such as that of the VP16 viral protein (27). Using

circular dichroism experiments, we have shown that the 15 initial residues of the acidic domain are structured in an alpha helix. When this helix is disrupted by replacing a phenylalanine with a proline, the transactivation capacity of the full-length ERM protein is dramatically reduced. A study of the genomic organization of the acidic domain suggests that the alpha helix is encoded by one exon conserved in ERM, ER81, and PEA3. This suggests the acquisition by the PEA3 group ancestor of an amino-terminal transactivation domain, probably by exon shuffling (36).

Ets proteins have been shown to interact with other transcription factors. At present only two interacting partners have been found for ERM. ERM and c-Jun synergistically activate a synthetic element containing both an ETS binding site and a cAMP response element without making any apparent ternary complex. The synergy between c-Jun and ERM may be attributed to the enhancing effect of c-Jun on the transcription activity of ERM. Indeed, this effect has been shown in a heterologous system, where portions of ERM fused to the Gal-4 DNA-binding domain cooperate with ERM to dramatically increase transactivation. Although no protein-protein interactions have been demonstrated *in vitro*, the



**FIG. 3.** Schematic representation of the different ERM domains involved in DNA-binding and transactivation regulation. The first 72 residues containing the acidic domain (AD) and the last 61 residues (Ct) constitute the two unique and independent transactivation domains. Although the ETS domain (ETS) recognizes the specific GGAA/T DNA sequence, the central inhibitory DNA-binding domain (CIDDD) and the Ct domain are responsible for DNA-binding inhibition.

enhancing effect of c-Jun requires the first 165 residues *in vivo* (15). Another example of protein-protein interactions between PEA3 group members and transcription factors is the androgen receptor, which negatively regulates the collagenase expression through an Ets family member. ERM has been identified as interacting *in vitro* with the C-terminal domain of the androgen receptor (37).

#### ACTIVATION OF PEA3 GROUP MEMBERS BY SEVERAL TRANSDUCTION PATHWAYS

Recent studies support a model for signal transduction from activated receptor tyrosine kinases to Ras, which in turn activates the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway. The MAPK pathway then activates a diverse collection of nuclear transcription factors. Several Ets proteins have been identified as targets of the MAPK pathway. Among vertebrates, the ternary complex factor (TCF) Ets proteins, Elk-1, Sap-1, and Erp/Net/Sap-2, are activated by extracellular signal-regulated kinases (ERK) (38,39), as well as by the Jun N-terminal kinase (JNK) (39); this increases their transactivation ability on the *fos* promoter.

The transactivation capacities of mouse PEA3, mouse ER81, and human ERM have been shown to be dramatically increased by Ras, Raf-1, MEK, and MAPK ERK-1 and ERK-2; this leads to the conclusion that these factors are targets for Ras-dependent signaling cascades and may thus contribute to the nuclear response to stimulation of cells and also to Ras-induced cell transformation (25,26,40). The JNK/SAPK pathway is also involved in PEA3 group member activation since it has been demonstrated that SEK, the kinase which activates JNK/SAPK, increases murine PEA3 transactivation potency (40). The presence of MAPK phosphorylation sites in ER81, ERM, and PEA3 has been proved by *in vitro* phosphorylation assays. Moreover, protein kinase A (PKA) is also able to increase ERM and ER81 transactivation (25,26) through a putative PKA consensus site at the edge of the ETS domain. This suggests that the transactivation ability of these factors is regulated by several independent transduction signal pathways. However, although these factors are able to be phosphorylated *in vitro* by these kinases, their direct *in vivo* phosphorylation remains to be established. At the present time we cannot exclude the possibility that a kinase or a cofactor downstream of these identified kinases may be phosphory-

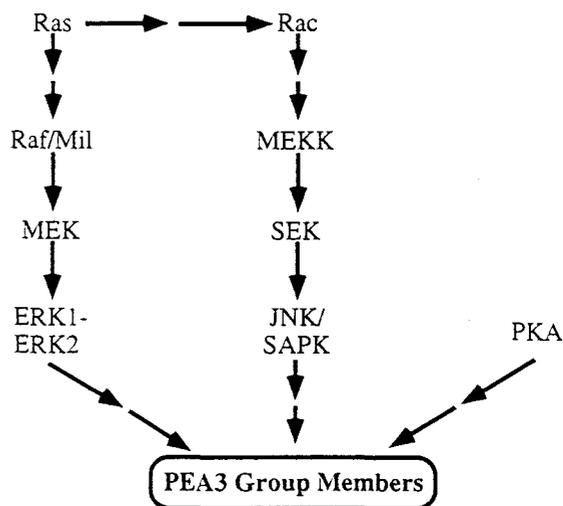


FIG. 4. Model showing the regulation of the activity of the PEA3 group members by different signal transduction pathways. Activated signaling kinases have been shown to increase the transactivation of the PEA3 group members. Double arrows indicate that either putative downstream kinases or cofactors of the PEA3 group members could be the link between the ERKs, the JNK/SAPK, and the PKA kinases on the one hand and the PEA3 group member activation on the other.

lated and may then activate the PEA3 group member (Fig. 4).

#### EXPRESSION OF THE PEA3 GROUP MEMBERS

At the mRNA level, ERM has been classified in adult humans and mice as a ubiquitously expressed gene with its highest expression in the brain and in the placenta (13). ER81 displays an expression pattern with high expression levels in human and murine lung, heart, and brain (10-12). The mRNA of PEA3 group members is found in almost all the hematopoietic cell lines tested and, more particularly, at a relatively high level of ERM (12,13,41). ERM mRNA seems to be almost ubiquitously expressed in an extensive series of nonhematopoietic cell lines (13, and unpublished data). Interestingly PEA3, whose expression is very weak in normal human tissues, is expressed in these different cell lines (41, and our unpublished data). Only a few human cell lines, such as the teratocarcinoma Tera line, express ER81 (12).

The levels of ERM and ER81 mRNA expression correlate quite well with the corresponding protein levels. In fact, antibodies against these two transcription factors specifically recognize the endoge-

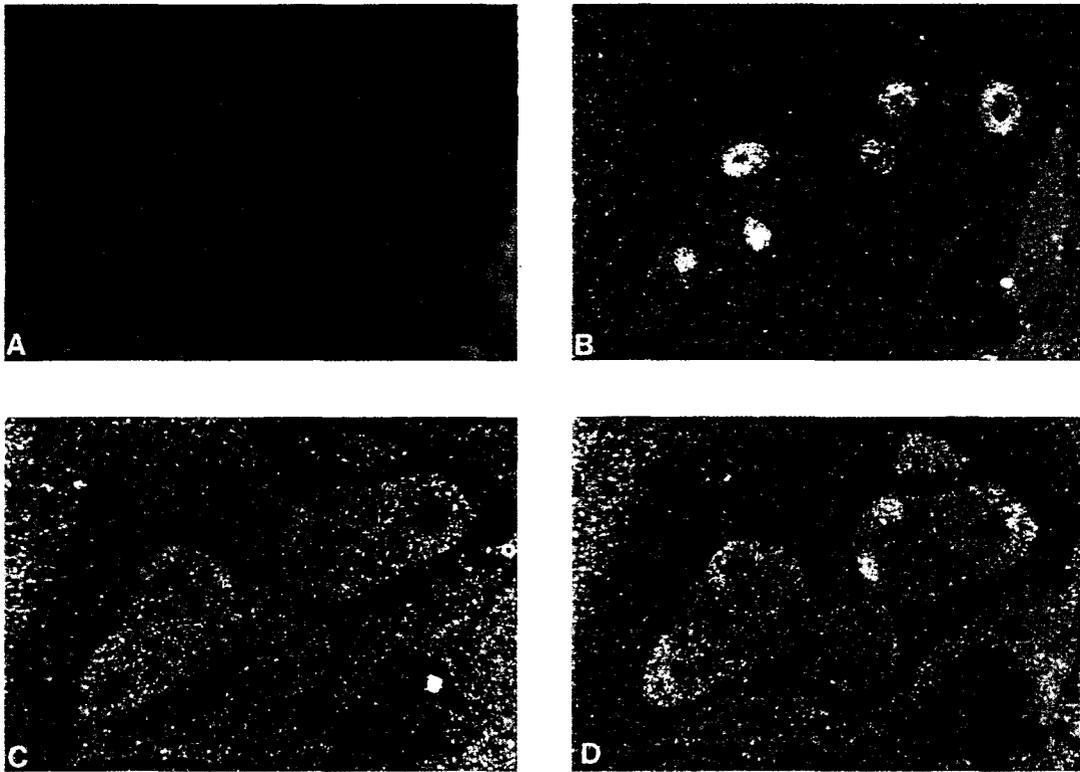


FIG. 5. Expression of ERM (B), ER81 (C), and PEA3 (D) in transversal sections of the two lungs in a 12.5-day embryo. (A) Hoechst staining control.

nous 70-kDa and 62-kDa proteins corresponding to the ERM and ER81/ETV1 proteins, respectively, in human cell lines (26,32). Concerning endogenous PEA3 protein, neither our anti-PEA3 antibody (32) nor the commercial one (produced by Santa Cruz; 8), was able to detect the endogenous PEA3 protein in several human cell types expressing PEA3 mRNA. However, since this antibody recognizes overproduced PEA3 protein *in vitro* (32), it is possible that the PEA3 translation efficiency may be very low, and the amount of PEA3 protein may be too low to be detectable. This could be explained by the absence of an optimal translation consensus sequence around the ATG of murine and human PEA3.

It has been shown by means of *in situ* hybridization experiments that all three genes are expressed in numerous developing murine organs including brain, kidney, lung, and heart. Moreover, there is a striking correlation between the expression of the PEA3 group members and epitheliomesenchymal interaction events. In fact, they are generally coexpressed in different developing organs, but present

specific sites of expression (42). This is illustrated in the 12.5-day developing mouse lung where ERM expression is specific to bronchoepithelial cells, whereas ER81 expression is observed in the surrounding mesenchyme and PEA3 expression in both compartments (Fig. 5). This suggests that ERM, PEA3, and ER81 are regulated differentially, probably to serve important functions during critical steps of organogenesis.

#### THE PEA3 GROUP MEMBERS IN MAMMARY CANCER

Estrogen and progesterone receptor content has been associated with breast cancer progression and determines responsiveness to antihormonal treatment. However, current antihormonal treatment is effective in only a third of cases, and this has led to a search for genes that either are responsible for the loss of hormone-responsiveness or confer autonomous growth. Several candidate genes including overexpressed, amplified, and/or mutated oncogenes

have been shown to be involved in mammary tumorigenesis and metastasis. A functional Ets-binding site is present in the HER2/ErbB-2/neu promoter in human breast cancer cells (43). Transgenic murine models carrying a putative oncogene under the control of a specific targeted promoter have been used to characterize the genes that, when mutated or overexpressed, induce tumors in the mammary gland (for review, see 44), and transgenic animals bearing the tyrosine kinase receptor *neu* oncogene have been shown to overexpress PEA3 mRNA in mammary adenocarcinomas (45). The characterization of the mRNA level and the protein expression of the three PEA3 group members in human breast cancer cell lines made it possible to show that two normal epithelial breast cell lines significantly express these genes (32). This is in good agreement with the data showing that PEA3 is expressed in the normal murine mammary gland (8). More particularly, ER81 expression is inversely correlated to estrogen and progesterone receptor expression.

The differential expression of these transcription factors in specific breast cancer cell lines led us to hypothesize potential roles in specific breast cancer regulation pathways. Several targets of the PEA3 proteins were determined as being the matrix metalloproteinase enzymes. Tumor metalloproteinases are enzymes that can degrade the extracellular matrix, thereby facilitating tumor growth, invasion, and metastasis (for review, see 46). Increased metalloproteinase expression has been associated with malignant progression in *in vivo* models of cancer development. It has recently been demonstrated that PEA3 is able to transactivate the promoters of types I and IV collagenase as well as type I stromelysin (33).

The high expression of the PEA3 group members in certain types of breast cancer cells could be linked to their metastatic potential. Moreover, it has been shown that overexpressed human PEA3/E1AF confers an invasive phenotype on MCF-7 cells (47) by turning on the type IV collagenase expression.

## CONCLUSION

The PEA3 group members are transcription factors of the Ets family that are expressed in several normal and cancerous tissues. They are involved in several pathways, but their precise roles remain to be defined. Characterization of their target genes is probably the simplest way to elucidate them.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Agnès Begue, Isabelle Damour, Anne-Claire Flourens, Bertrand Goudeau, Jean-Philippe Michalak, and Laurent Pouilly for their technical assistance. F.L. is in receipt of a Long-Term Fellowship from EMBO. This work has been carried out on the basis of grants awarded in part by the Centre National de la Recherche Scientifique (France), the Fonds National de la Recherche Scientifique (Belgium), the Association pour la Recherche contre le Cancer (France), and the Ligue Contre le Cancer (France).

## REFERENCES

1. Crépieux P, Coll J, Stéhelin D. Ets family of proteins: Weak modulators of gene expression in quest of transcriptional partners. *Crit Rev Oncol* 5:615-638, 1994.
2. Karim FD, Urness LD, Thummel CS, Klemsz MJ, McKercher SR, Celada A, Van Beveren C, Maki RA, Gunther K, Nye JA, Graves BJ. The ETS domain: A new DNA binding motif that recognizes a purine-rich core sequence. *Genes Dev* 4:1451-1453, 1990.
3. Werner MH, Clore GM, Fisher CL, Fisher RJ, Trinh L, Shiloach J, Gronenborn AM. The solution structure of the human ETS-1 DNA complex reveals a novel mode of binding and true side chain intercalation. *Cell* 83:761-771, 1995.
4. Shore P, Bisset L, Lakey J, Waltho JP, Virden R, Sharrocks AD. Characterization of the Elk-1 DNA-binding domain. *J Biol Chem* 270:5805-5811, 1995.
5. Laudet V, Niel C, Duterque M, Leprince D, Stéhelin D. Evolution of the *ets* gene family. *Biochem Biophys Res Commun* 190:8-14, 1993.
6. Wasylyk B, Hahn SL, Giovane A. The Ets family of transcription factors. *Eur J Biochem* 211:7-18, 1993.
7. Janknecht R, Nordheim A. Gene regulation by Ets proteins. *Biochim Biophys Acta* 1155:346-356, 1993.
8. Xin JH, Cowie A, Lachance P, Hassell JA. Molecular cloning and characterization of PEA3, a new member of the *Ets* oncogene family that is differentially expressed in mouse embryonic cells. *Genes Dev* 6:481-496, 1992.
9. Higashino F, Yoshida K, Kamio K, Fujinaga K. Isolation of a cDNA encoding the adenovirus E1A enhancer binding protein: A new human member of the *ets* oncogene family. *Nucleic Acids Res* 21:547-553, 1993.
10. Brown TA, McKnight SL. Specificities of protein-protein and protein-DNA interaction of GABP $\alpha$  and two newly defined *ets*-related proteins. *Genes Dev* 6:2502-2512, 1992.
11. Jeon I-S, Davis JN, Braun BS, Sublett JE, Roussel MF, Denny CT, Shapiro DN. A variant Ewing's sarcoma translocation (7;22) fuses the EWS gene to the ETS gene ETV1. *Oncogene* 10:1229-1234, 1995.
12. Monté D, Coutte L, Baert JL, Angeli I, Stéhelin D, de Launoit Y. Molecular characterization of the Ets-related human transcription factor ER81. *Oncogene* 11:771-779, 1995.
13. Monté D, Baert JL, Defossez PA, de Launoit Y, Stéhelin D. Molecular cloning and characterization of human ERM, a new member of the ETS family closely related to mouse

- PEA3 and ER81 transcription factors. *Oncogene* 9:1397-1406, 1994.
14. Monté D, Coutte L, Dewitte F, Defossez PA, Le Coniat M, Stéhelin D, Berger R, de Launoit Y. Genomic organization of the human ERM (ETV5) gene, a PEA3 group member of Ets transcription factors. *Genomics* 35:236-240, 1996.
  15. Nakae K, Nakajima K, Inazawa J, Kitaoka T, Hirano T. ERM, a PEA3 subfamily of Ets transcription factors, can cooperate with c-Jun. *J Biol Chem* 270:23795-23800, 1995.
  16. Isobe M, Yamagishi F, Yoshida K, Higashino F, Fujinaga K. Assignment of the ets-related transcription factor E1A-F gene (ETV4) to human chromosome region 17q21. *Genomics* 28:357-359, 1995.
  17. Osborne-Lawrence S, Welsch PL, Spillman M, Chandrasekharappa SC, Gallardo TD, Lovett M, Bowcock AM. Direct selection of expressed sequences within a 1-Mb region flanking BRCA1 on human chromosome 17q21. *Genomics* 25:248-255, 1995.
  18. Delattre O, Zucman J, Plougastel B, Desmaze C, Melot T, Peter M, Kovar H, Joubert I, de Jong P, Rouleau G, Aurias A, Thomas G. Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumors. *Nature* 359:162-165, 1992.
  19. Zucman J, Melot T, Desmaze C, Ghysdael J, Plougastel B, Peter M, Zucker JM, Triche TJ, Sheer D, Turc-Carel C, Ambros P, Combaret V, Lenoir G, Aurias A, Thomas G, Delattre O. Combinatorial generation of variable fusion proteins in the Ewing family of tumors. *EMBO J* 12:4481-4487, 1993.
  20. Urano F, Umezawa A, Hong W, Kikuchi H, Hata J. A novel chimera gene between *EWS* and *E1A-F*, encoding the adenovirus E1A enhancer-binding protein, in extraosseous Ewing's sarcoma. *Biochem Biophys Res Commun* 219:608-612, 1996.
  21. Kaneko Y, Yoshida K, Handa M, Toyoda Y, Nishihira H, Tanaka Y, Sasaki Y, Ishida S, Higashino F, Fujinaga K. Fusion of an ETS-family gene, E1A-F, to EWS by t(17;22)(q12;q12) chromosome translocation in an undifferentiated sarcoma of infancy. *Genes Chromosomes Cancer* 15:115-121, 1996.
  22. May WA, Lessnick SL, Braun BS, Klemsz M, Lewis BC, Lunsford LB, Hromas R, Denny CT. The Ewing's sarcoma EWS/FLI-1 fusion gene encodes a more potent transcriptional activator and is a more powerful transforming gene than FLI-1. *Mol Cell Biol* 13:7393-7398, 1993.
  23. Braun BS, Frieden R, Lessnick SL, May W, Denny CT. Identification of target genes for the Ewing's sarcoma EWS/FLI fusion protein by representational difference analysis. *Mol Cell Biol* 15:4623-4630, 1995.
  24. Lessnick SL, Braun BS, Denny CT, May WA. Multiple domains mediate transformation by the Ewing's sarcoma EWS/FLI-1 fusion gene. *Oncogene* 10:423-431, 1995.
  25. Janknecht R. Analysis of the ERK-stimulated ETS-transcription factor ER81. *Mol Cell Biol* 16:1550-1556, 1996.
  26. Janknecht R, Monté D, Baert D, de Launoit Y. The Ets-related transcription factor ERM is a nuclear target of signaling cascades involving MAPK and PKA. *Oncogene* 13:1745-1754, 1996.
  27. Laget MP, Defossez PA, Albagli O, Baert JL, Dewitte F, Stéhelin D, de Launoit Y. Two functionally distinct domains responsible for transactivation by the ETS family member ERM. *Oncogene* 12:1325-1336, 1996.
  28. Fisher RJ, Mavrothalassitis G, Kondoh A, Papas TS. High-affinity protein-DNA interactions of the cellular ETS1 protein: Determination of the ETS binding motif. *Oncogene* 6:2249-2254, 1991.
  29. Woods DB, Ghysdael J, Owen MJ. Identification of nucleotide preferences in DNA sequences recognized specifically by c-Ets-1 protein. *Nucleic Acids Res.* 20:699-704, 1992.
  30. Zhang L, Lemarchandel V, Romeo PH, Ben-David Y, Greer P. The Fli-1 proto-oncogene, involved in erythroleukemia and Ewing's sarcoma, encodes a transcriptional activator with DNA-binding specificities distinct from other Ets family members. *Oncogene* 8:1621-1630, 1993.
  31. Ray-Gallet D, Mao C, Tavitian A, Moreau-Gachelin F. DNA binding specificities of Spi-1/PU.1 and Spi-B transcription factors identification of a Spi-1/Spi-B binding site in the c-fes/c-fps promoter. *Oncogene* 11:303-313, 1995.
  32. Baert JL, Monté D, Musgrove EA, Albagli O, Sutherland RL, de Launoit Y. Expression of the PEA3 group of Ets-related transcription factors in human breast cancer cells. *Int J Cancer* 70:590-597, 1997.
  33. Higashino F, Yoshida K, Noumi T, Seiki M, Fujinaga K. Ets-related protein E1A-F can activate three different matrix metalloproteinase gene promoters. *Oncogene* 10:1461-1463, 1995.
  34. Chen JH, Vercamer C, Li Z, Paulin D, Vandembunder B, Stéhelin D. PEA3 transactivates vimentin promoter in mammary epithelial and tumor cells. *Oncogene* 13:1667-1675, 1996.
  35. de Launoit Y, Audette M, Plaza S, Baert JL. The ERM transcription factor activates the intercellular adhesion molecule-1 transcription through an Ets binding site. [Submitted for publication]
  36. Defossez PA, Monnot M, de Launoit Y. The ETS family member ERM contains an alpha helical acidic transactivation domain. [Submitted for publication]
  37. Schneikert J, Peterziel H, Defossez PA, Klocker H, de Launoit Y, Cato ACB. Androgen receptor-Ets protein interaction: A novel mechanism for steroid hormone mediated down modulation of matrix-metalloproteinase expression. *J. Biol. Chem.* 271:23907-23913, 1996.
  38. Janknecht R, Ernst W, Pingoud V, Nordheim A. Activation of ternary complex factor Elk-1 by MAP kinases. *EMBO J* 12:5097-5104, 1993.
  39. Whitmarsh AJ, Shore P, Sharrocks AD, Davis RJ. Integration of MAP kinase signal transduction pathways at the serum response element. *Science* 269:403-407, 1995.
  40. O'Hagan RC, Tozer RG, Symons M, McCormick F, Hassell JA. The activity of the Ets transcription factor PEA3 is regulated by two distinct MAPK cascades. *Oncogene* 13:1323-1333, 1996.
  41. Romano-Spica V, Suzuki H, Georgiou P, Chen S-L, Ascione R, Papas TS, Bhat NK. Expression of ets family genes in hematopoietic cells. *Int J Oncol* 4:521-531, 1994.
  42. Chotteau-Lelièvre A, Desbiens X, Pelczar H, Defossez PA, de Launoit Y. Differential expression patterns of the PEA3

- group transcription factors through embryonic development. *Oncogene*. [In press]
43. Scott GK, Daniel JC, Xiong X, Maki RA, Kabat D, Benz CC. Binding of an ETS-related protein within the DNase I hypersensitive site of the *HER2/neu* promoter in human breast cancer cells. *J Biol Chem* **269**:19848-19858, 1994.
  44. Cardiff RD, Muller WJ. Transgenic mouse models of mammary tumorigenesis. *Cancer Surveys* **16**:97-113, 1993.
  45. Trimble MS, Xin JH, Guy CT, Muller WJ, Hassell JA. PEA3 is overexpressed in mouse metastatic mammary adenocarcinomas. *Oncogene* **8**:3037-3042, 1993.
  46. Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. Metalloproteinases and cancer invasion. *Semin Cancer Biol* **1**:99-106, 1990.
  47. Kaya M, Yoshida K, Higashino F, Mitaka T, Ishii S, Fujinaga K. A single ets-related transcription factor, E1AF, confers invasive phenotype on human cancer cells. *Oncogene* **12**:221-227, 1996.



# Differential expression patterns of the PEA3 group transcription factors through murine embryonic development

Anne Chotteau-Lelièvre<sup>1,2</sup>, Xavier Desbiens<sup>2</sup>, Hélène Pelczar<sup>1</sup>, Pierre-Antoine Defossez<sup>1</sup> and Yvan de Launoit<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Mécanismes du Développement et de la Cancérisation, UMR 319 CNRS/Institut Pasteur de Lille - Institut de Biologie de Lille, 1 rue Calmette, BP 447, 59021 Lille Cedex, France; <sup>2</sup>Centre de Biologie Cellulaire, Unité Dynamique des Cellules Embryonnaires et Cancéreuses, Bâtiment SN3, USTL, Villeneuve d'Ascq, France

ERM, ER81 and PEA3 are three highly related transcription factors belonging to the ETS family. Together they form the PEA3 group within this family. Little data is yet available regarding the roles of these three genes during embryonic development. A prerequisite to investigations in this field is to obtain an accurate spatio-temporal expression map for the *erm*, *er81* and *pea3* genes. To this end, we have used *in situ* hybridization to compare their expression patterns during critical stages of murine embryogenesis. We report that all three genes are expressed in numerous developing organs coming from different embryonic tissues. The three genes appeared co-expressed in different organs but presented specific sites of expression, so that the resultant expression pattern could in fact reveal several distinct functions depending upon isolated and/or various combinations of the PEA3 member expression. These results suggest that *erm*, *er81* and *pea3* genes are differentially regulated, probably to serve important functions as cell proliferation control, tissue interaction mediator or cell differentiation, all over successive steps of the mouse organogenesis.

**Keywords:** murine embryogenesis; *ets* genes; PEA3 group; transcription factor

## Introduction

In pluricellular organisms, intercellular signalling plays a key role in the control of many developmental decisions such as the regulation of growth control, differentiation and cell fate specification. Each kind of their development is the result of the spatially and temporally coordinated expression of a variety of genes under the control of transcription regulators.

Genes of the ETS family encode transcription factors conserved throughout the metazoan species ranging from diploblastic organisms to *Drosophila* and Vertebrates (Degnan *et al.*, 1993). Ets proteins are characterized by a region of approximately 85 amino acids, named the ETS domain, which defines a sequence-specific DNA-binding motif. This domain binds as a monomer to the core sequence 5'-GGAA/T-3' (Karim *et al.*, 1990; Nye *et al.*, 1992) and can be assigned to the helix–turn–helix super family of DNA

binding domains (Donaldson *et al.*, 1994; Liang *et al.*, 1994; Shore *et al.*, 1995; Werner *et al.*, 1995). Divergence rate analysis between the different ETS domains has revealed that the *ets* gene family can be divided into nine different groups (Laudet *et al.*, 1993; Lautenberger *et al.*, 1992).

ETS family members have been shown to be implicated in oncogenesis. In fact, *v-ets* (which is the viral counterpart of *c-ets-1*) is partly responsible for the oncogenic effect of the E26 chicken leukemia virus (LePrince *et al.*, 1983; Metz & Graf, 1991). The *sp1* and *fli* genes are implicated in Friend murine erythroleukemia after retroviral insertion (Ben David *et al.*, 1991; Moreau *et al.*, 1988). Other Ets members are associated to disorders when included in chimeric proteins following translocation events as exemplified by Ews-Fli1 (Delattre *et al.*, 1992), Ews-Erg (Zucman *et al.*, 1993), Tls/Fus-Erg (Shimizu *et al.*, 1993) and Tel-PDGFR $\beta$  (Golub *et al.*, 1994) (for review see Crépieux *et al.*, 1994). Transcription-regulatory regions of genes that encode growth factors, oncoproteins, transcription factors and extracellular matrix metalloproteases (MMPs) implicated in the invasion and metastasis of tumor cells, contain binding sites for Ets transcription factors (for review, see Crépieux *et al.*, 1994).

The Ets-related proteins have been shown to be transcriptional activators or inhibitors, cooperating with other nuclear oncogenes and forming nucleoprotein complexes through protein-protein interactions (for review see Crépieux *et al.*, 1994). Recent reports propose different Ets proteins as effectors of the Ras/Raf/ERK pathway (Brunner *et al.*, 1994; O'Neill *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1996), with the phosphorylation of certain of these Ets proteins increasing their transactivating potential. Elk is associated with SRF to induce the serum activation of the *c-fos* proto-oncogene and can be activated by Ras through both the ERK and JNK kinases (for review see Treisman, 1995).

Some data are available concerning the expression of *ets* genes during development or in adult mouse or chicken stages. *ets-1* and *ets-2* are expressed in multiple tissues during embryo formation (Kola *et al.*, 1993; Maroulakou *et al.*, 1994; Quéva *et al.*, 1993), and are implicated in developing endothelial network (Pardanaud and Dieterlen-Lievre, 1993; Vanbenbunder *et al.*, 1989), in lymphoid cell development and activation (Bhat *et al.*, 1987; Bhat *et al.*, 1989) and in invasion and metastasis (Delannoy-Courdent *et al.*, 1996; Vandendunder *et al.*, 1994–1995); *Spi/PU-1* is involved in erythroblast maturation (Paul *et al.*, 1991; Romano-Spica *et al.*, 1994; Schuetze *et al.*, 1993; Scott *et al.*, 1994) whereas *erg* expression is associated with

Correspondence: Y de Launoit

This paper is dedicated to the late Dr Marie-Pierre Laget  
Received 17 February 1997; revised 7 May 1997; accepted 7 May 1997

precartilaginous condensation and cartilaginous differentiation (Dhordain *et al.*, 1995). It has been recently demonstrated that this latter gene is expressed very early during ectopic cartilage formation (Ganan *et al.*, 1996).

The PEA3 group contains three members: PEA3 in the mouse (Xin *et al.*, 1992) and in the human (Higashino *et al.*, 1993), ER81 in the mouse (Brown and McKnight, 1992) and in the human (Jeon *et al.*,

1995; Monté *et al.*, 1995) and ERM in the human (Monté *et al.*, 1994), which are more than 95% identical within the ETS domain, more than 85% within the acidic domain, which is localized in the amino-terminal part of the proteins, and almost 50% overall. The amino- and carboxy-terminal-conserved domains correspond to transactivating domains (Janknecht, 1996; Janknecht *et al.*, 1996; Laget *et al.*, 1996; Nakae *et al.*, 1995), with the acidic domain being

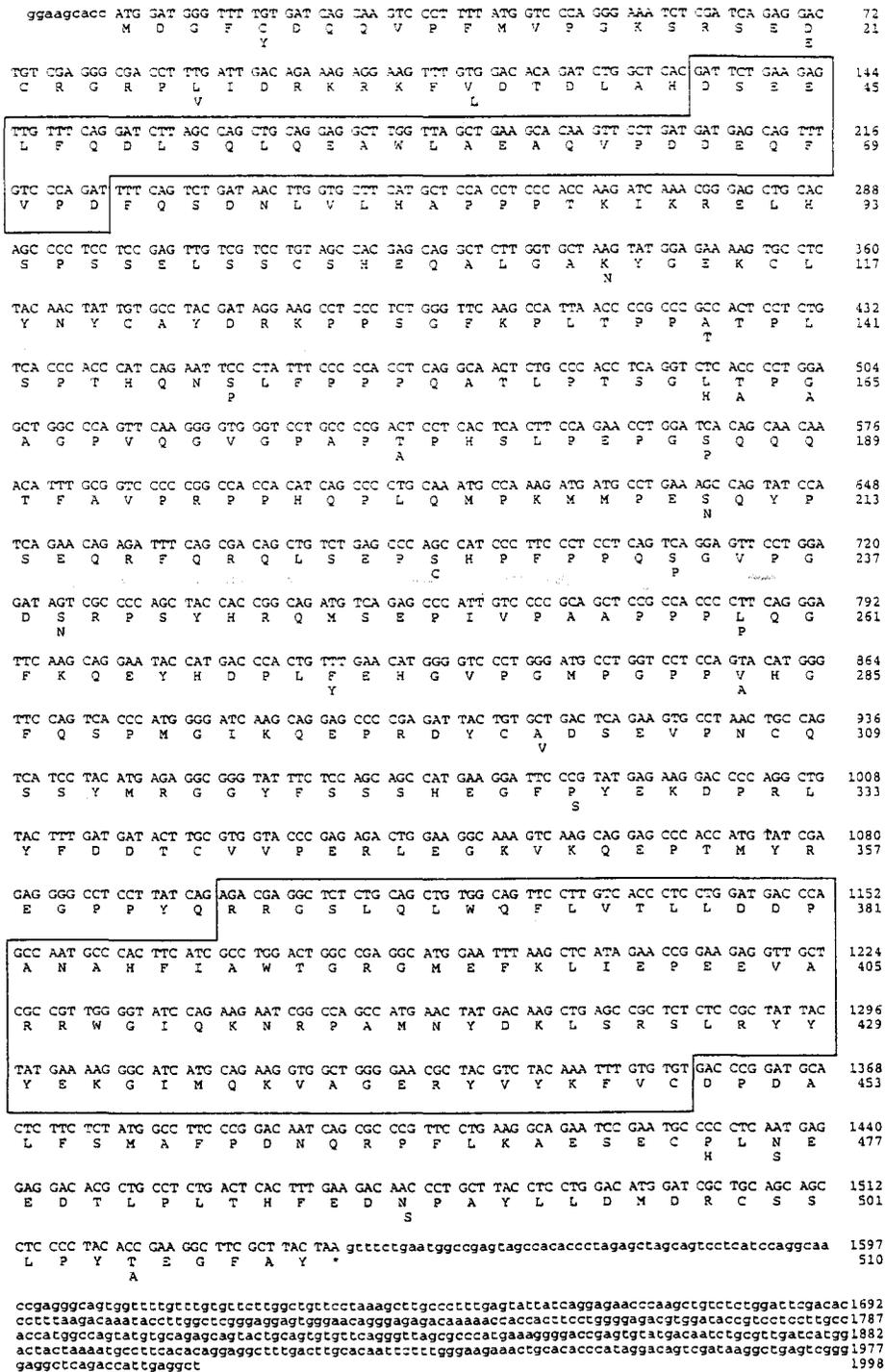


Figure 1 Nucleotide and predicted amino acid sequences of murine *erm* cDNA. The nucleotide and amino acid positions are indicated to the right of the sequence. The nucleotides corresponding to the open reading frame and the 5'- and 3'-untranslated regions are in capital and small letters respectively. The differences in amino acids between mouse ERM and human ERM (Monté *et al.*, 1994) are given below the deduced sequence. The boxed regions correspond to the acidic domain in the N-terminal part and to the ETS domain in the carboxy-terminal part

formed by a helix crucial for transactivation (Defossez and de Launoit, unpublished data). Although little is known about the functional roles of these PEA3 members, different data demonstrate their implication in cancerogenesis. PEA3 overexpression is associated with metastasis of mouse mammary tumor cells (Trimble *et al.*, 1993) and of squamous carcinoma cell lines (Shindo *et al.*, 1996). Furthermore, *pea3* behaves as an oncogene since it can turn a non-invasive breast cancer cell line into an invasive one (Kaya *et al.*, 1996). Consistent with this result, it has been recently demonstrated that PEA3 can up-regulate matrix metalloproteinases such as type I collagenase or type IV collagenase (Shindo *et al.*, 1996). ER81 as well as PEA3 are implicated in some cases of Ewing's sarcoma as oncoproteins resulting from the fusion with a transactivating domain of the EWS protein (Jeon *et al.*, 1995; Urano *et al.*, 1996).

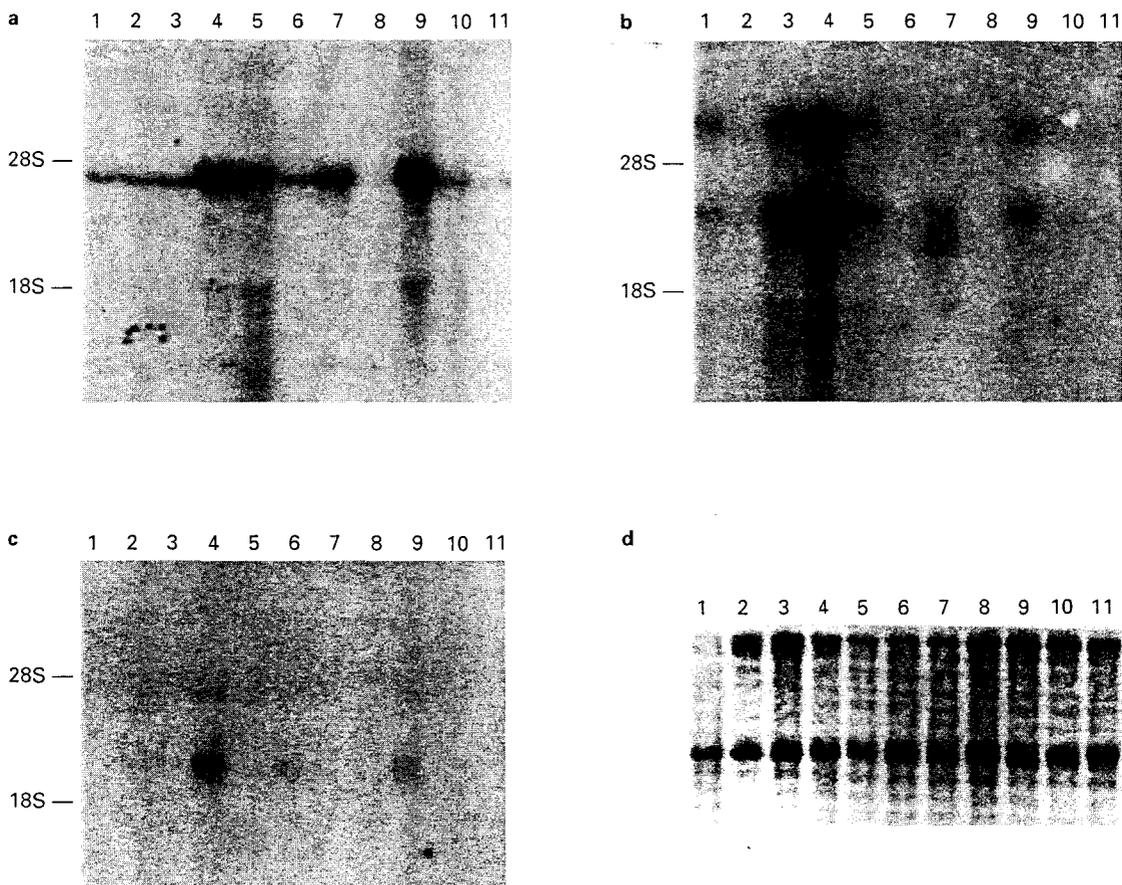
The three PEA3 group member genes display very high sequence similarity and conservation of functional domains, so raising the possibility that they may carry out redundant functions. It was thus of interest to determine whether their expression sites were similar or dissimilar. To understand the involvement of these members in embryonic development, the first step is to localize the expression of the different genes at tissue and cell levels. In this report we presented the cloning of the murine *erm* homolog cDNA and compare by *in situ* hybridization the

expression pattern of the three PEA3 group genes *erm*, *er81* and *pea3* during murine embryonic development in order to gain more insights into their potential implication in morphogenesis processes. These three genes are expressed in cellular sheets arising from the three primitive layers, the ectoderm, the mesoderm and the endoderm. Together with colocalized expression sites, it appears that in a defined organ, the three gene expressions concern different tissular compartments or different cell types. According to their expression patterns, *erm*, *er81* and *pea3* appear highly expressed in association with proliferation and migration events. In fact, these patterns also suggest different functions for each gene. Thus, *erm*, *er81* and *pea3* may serve important signaling pathways in organogenesis and in several tissues during successive stages of murine development.

## Results

### Isolation of mouse *erm* cDNA

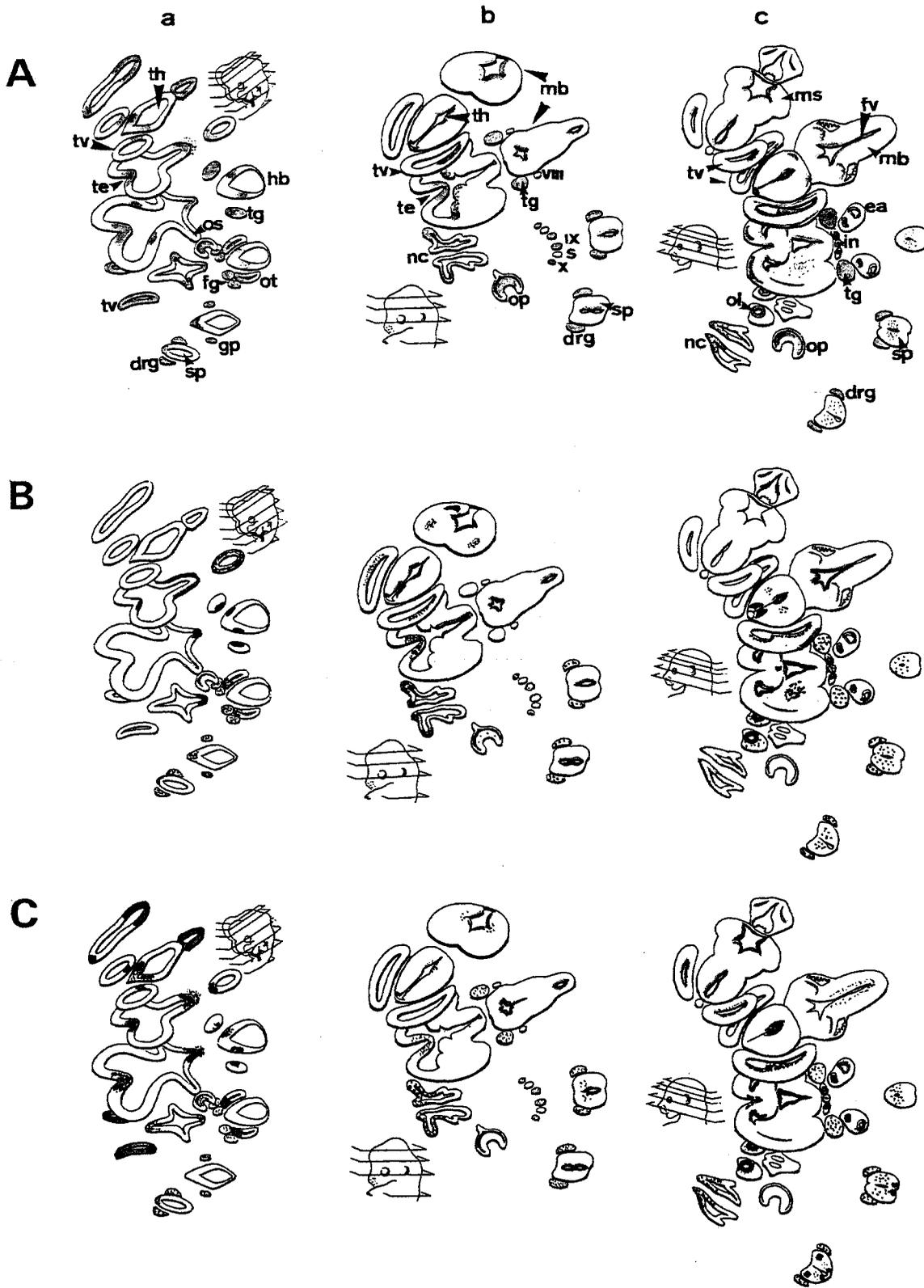
Human *erm* cDNA previously cloned (Monté *et al.*, 1994) and containing the open reading frame of ERM was chosen for screening of a 8.5 embryonic mouse cDNA library kindly provided by Dr B Hogan. Five mouse cDNA clones were isolated and sequencing



**Figure 2** Northern blot analysis of *erm* (a), *er81* (b) and *pea3* (c) expression. Fifteen micrograms of total RNA from adult tissues were hybridized with mouse *erm*, *er81* and *pea3* <sup>32</sup>P-labeled probes. 28S and 18S RNA positions are indicated. Lane 1, heart; lane 2, salivary gland; lane 3, kidney; lane 4, brain; lane 5, lung; lane 6, skeletal muscles; lane 7, testis; lane 8, liver; lane 9, colon; lane 10, ovary; lane 11, ileum. (d) ethidium bromide staining of RNA

revealed that two overlapping phages contained the first in-frame ATG codon and the stop codon similar to human *erm*. The 5' region contained nine

nucleotides upstream from the ATG and the 3'-untranslated region of this clone is 456 bp long. No classical polyadenylation consensus was detected.

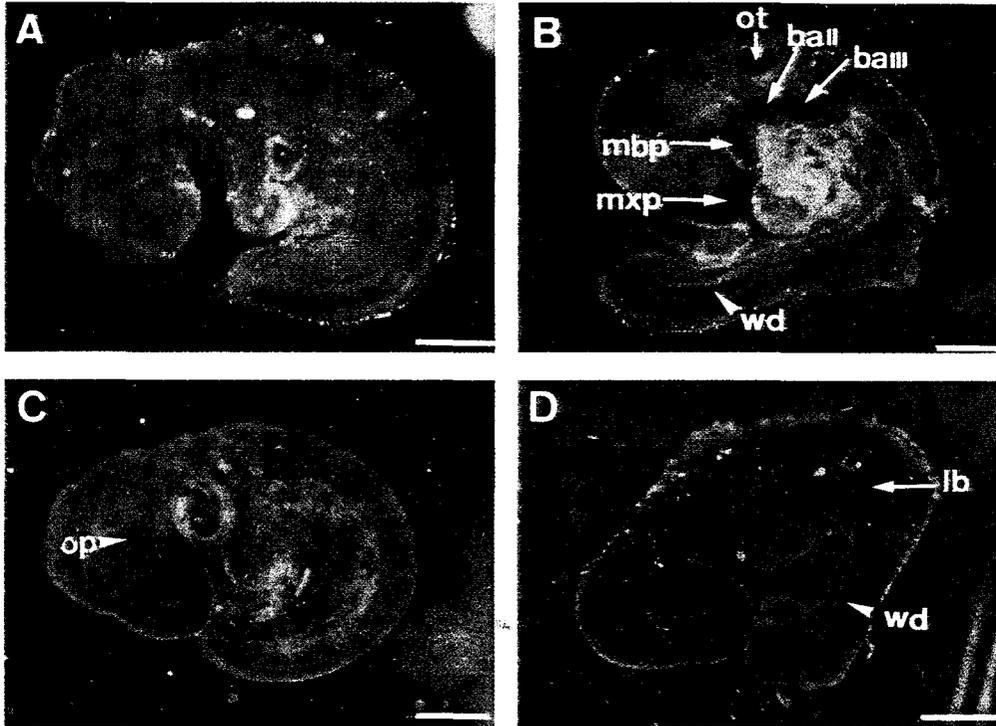


**Figure 3** Schematic reconstitution of *erm* (A, in green), *er81* (B, in red) and *pea3* (C, in blue) expression in the central nervous system at three developmental stages: 10.5 days (a), 13.5 days (b) and 15.5 days (c). drg, dorsal root ganglion; ea, ear components; fg, facio-acoustic (VII-VIII) ganglion; fv, fourth ventricle; gp, glossopharyngeal ganglion; hb, hindbrain; in, infundibulum; mb, midbrain; ms, mesencephalon; nc, nasal cavity; ol, olfactory lobe; op, optic vesicle; os, optic stalk; ot, otic vesicle; s, sympathetic ganglion; sp, spinal cord; te, telencephalon; tg, trigeminal ganglion; th, third ventricle; tv, telencephalic vesicle; IX, IX ganglion; X, X ganglion

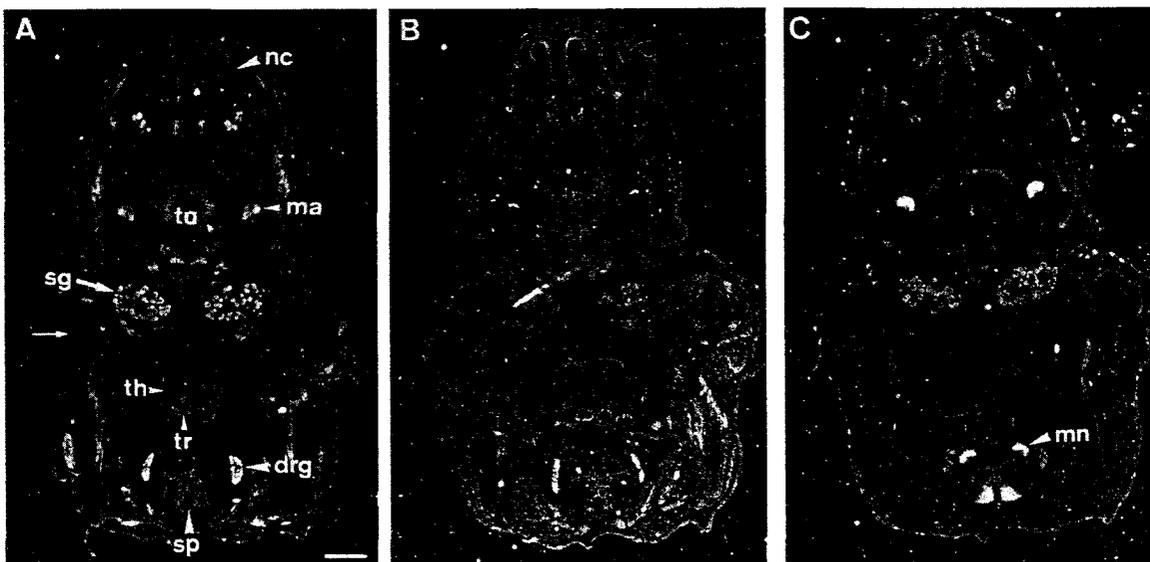
Indeed, the data obtained on the expression of this gene indicate that this clone is truncated in its 5'- and/or 3'-untranslated region and that the corresponding RNA messenger is about 4.0 kb (see in the Northern blot analysis section).

The sequence around the first in-frame initiating codon, CACCATGG (Figure 1), contained the consensus sequence required for optimal initiation by eukaryotic ribosomes (Kozak, 1991), similar as the human *erm* cDNA (Monté *et al.*, 1994). The open

reading frame starting at the first ATG encoded for a continuous protein of 510 AA of 95% identity with the human ERM protein (Figure 1). The calculated molecular mass of the product was 57 724 Da. The translation of the open reading frame predicts a protein which is rich in proline (13.5%), leucine (7.8%) and glutamine (7.3%) residues. As illustrated in Figure 1, residue alignment of the mouse (this report) and the human ERM protein (Monté *et al.*, 1994) revealed that the acidic and the ETS domains are fully conserved.



**Figure 4** Whole mount *in situ* analysis of *erm* (b), *er81* (c) and *pea3* (d) expression in 9.5 day embryos. baII, second branchial arch; baIII, third branchial arch; lb, limb bud; mbp, mandibular process; mxp, maxillar process; op, optic vesicle; ot, otic vesicle; wd, Wolffian's duct. (a), Control *erm* sense probe. Bar: 500  $\mu$ m



**Figure 5** Expression of *erm* (a), *er81* (b) and *pea3* (c) in transversal sections of a 15.5 day old embryo. Darkfield views. drg, dorsal root ganglion; ma, molar anlagen; nc, nasal cavity; sg, salivary gland; sp, spinal cord; th, thymus; tr, trachea; to, tongue; cartilage (arrow). Bar: 550  $\mu$ m

### Northern blot analysis

Northern blot analysis was performed on mice organs to verify the hybridization specificity of each of the probes. The expressions of the three PEA3 members are seen on different organs from three week old mice. As shown in Figure 2, a 4.0 kb transcript corresponding to *erm* was present at different levels in all the organs tested (except the liver). *er81* (two transcripts at 3.2 and 6.4 kb) was expressed in a majority of the organs tested according to the data obtained in embryos. In contrast, the 2.4 kb transcript corresponding to the expression of *pea3* was restricted to a few organs including the brain, the skeletal muscles and the colon. These results confirm previous data (Monté *et al.*, 1994) and demonstrate that there is no cross-hybridization between the probes and the three target genes, in terms of their different patterns of expression and the sizes of the respective products.

### Expression in ectoderm derivatives

**Central nervous system** The expression sites of *erm*, *er81* and *pea3* in the nervous system are summarized in a schematic reconstitution of three developmental stages (Figure 3). From the completion of the neural tube closure to late embryonic neurogenesis, the three genes were expressed in specific regions of the brain neuroepithelium as in different cranial ganglia (see also neural crest derivatives). A conspicuous *erm* and *pea3* co-expression was detected in specific regions of the forebrain neuroepithelium including the telencephalon vesicles and the diencephalon and the wall of the hindbrain. *er81* was weakly or not at all expressed in

these neuroepithelial structures but rather in the cephalic mesenchyme. *erm* and *pea3* expression was also detected in the cephalic mesenchyme. As neural development proceeds, *erm* and *pea3* expressions become restricted to the cells lining ventricles rather than in differentiating cells of the neural wall. The evolution of the expression patterns of the three genes is quite different in the spinal cord. Indeed, *erm*, *er81* and *pea3* were co-expressed in the floor plate of the newly formed spinal cord (Figure 3; see also Figure 11). Later, expression areas are very different (Figure 3; see also Figure 5). Moreover, the three genes were expressed in neural derivatives such as the dorsal root and cranial nerve ganglia (facio-acoustic, trigeminal... see also neural crest derivatives).

**Neural crest derivatives** Starting from the neural tube, neural crest cells migrate along various defined routes through the embryo and give rise to different cell types. Cephalic neural crest cells migrate dorsolaterally before the closure of the neural tube and give rise to the cranio-facial mesenchyme which invades the different pharyngeal arches according to their origin along the rostro-caudal axis. As shown in the Figure 4 by using whole mount hybridization we observed a co-expression of *erm* and *pea3* in the first, second and third branchial arches whereas *er81* was weakly expressed in these structures. The cranio-facial mesenchyme will differentiate into cartilage, bone, cranial neurons and connective tissues of the face. Moreover these cells will give rise to odontoblasts of the tooth primordia and the cartilage of inner ear and jaw. As described below, *erm*, *er81* and *pea3* are expressed in the cells of the differentiating odontoblasts and jaw cells (Figure 5).

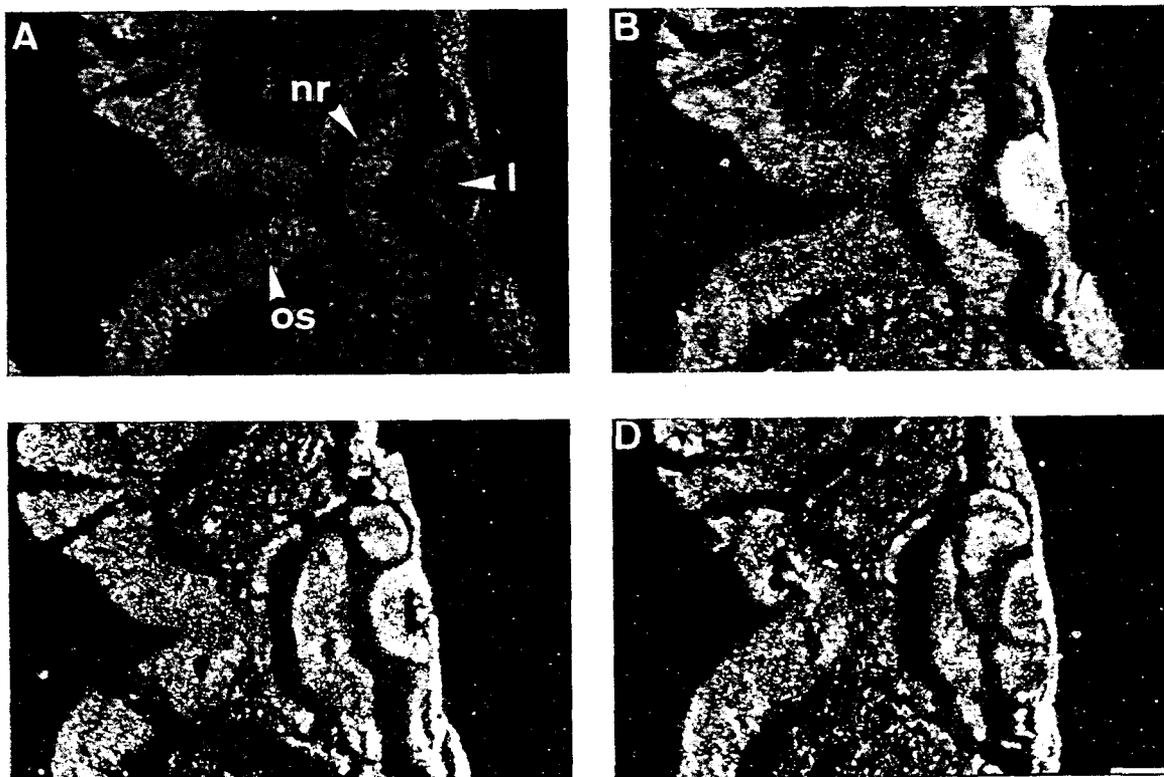


Figure 6 Expression of *erm* (b), *er81* (c) and *pea3* (d) in sections of the eye anlagen in a 10.5 day embryo. Darkfield views and Hoechst staining. (a), Hoechst staining control. l, lens; nr, future neuroretina; os, optic stalk. Bar: 55  $\mu$ m

Cephalic neural crest cells also generate different cephalic ganglia and cervical dorsal root ganglia. As exemplified by the trigeminal ganglion, different expression patterns were observed in the cephalic ganglia: *erm* had a high and homogeneous expression level; *er81* was weakly expressed and *pea3* was highly and punctually expressed in some cell subpopulations. This expression pattern is also observed in the other

ganglia such as the facioacoustic (VII-VIII), the glossopharyngeal (IX) and the vagus (X) ganglia (Figure 3). The same differences in expression could be observed in dorsal root ganglia emanating from the truncal neural crest cells (Figures 3 and 5). In addition, the three genes were expressed in the tongue, jaw regions, tracheal cartilage and in the different neck muscles, all derivating of neural crest cells (Figure 5).

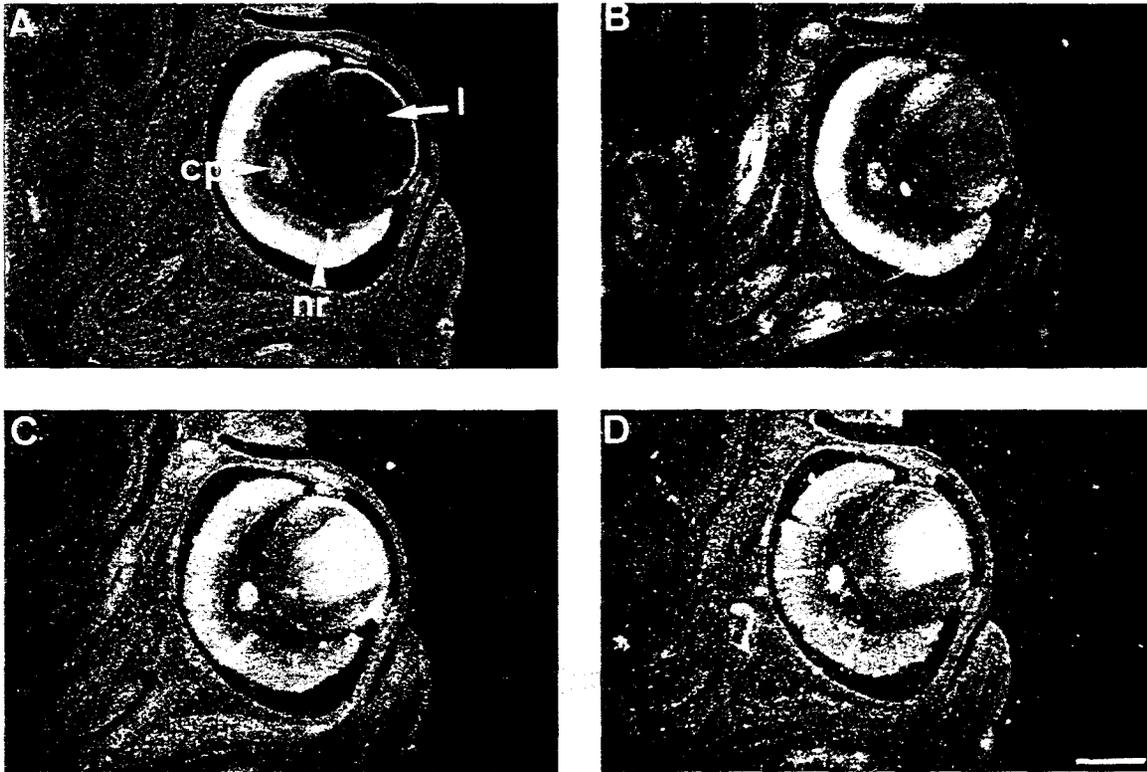


Figure 7 Expression of *erm* (b), *er81* (c) and *pea3* (d) in sections of the eye in a 15.5 day embryo. Darkfield views and Hoechst staining. (a), Hoechst staining control. cp, choroid plexus; l, lens; nr, neuroretina. Bar: 310  $\mu$ m

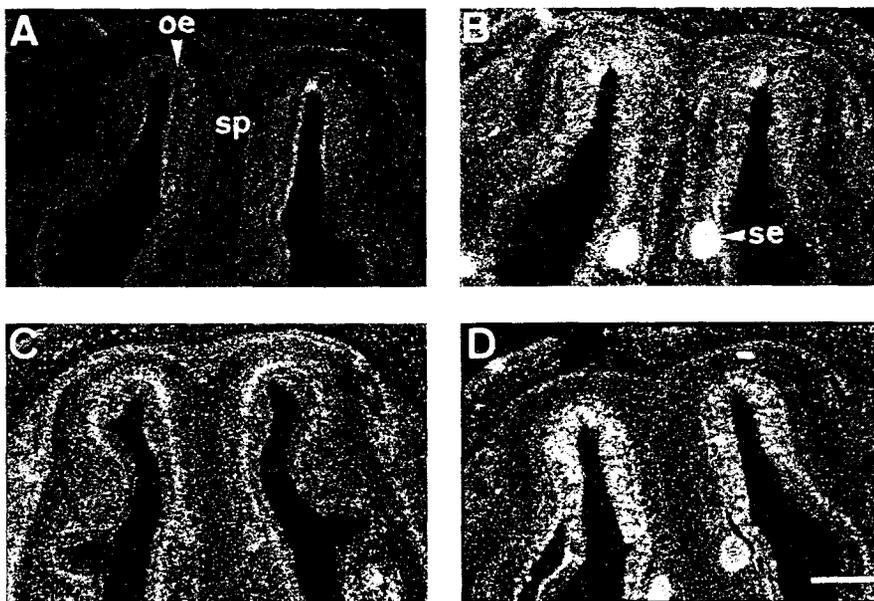


Figure 8 Expression of *erm* (b), *er81* (c) and *pea3* (d) in transversal sections of the olfactory tractus in a 15.5 day embryo. Darkfield views and Hoechst staining. (a), Hoechst staining control. oe, olfactory epithelium; se, serous gland, sp, septum. Bar: 200  $\mu$ m

*Ectoderm implication in organogenesis*

*Eye* Specific regions of the neuroderm instruct the ectodermal placodes to develop according to each sensorial perception system. The optic, olfactory and auditory placodes are then induced to invaginate within the cephalic mesenchyme.

In the case of eye development, the two optic anlagen result from a bilateral evagination of the neuroderm at the basis of the future proencephalon. The optic evagination transforms into optic cups or vesicles and reaches the overlaying ectoderm. While free lenses observed in amphibians raise the question of the role of mesoderm and endoderm in lens formation, the neural optic vesicles are generally believed to induce differentiation in the overlaying surface ectoderm to form the lens placodes. Each lens placode begins to invaginate and detaches itself from the ectoderm to form the lens vesicle. This latter induces differentiation in the inner layer of the optic vesicles to form the neural retina.

As early as E9.5, whole mount hybridization revealed an expression of the three genes in the eye primordia (Figure 4). At E10.5, as the lens pit progressively indented, the expression of the three PEA3 group genes was localized both in the neural layer of the retina and in the lens. *erm* and *er81* were highly expressed in the neuroretina and in the adjacent part of the lens. *pea3* presented a weak level of expression in these two structures (Figure 6). Later, as the lens vesicle differentiated (E13.5 to 15.5) and the neuroretina subdivided into inner and outer neuroblastic layers, both *erm* and *er81* were highly expressed in the outer neuroblastic layer and in the nuclear region of secondary lens fibers located in the equatorial region of the lens. Moreover, *er81* was highly expressed in the anterior lens epithelium, which is a site of lens cell proliferation. In contrast, a slight *pea3* expression was detected in the neuroretina. Moreover, the three

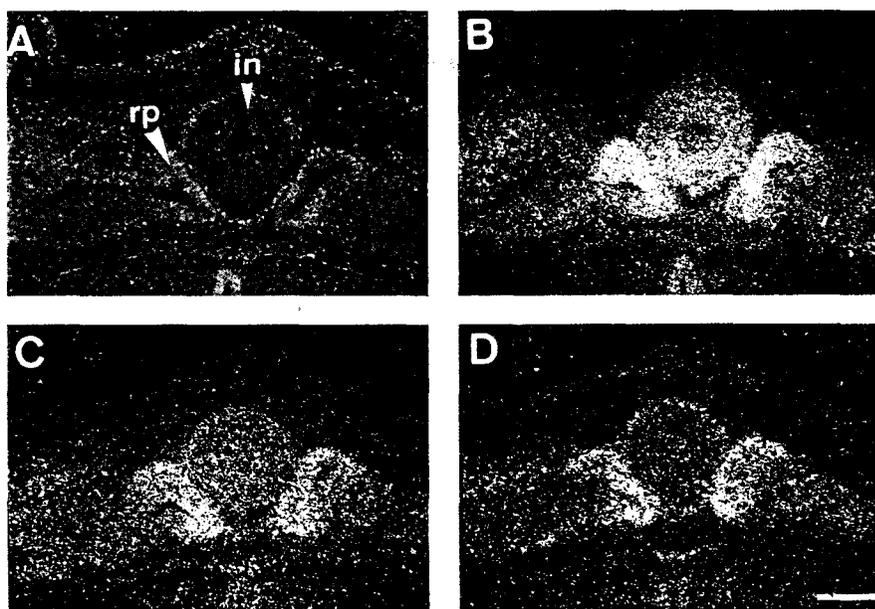
genes were co-expressed in the choroid plexus (Figure 7).

*Olfactory and otic development* At the beginning of the olfactory vesicle formation, a labeling for *erm* and *pea3* was detected in both the epithelium and the adjacent mesenchyme, while *er81* was weakly expressed in the mesenchyme (data not shown). At E15.5 (Figure 8), the expression of *erm* and *pea3* in the olfactory epithelium was restricted to cell subpopulations. In contrast, their expression pattern appeared homogeneous in the adjacent mesenchyme. *er81* was still expressed in the mesenchymal compartment surrounding the epithelial olfactory tree. In the olfactory lobes emerging from the telencephalon, all three genes were co-expressed at inner neuroepithelium level, but did not superimpose in surrounding neuroderm (Figure 3).

The otic placode is induced at E9.5 of development in the ectoderm by the rhombencephalon and invaginates to give rise to the otic vesicle. The inner ear originates from the otic vesicle. The PEA3 group genes displayed a very similar expression pattern either in the olfactive tract or in otic system: *erm* and *pea3* were seen in the induced placodes and vesicles and their expression area decreased as differentiation occurred; *er81* was detected in the surrounding mesenchyme, and later in the otic capsule (data not shown).

*Pituitary gland* The anterior part of the pituitary gland derives from a stomodeal epiblastic placode induced by the chordal system. This placode later invaginates to form the Rathke's pouch and comes in close contact with the neuroderm of the diencephalon, giving rise to the nervous part of the hypophysis. This development is thought to result from mutual interactions.

During the elongation of the Rathke's pouch, we observed an expression of the three PEA3 group members in the epithelial cells of the Rathke's pouch,



**Figure 9** Expression of *erm* (b), *er81* (c) and *pea3* (d) in transversal sections of the pituitary gland in a 15.5 day embryo. Darkfield views. (a), Hoechst staining control. in, infundibulum; rp, anterior lobe of the Rathke's pouch. Bar: 180  $\mu$ m

the adjacent neuroepithelium and the surrounding cephalic mesenchyme. At E15.5, when the anterior part of the Rathke's pouch contacted the infundibulum, both interacting sheets expressed the three genes. However expression levels differed between the two components (Figure 9).

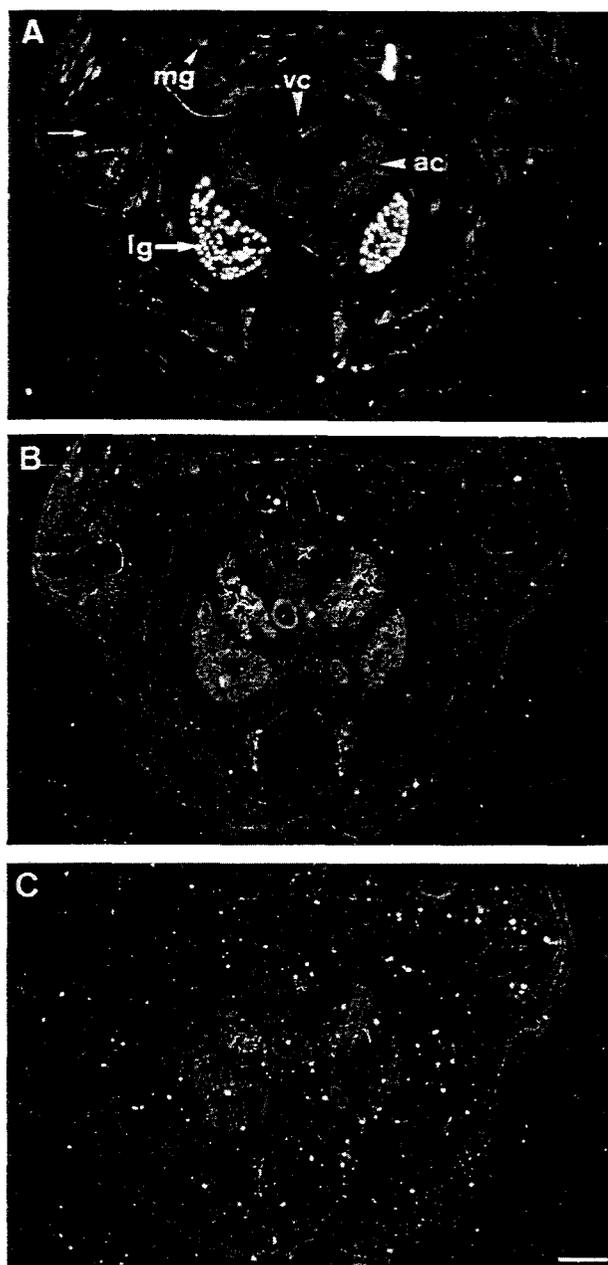
**Tooth** Tooth development is controlled by a series of interactions between oral epithelium and neural-crest-derived mesenchyme resulting in the differentiation of the enamel-secreting ameloblasts and dentin-secreting odontoblasts respectively. At bud stage (E13.5) both compartments of the molar anlagen were labeled by the three probes. At cap stage (E15.5), *erm* and *er81* expression progressively decreased in the apical inner epithelium but remained high at the junction between the outer and inner epithelia. *erm*, *er81* and *pea3* remained strongly expressed in the mesenchymal dental papilla (Figure 5). These expressions preceded the differentiation of both secreting ameloblasts and odontoblasts. Correlating with more differentiated stages, the expression of the three members was less restrictive and was observed at a weak level in the enamel-dense restructured organ and in the dental-loose papilla. No peculiar expression was detected in organizing odontoblasts.

**Mammary gland** The mammary gland is composed of two tissue components, the parenchymal epithelium and the stromal mesenchyme. The epithelium originates from ectodermal cells while the surrounding stroma and adipose tissue derive from the mesoderm. Mammary gland development is a multi-stage process that begins in the embryo with the mammary anlagen, which gives rise to primary and secondary ducts. The development is identical in male or female mice until day 15–16 of gestation. The early stage of development that we studied in a 15.5 day-female embryo showed that the three genes were highly expressed in the epithelial bud of the mammary gland (Figure 10).

#### Expression in mesoderm derivatives

The somites are transient metamereric structures derived from the paraxial mesoderm. As they lose their primitive epithelial characteristics, the ventral medial cells of the somite scatter to form the sclerotome that will later form the axial cartilaginous skeleton. In contrast, the dorso-lateral cells give rise to the dermomyotome. At E10.5 the lateral dermomyotome and the adjacent sclerotomal cells expressed the three genes (Figure 11).

**Skeletal muscles** Two different myogenic cell lineages can be distinguished within the somites: these are on the one hand, the muscles of the limbs on the other hand, the body wall and the axial skeletal muscles. The former (precursors of limb musculature) are derived from the ventro-lateral portion of the dermomyotome immediately adjacent to the limb buds. These cells emigrate from the dermomyotome into the limb, where they differentiate and fuse to form the primary myotubes. The latter (body wall and axial muscles) are derived from the lateral half of the somite which gives rise to myotomal cells.



**Figure 10** Expression of *erm* (a), *er81* (b) and *pea3* (c) in truncal sections of a 15.5 day old embryo. Darkfield views. ac, atrial chamber of the heart; lg, lung; mg, mammary gland; vc, ventricular chamber of the heart; cartilaginous skeleton (arrow). Bar: 520  $\mu$ m

Despite their different origin, the axial, appendicular and body wall muscles presented an important expression of the three members throughout the different developmental stages (see for example Figures 5 and 10). In the adult mouse the three genes were still expressed in skeletal muscles, though at different levels (see Northern blot in Figure 2).

**Visceral muscles** The visceral musculature also derives from the lateral mesodermal component, and the expression of *erm*, *er81* and *pea3* was observed during all the stages of development studied in the differentiating mesodermal layers surrounding tracheal and digestive tract (Figure 12).

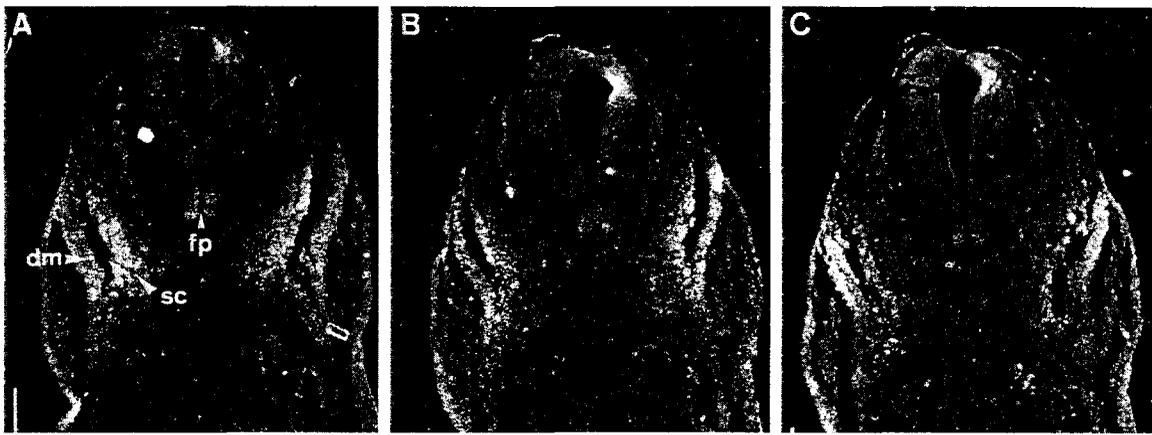


Figure 11 Expression of *erm* (a) *er81* (b) and *pea3* (c) in a 10.5 day embryo transversal sections. Darkfield views. dm, dermomyotome; fp, floor plate; sc, sclerotome. Bar: 155  $\mu$ m

**Cartilaginous skeleton** The sclerotomal cells that leave the somites to form the vertebral axis and ribs expressed *erm*, *er81* and *pea3*. The same co-expression was seen in the appendicular skeleton that arises from the lateral mesoderm. In each case, the labeling was present in the young aggregating chondroblasts but no longer persisted when the cartilaginous matrix was deposited (see for example Figures 5 and 10). However, perichondrial cells lining newly formed cartilaginous pieces continued to express the three genes (see also labeling in the nasal capsule and septum in Figure 8).

#### Mesoderm implication in organogenesis

**Heart** The heart anlagen derives from both the splanchnic mesoderm, which gives rise to the endocardial and myocardial components, and from the somatic mesoderm, which gives rise to the pericardium wall. In the primitive S-shaped cardiac tube, the expression of the PEA3 group genes was essentially restricted to the myocardial layer. Later, *er81* and *pea3* were highly expressed in the wall of the common atrial chamber and in the trabeculation of the common ventricular chamber. Later in development, *erm* and *er81* were highly expressed in the myogenic trabeculation of the atria as well as in the two ventricles, whereas *pea3* expression largely decreased (Figure 10).

These late patterns of expression were corroborated by Northern blot analysis performed on an adult mouse heart, where *erm* and *er81* expression could be detected, and *pea3* could not.

**Limb** The expression of *erm* and *pea3* was first seen by whole mount hybridization at day 9.5 of gestation in the anlagen of the forelimb (Figure 4). The initial growth of limb buds requires specific interactions between the flank ectoderm and the subjacent mesoderm. As the bud extrudes from the flank, the ectodermal sheet differentiates the Apical Ectoderm Ridge (AER) which further induces both elongation and polarities of the member. *erm* and *pea3* were more strongly expressed than *er81* in the distal mesenchymal cells corresponding to the progress zone. A slight signal was observed in the ectoderm for *erm* and *er81*. It is noteworthy that *pea3* was highly expressed in the ectodermal cap (Figure 13).

**Kidney** The metanephros – definitive kidney – results from the invasion of metanephric blastema by ureteric buds. The ureters bud out from the posterior Wolffian duct, come into contact with the metanephric mesenchyme and increase in length. In the developing kidney, *erm* and *pea3* were first expressed both in epithelial ureteric tubules and in adjacent mesenchyme while *er81* slightly in the mesenchyme. By E13.5 to E16.5, the kidney becomes more organized and, correlatively, the expression of the genes became more restricted. The primitive glomeruli appeared throughout the cortical region underneath a thin outer nephrogenic zone where nephron induction goes on. As depicted on Figure 14 the expression of *erm*, *er81* and *pea3* was localized in the ureteric epithelium and the surrounding mesenchymal condensation. This correlates with metanephrogenic mesenchyme and ureteric bud ends. The *er81* signal in the mesenchymal compartment decreased progressively until E17.5.

By E18 until birth of the mice the *erm* and *pea3* expression began to decrease with the differentiation of the nephron and became restricted to the peripheric nephrogenic zone. The expression of *erm* and *pea3* was then restricted in the mesenchymal compartment at a weak and homogeneous level (data not shown). At the adult stages *erm* and *er81* were always expressed, whereas *pea3* expression was no longer detectable by Northern blotting (Figure 2).

#### Expression in endoderm derivatives

**Digestive tract** At all the developmental stages examined in the digestive tract, *erm* and *pea3* were expressed in the basal layers of the endodermal epithelium while *er81* showed an expression in the mesenchymal part of the mucosa. Villous projections were not labeled by the three genes (Figure 12). As shown by Northern blot (Figure 2), after birth, the three genes were highly expressed in the colon and weakly (*erm* and *er81*) or not at all (*pea3*) in the ileum.

**Thymus and thyroid gland** The thymus and thyroid gland derive from the endodermal layer of the third endodermic pouch. In the early stage of thymus development (E13.5) (Figure 15), *erm* and *pea3* were

only detected in the epithelial cells of the capsule located in the periphery of the gland while *er81* had an overall weak expression in the central region composed of a stromal network. In addition to the above pattern of expression at E15.5, *erm* mRNAs

were also detected in the central region of the thymus where clusters of epithelial cells had begun to differentiate (Figure 5). In the thyroid anlagen at E15.5, the expression of *erm* and *pea3* was particularly important in the epithelial cells of the peripheral

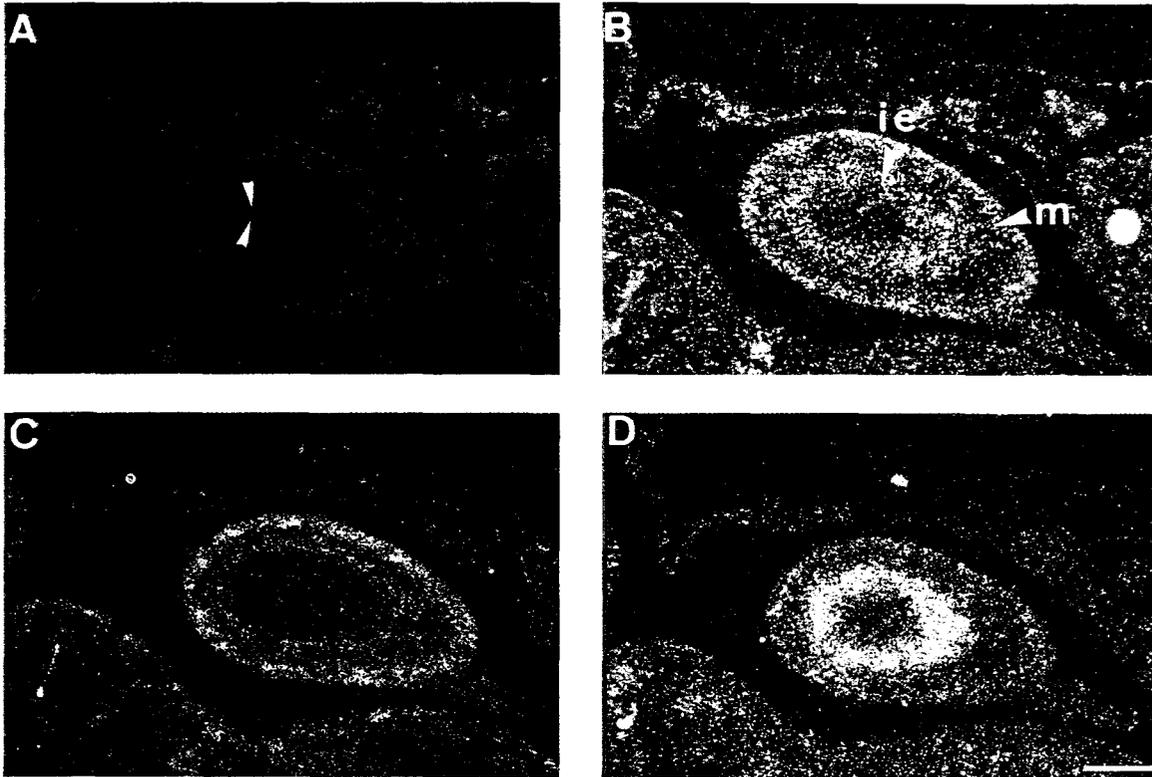


Figure 12 Expression of *erm* (b), *er81* (c) and *pea3* (d) in transversal sections of the digestive tract in a 15.5 day embryo. Darkfield views. (a), Hoechst staining control. ie, inner epithelium; m, mesodermal wall; villous projection (arrow heads). Bar: 165  $\mu$ m

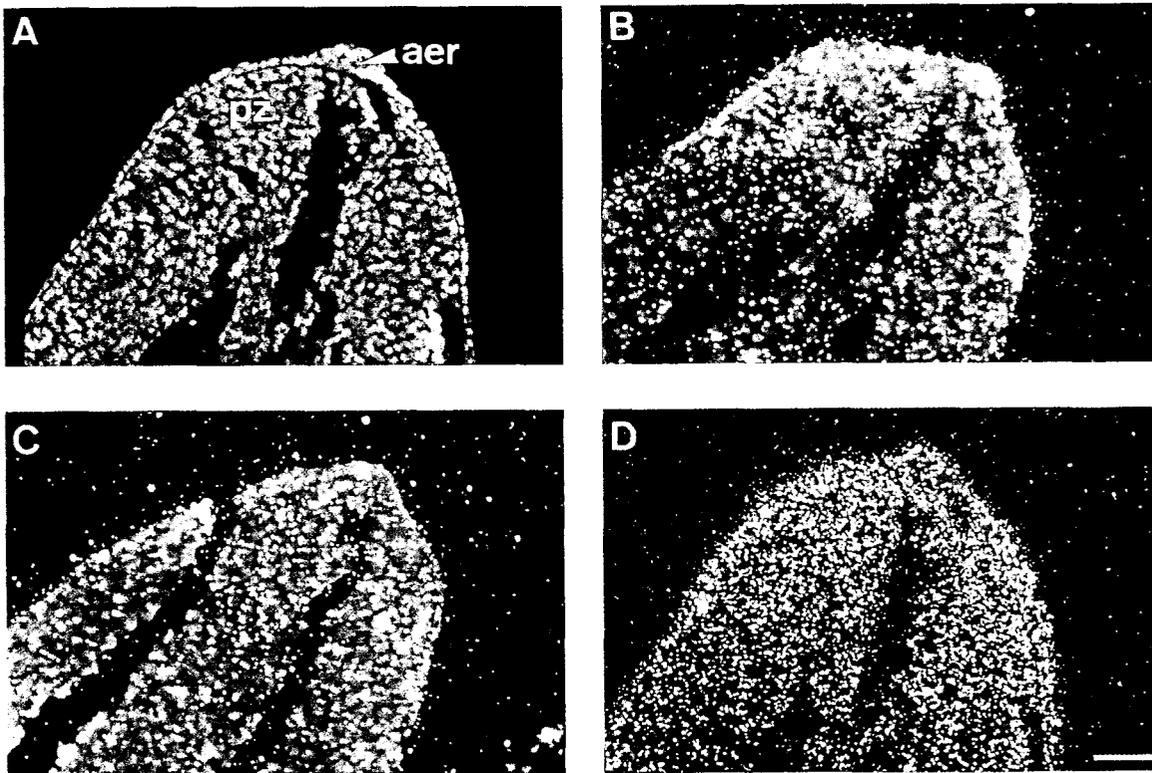
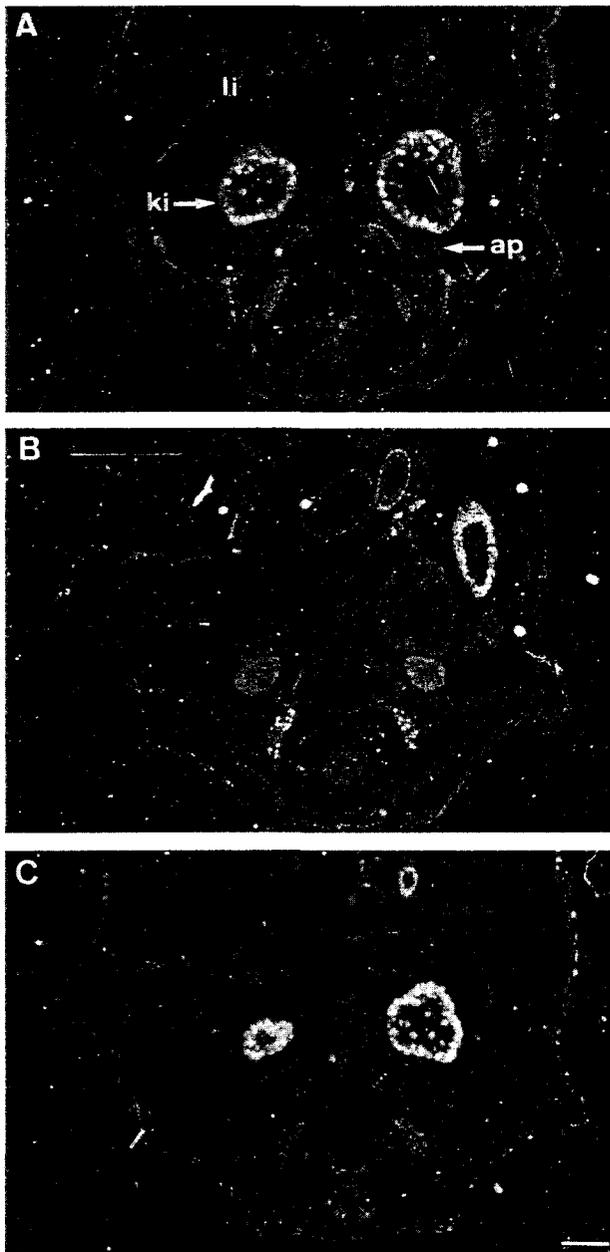


Figure 13 Expression of *erm* (b), *er81* (c) and *pea3* (d) in transversal sections of the limb bud in a 11.5 day embryo. Darkfield views and Hoechst staining. (a), Hoechst staining control. aer, apical ectodermal ridge; pz, progress zone. Bar: 35  $\mu$ m



**Figure 14** Expression of *erm* (a), *er81* (b) and *pea3* (c) in posterior transversal sections of a 15.5 day old embryo. Darkfield views. ap, adrenal primordium; ki, kidney; li, liver. Bar: 400  $\mu$ m

capsule whereas *er81* was weakly and homogeneously expressed (data not shown).

**Lung** The lungs begin their development when bilateral epithelial tracheal buds sprout from the primitive gut endoderm into surrounding mesoderm. The PEA3 group genes were expressed during all stages of the developing lung.

At E10.5, *erm* and *pea3* were expressed predominantly in the lung bud epithelium, whereas *er81* was expressed in the surrounding mesenchyme. Interestingly, as the branching occurred from E11.5 to E15.5 to give rise to the primary, secondary and tertiary bronchi, the *erm* expression became restricted to the distal growing epithelium of the branching ducts and was no longer detected in any more differentiated stalks. During this morphogenesis, *er81* was observed in the mesenchymal compartment. *pea3* presented

another expression pattern: it was expressed both in the epithelial and mesenchymal compartments but at a lesser extent (Figure 10). In the later developmental stages and in the newborn mice, the expression of the three genes was maintained in the lung but essentially in the mesenchymal compartment. In adult stages, *erm* and *er81* expression was observed by Northern blot; *pea3* was no longer expressed (Figure 2).

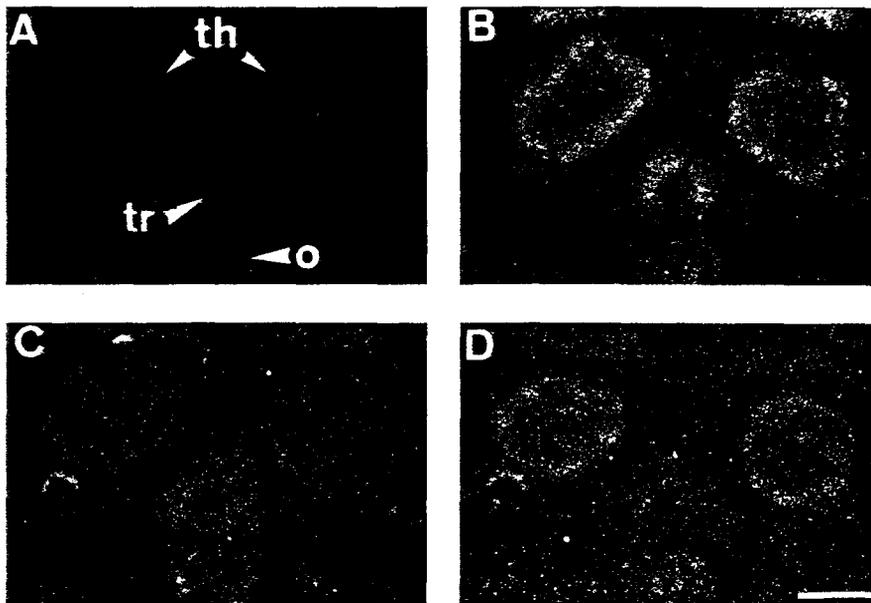
**Salivary gland** The first step of salivary gland formation at E11 of gestation is an invagination of a part of the mouth floor epithelium into the mandible mesenchyme. The proliferation of epithelial cells gives rise to bulbous epithelial lobules. In this developing organ, the *erm* and *pea3* genes were highly expressed in the bulbous epithelial lobules, which were composed of epithelial cells surrounded by condensed mesenchymal cells. The more differentiated epithelial stalks did not present any labeling. *er81* was evenly expressed in the mesenchymal condensed cells around growing epithelial buds (Figure 5). Later, the expression began to decrease, so that after birth the expression was restricted to the mesenchymal compartment for the three genes (data not shown). In adult mice, *erm* is the only gene the expression of which can be detected in the salivary gland by Northern blot (Figure 2).

## Discussion

In this report, we have studied the ETS family transcription factors ERM, ER81 and PEA3 which have been assigned to the same PEA3 group according to the divergence rate analysis of their DNA binding domain, i.e. the ETS domain. Indeed, these factors are very closely related as they share more than 95% sequence identity in the ETS domain and more than 85% in the amino- and 50% in the carboxy-terminal parts known to be transcriptional activating domains (Laget *et al.*, 1996). This high-sequence identity causes us to wonder whether the three encoding genes are redundant in their spatio-temporal expression and their role(s) or, alternatively, whether each gene displays specific features of expression related to potentially different functions in development. We have developed probes specific for analysing by *in situ* hybridization the expression of *erm*, *er81* and *pea3*. Thus, we report here the cloning of the murine *erm* cDNA and the first comparative description of the expression of the PEA3 group members during murine embryonic development from day 9.5 until birth and in some cases afterwards. Our results show that the three genes are expressed in many developing tissues with apparently numerous sites of co-expression. Nevertheless, a closer examination revealed that these genes present specific sites of expression in systems where cells or tissues are interacting. Moreover, the Northern blot study demonstrated that *erm* and *er81* displayed a continual expression in numerous adult mouse organs while *pea3* expression decreased largely after birth and was restricted to a few organs.

### Expression in differentiating cell lineages

The main features of PEA3 group member expression can be resumed as follows: during early stages of



**Figure 15** Expression of *erm* (b), *er81* (c) and *pea3* (d) in transversal sections of the thymus in a 13.5 day embryo. Darkfield views and Hoechst staining. (a), Hoechst staining control. o, oesophagus; th, thymus; tr, trachea. Bar: 150  $\mu$ m

development, a co-expression of the three members is frequently observed. As differentiation proceeds after commitment of the cells, expression patterns are modified so that some populations continue to co-express the genes while other subpopulations exhibit new specific expressions. It is true for the neuroepithelium and its derivatives as illustrated by the expression maps in the central nervous system (see Figure 3). It is tempting to propose that these peculiar expression patterns accompany and/or trigger progressive steps of the neural differentiation. In the same way, we observed the expression of the three genes at the early stages of somite differentiation when both myogenic and chondrogenic lineages appear in the dermomyotome and the scattering sclerotome respectively. These two components are responsible for trunkal musculature and vertebral axis formation respectively. As cellular differentiation proceeds, signals become restricted to subpopulations of cells. For example, aggregating chondroblasts express the genes while skeleton cartilaginous pieces do not, excepted in the perichondrium. At the opposite, in muscle cells and whatever the origin of the cells (somatic, splanchnic), *erm*, *er81* and *pea3* are expressed in committed cells, and their expression is maintained during later stages of differentiation. These patterns of expression are reminiscent of the expression of *ets-1* and *erg* which are found in scattering sclerotomal cells (Dhordain *et al.*, 1995; Fafeur *et al.*, 1997; Grevin *et al.*, 1993). However, *ets-1* is quickly down regulated in young chondroblasts while *erg* and *pea3(s)* expression persists (Dhordain *et al.*, 1995; Ganon *et al.*, 1996). Similarly, *ets-1* is not expressed in myogenic derivatives (Fafeur *et al.*, 1997) while *erg* as well as PEA3 group members are found in the dermomyotome and its muscular or tendon derivatives.

Taken together, these results highlight the simultaneous use of different members of a transcription factor family during the early stages of embryonic development and their quick specialization during steps of various differentiation programs. These

observations appear to rule out a redundant function for PEA3 group members and rather agree with specificity for each member and/or putative cooperations to monitor important functions during developmental processes.

#### *Expression during organogenesis*

The expression of the PEA3 group genes starts early in development and extends with different organogenesis. *erm*, *er81* and *pea3* are expressed in ectoderm, mesoderm and endoderm derivatives during the development of many organs. This study demonstrates that *erm* and *pea3* are preferentially expressed in epithelial cells such as epithelium of the salivary gland, the lung and the gut whereas *er81* is commonly expressed in the mesenchymal compartment. This difference in the expression pattern is clearly exemplified in the developing gut, where expression of *erm* and *pea3* is restricted to the endodermal epithelium whereas *er81* expression is limited to the mesenchymal part of the mucosa.

It is interesting to note that the three genes are expressed in organs where epithelial-mesenchymal interactions occur, as for example the lung, the kidney or the salivary gland. It is well known that epithelial-mesenchymal interactions strongly influence cell migration and proliferation and that the extracellular matrix (ECM) can mediate these events. Moreover, the controlled degradation (and remodeling) of the ECM, relying on an interplay between the metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (Matrisian, 1992) plays a key role in the morphogenetic processes.

A large number of reports has evidenced the transcriptional regulation of MMP encoding genes by members of the ETS family (Gutman and Wasyluk, 1990; Sato and Seiki, 1993; Wasyluk *et al.*, 1991). Of special relevance to our field of investigation was the report that E1AF, the human homologue of PEA3, up-regulated the transcription of three different types of

MMP genes: MMP-1, MMP-3 and MMP-9/gelatinase (Higashino *et al.*, 1995). Moreover, E1AF overexpression confers an invasive phenotype on human breast cancer cells by up-regulating MMP-9/gelatinase expression (Kaya *et al.*, 1996). This probably accounts for the metastatic potential of PEA3-expressing cell lines that indeed overexpress MMP-3 and 9 (Shindo *et al.*, 1996). It is therefore tempting to speculate that the *erm*, *er81* and *pea3* genes encode transcription factors that take part in epithelial-mesenchymal interactions by regulating expression of MMP genes, that in turn remodel the ECM. Several studies have pointed to adhesion molecules as other key players in morphogenesis. Noticeably, their expression is modulated by Ets proteins, and they also might be targets of ERM, ER81 and PEA3. We do not know whether these different target genes could be regulated by each of the PEA3 group members, or whether they share the same effectors. It was recently shown that ETS family members can either cooperate or inhibit each other in triggering target gene expression (Buttice *et al.*, 1996). It would be of interest to describe the precise implication of the three genes in well characterized epithelial-mesenchymal interacting systems and in the same way to examine the effects either of *erm*, *er81* and *pea3* null mutation by knocking out, or of their overexpression by transgenesis. These studies are under investigation in our laboratory. This could be a good way to test the respective role(s) of each member.

To conclude, *erm*, *er81* and *pea3* encode transcription factors that are highly expressed during all murine developmental stages. The most important step of the expression seems to be associated with proliferation and migration events. The three gene expression also correlates with epithelial-mesenchymal interactions. These data suggest an important role for the *erm*, *er81* and *pea3* genes in regulating developmental processes.

## Materials and methods

### Isolation and sequencing of mouse *erm* cDNA clone

Molecular cloning of the mouse *erm* cDNA was performed with two probes. The first probe corresponded to the BamHI–NdeI digested fragment of human *erm* cDNA (Mont *et al.*, 1994). The second probe corresponded to the 5' EcoRI fragment of a 5' truncated mouse *erm* cDNA isolated during the screening. Approximately 10<sup>6</sup> recombinant phages from a 8.5 embryonic mouse cDNA library kindly provided by Dr B Hogan were screened with the 1 × 10<sup>6</sup> c.p.m./ml <sup>32</sup>P-labeled probes. The filters were washed at 0.5 × SSC–0.1% SDS at 60°C for 30 min and then autoradiographed 12 h at –80°C. After three to four purification steps, phages were isolated as described (Monté *et al.*, 1994) and the inserts were excised by EcoRI digestion. The purified cDNA inserts were subcloned into the polylinker site of pBluescript SK vector (Stratagene, La Jolla, CA). Synthetic oligonucleotides, as well as T7 or T3 vector primers, and modified T7 DNA polymerase were used to sequence both strands of double-stranded plasmid DNA with the dideoxy chain termination method with [<sup>32</sup>S]ATP (USB, Cleveland, OH). Sequences were confirmed using an Applied Biosystems 370A automatic system with fluorescent dye-labeled cDNA sequence-specific primers and a Taq dye-primer sequencing kit (Applied Biosystem, Foster City, CA).

### Preparation of RNA probes

Probes for hybridization were prepared from the N-terminal part of the ERM, ER81 and PEA3 genes: PEA3 being the least conserved between the three. The different probes were obtained by PCR (30 cycles: 94°C, 1 min; 50°C, 1 min; 72°C, 1 min) on the respective cDNA with specific oligonucleotides flanking the corresponding region, subcloned into pCR™II (In Vitrogen Corp., San Diego, CA) and confirmed by sequencing. The oligonucleotides used for the PCR were for *erm*, *er81* and *pea3* respectively:

|      |  |
|------|--|
| ERM  | 5'-GAGAGCGACCTTTGATTGA-3';<br>5'-GCTGGGCTCAGACACGTGTGCGCT-3';      |
| ER81 | 5'-GGTCACCAACAGTCAGCGTGGGAG-3';<br>5'-ACAGGGTTCAGAAAGCTGGCGGCG-3'; |
| PEA3 | 5'-CACCTTCTGCAGCAAATCTCCCGG-3';<br>5'-GCAGGGCTCCGACAGTTGGTGTG-3';  |

The sizes of the probes are 611 bp (nt 77 to nt 687), 547 bp (nt 236 to nt 782; Brown and McKnight, 1992) and 593 bp (nt 397 to nt 989; Xin *et al.*, 1992). The RNA probes were transcribed from linearized plasmids by Sp6 and T7 RNA polymerase (Stratagene, La Jolla, CA) and generated antisense and sense probes for ERM, ER81 and PEA3 respectively. Transcription reactions with these polymerases were performed according to the manufacturer's specifications by means of 200 µCi [<sup>35</sup>S] CTP (1200 Ci/mole, NEN).

### Northern blot analysis

Total RNA was extracted from fresh tissues with RNazol (Appligene). 15 µg of RNAs were separated on 1.2% agarose/formaldehyde gels and transferred onto nylon membranes (Hybond N<sup>+</sup>, Amersham). Hybridization was performed with [<sup>32</sup>P]CTP DNA probes of ERM, ER81 and PEA3 labeled according to the Megaprime DNA labeling system (Amersham).

### Embryos and tissue preparation

Embryos were obtained from natural matings of OF1 mice, and embryonic day 0.5 (E0.5) was assigned to the day the vaginal plug was found.

*In situ* hybridization was performed on tissue sections of mouse embryos at various developmental stages. The embryos were fixed in paraformaldehyde 4% PBS, dehydrated and embedded in paraffin. 7 µm thick transverse sections were collected on Superfrost slides (Fisher Scientific Co) and stored at 4°C.

*In situ* hybridization was performed essentially by the method of Cox *et al.* (1984) using modification reported previously (Queva *et al.*, 1992).

Hybridization was detected after 15 days' exposure to autoradiographic emulsion. After development, the slides were stained with the Hoechst 33258 intercalating DNA dye and mounted in Glycergel (Sebia). Sections were photographed with dark-field optics and/or epifluorescence for the Hoechst staining. A Zeiss Axioskop microscope was used.

### Whole mount *in situ* hybridization

Whole mount *in situ* hybridization was performed according to the procedures of (Wilkinson, 1992). 9.5, 10.5 and 11.5 day embryos were fixed overnight in 4% paraformaldehyde in PBS and hybridized with ERM, ER81 and PEA3 sense or antisense digoxigenin-labelled RNA probes. Hybridization was detected with digoxigenin antibody coupled to alkaline phosphatase (Boehringer

Mannheim). Samples were post-fixed with 4% paraformaldehyde in PBS Tween and then stored in glycerol 30% in PBS Tween. Whole embryos were photographed under transmitted light with a Nikon microscope.

#### Acknowledgements

We are grateful to Dr T Gilbert, Dr S Saule, Dr JV Ruch and Dr F Dieterlen for their critical reading of the

manuscript. This work has been carried out on the basis of grants awarded in part by the 'Institut Pasteur de Lille' (France), the 'Centre National de la Recherche Scientifique' (France), the 'Association pour la Recherche contre le Cancer', the 'Fédération des GEFLUC' and the 'Ligue Contre le Cancer' (France).

#### References

- Ben David Y, Giddens EB, Letwin K and Bernstein A. (1991). *Genes and Dev.*, **5**, 908–918.
- Bhat NK, Fisher RJ, Fujiwara S, Ascione R and Papas TS. (1987). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 3161–3165.
- Bhat NK, Komschlies KL, Fujiwara S, Fisher R, Mathieson BJ, Gregorio TA, Young HA, Kasik JW, Ozato K and Papas TS. (1989). *J. Immunol.*, **142**, 672–678.
- Brown TA and McKnight SL. (1992). *Genes and Dev.*, **6**, 2502–2512.
- Brunner D, Dücker K, Oellers NEH, Scholz H and Klämbt C. (1994). *Nature*, **370**, 386–389.
- Buttice G, Duterque-Coquillaud M, Basuyaux JP, Carrère S, Kurkinen M. and Stéhelin D. (1996). *Oncogene*, **13**, 2297–2306.
- Cox KH, De Leon DV, Angerer LM and Angerer RC. (1984). *Dev. Biol.*, **101**, 485–502.
- Crépieux P, Coll J and Stéhelin D. (1994). *Crit. Rev. Oncology*, **5**, 615–638.
- Degnan BM, Degnan SM, Nagagnuma T and Morse DE. (1993). *Nucl. Acids Res.*, **21**, 3479–3484.
- Delannoy-Courdent A, Fauquette W, Dong-Le Bourhis XF, Boilly B, Vandenbunder B and Desbiens X. (1996). *Int. J. Dev. Biol.*, **40**, 1097–1108.
- Delattre O, Zucman J, Plougastel B, Desmaze C, Melot T, Peter M, Kovar H, Joubert I, de Jong P, Rouleau G, Aurias A and Thomas G. (1992). *Nature*, **359**, 162–165.
- Dhordain P, Dewitte F, Desbiens X, Stéhelin D and Duterque M. (1995). *Mech. Dev.*, **50**, 17–28.
- Donaldson LW, Petersen JM, Graves BJ and McIntosh LP. (1994). *Biochemistry*, **33**, 13509–13516.
- Fafeur V, Vercamer C, Queva C, Tulasne D, Dimster V, Ansieau S, Mattot V, Stéhelin D, Desbiens X and Vandenbunder B. (1997). *Cell Growth Differ.*, in press.
- Ganan Y, Macias D, Duterque-Coquillaud M, Ros MA and Hurlé JM. (1996). *Development*, **122**, 2349–2357.
- Golub T, Barker GF, Lovett M and Gilliland DG. (1994). *Cell*, **77**, 307–316.
- Grevin D, Chen JH, Raes MB, Stéhelin D, Vandenbunder B and Desbiens X. (1993). *Int. J. Dev. Biol.*, **37**, 519–529.
- Gutman A and Wasylyk B. (1990). *EMBO J.*, **9**, 2241–2246.
- Higashino F, Yoshida K, Kamio K and Fujinaga K. (1993). *Nucl. Acid Res.*, **21**, 547–553.
- Higashino F, Yoshida K, Noumi T, Seiki M and Fujinaga K. (1995). *Oncogene*, **10**, 1461–1463.
- Janknecht R. (1996). *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 1551–1556.
- Janknecht R, Monté D, Baert J-L and de Launoit Y. (1996). *Oncogene*, **13**, 1745–1754.
- Jeon I-S, Davis JN, Braun BS, Sublett JE, Roussel MF, Denny CT and Shapiro DN. (1995). *Oncogene*, **10**, 1229–1234.
- Karim FD, Urness LD, Thummel CS, Klemsz MJ, McKercher SR, Celada A, Van Beveren C, Maki RA, Gunther K, Nye JA and Graves BJ. (1990). *Genes & Dev.*, **4**, 1451–1453.
- Kaya M, Yoshida K, Higashino F, Mitaka T, Ishii S and Fujinaga K. (1996). *Oncogene*, **12**, 221–227.
- Kola I, Brookes S, Green AR, Garber R, Tymms M, Papas TS and Seth A. (1993). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 7588–7592.
- Kozak M. (1991). *J. Biol. Chem.*, **266**, 19867–19870.
- Laget MP, Defossez P-A, Albagli O, Baert JL, Dewitte F, Stéhelin D and de Launoit Y. (1996). *Oncogene*, **12**, 1325–1336.
- Laudet V, Niel C, Duterque M, Leprince D and Stéhelin D. (1993). *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **190**, 8–14.
- Lautenberger JA, Burdett LA, Gunnell MA, Shengmei Q, Watson DK, O'Brien SJ and Papas TS. (1992). *Oncogene*, **7**, 1713–1719.
- Leprince D, Gegonne A, Coll J, de Taisne C, Schneeberger A, Lagrou C and Stéhelin D. (1983). *Nature*, **306**, 395–397.
- Liang H, Mao X, Olejniczak ET, Nettesheim DG, Yu L, Meadows RP, Thompson CB and Fesik SW. (1994). *Nature Struct. Biol.*, **1**, 871–876.
- Maroulakou IG, Papas TS and Green JE. (1994). *Oncogene*, **9**, 1551–1565.
- Matrisian LM. (1992). *BioEssays*, **14**, 455–463.
- Metz T and Graf T. (1991). *Genes Dev.*, **5**, 369–380.
- Monté D, Baert JL, Defossez PA, de Launoit Y and Stéhelin D. (1994). *Oncogene*, **9**, 1397–1406.
- Monté D, Coutte L, Baert L, Angeli I, Stéhelin D. and de Launoit Y. (1995). *Oncogene*, **11**, 771–779.
- Moreau GF, Tavittian A and Tambourin P. (1988). *Nature*, **331**, 277–280.
- Nakae K, Nakajima K, Inazawa J, Kitaoka T and Hirano T. (1995). *J. Biol. Chem.*, **270**, 23795–23800.
- Nye JA, Petersen JM, Gunther CV, Jonsen MD and Graves BJ. (1992). *Genes & Dev.*, **6**, 975–990.
- O'Neill EM, Rebay I, Tjian R and Rubin GM. (1994). *Cell*, **78**, 137–147.
- Pardanaud L and Dieterlen-Lievre F. (1993). *Cell Adhes. Commun.*, **1**, 151–160.
- Paul R, Schuetze S, Kozak SL, Kozak CA and Kabat D. (1991). *J. Virol.*, **65**, 464–467.
- Quéva C, Leprince D, Stéhelin D and Vandenbunder B. (1993). *Oncogene*, **8**, 2511–2520.
- Queva C, Ness SA, Grasser FA, Graf T, Vandenbunder B and Stéhelin D. (1992). *Development*, **114**, 125–133.
- Romano-Spica V, Suzuki H, Georgiou P, Chen S-L, Ascione R, Papas TS and Bhat NK. (1994). *Int. J. Oncol.*, **4**, 521–531.
- Sato H and Seiki M. (1993). *Oncogene*, **8**, 395–405.
- Schuetze S, Stenberg PE and Kabat D. (1993). *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 5670–5678.
- Scott EW, Simon MC, Anastasi J and Singh H. (1994). *Science*, **265**, 1573–1577.
- Shimizu K, Ichikawa H, Tojo A, Kaneko Y, Maseki N, Hayashi Y, Ohira M, Asano S and Ohki M. (1993). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 10280–10284.
- Shindo M, Higashino F, Kaya M, Yasuda M, Funaoka K, Hanzawa M, Hida K, Kohgo T, Amemiya A, Yoshida K and Fujinaga K. (1996). *Am. J. Pathol.*, **148**, 693–700.
- Shore P, Bisset L, Lakey J, Waltho JP, Virden R and Sharrocks AD. (1995). *J. Biol. Chem.*, **270**, 5805–5811.
- Treisman R. (1995). *EMBO J.*, **14**, 4905–4913.
- Trimble MS, Xin JH, Guy CT, Muller WJ and Hassell JA. (1993). *Oncogene*, **8**, 3037–3042.

- Urano F, Umezawa A, Hong W, Kikuchi H and Hata JI. (1996). *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **219**, 608-612.
- Vanbenbunder B, Parnadaud L, Jaffredo T, Mirabel MA and Stehelin D. (1989). *Development*, **109**, 265-274.
- Vandenbunder B, Queva C, Desbiens X, Wernert N and Stehelin D. (1994-95). *Inv. Metastasis*, **14**, 198-209.
- Wasylyk C, Gutman A, Nicholson R and Wasylyk B. (1991). *EMBO J.*, **10**, 1127-1137.
- Werner MH, Clore GM, Fisher CL, Fisher RJ, Trinh L, Shiloach J and Gronenborn AM. (1995). *Cell*, **83**, 761-771.
- Wilkinson DG. (1992). *In situ hybridization: A Practical Approach* (ed). DG. Wilkinson, 75-83.
- Xin JH, Cowie A, Lachance P and Hassell JA. (1992). *Genes and Dev.*, **6**, 481-496.
- Yang B-S, Hauser CA, Henkel G, Colman MS, Van Beveren C, Stacey KJ, Hume DA, Maki RA and Ostrowski MC. (1996). *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 538-547.
- Zucman J, Melot T, Desmaze C, Ghysdael J, Plougastel B, Peter M, Zucker JM, Triche TJ, Sheer D, Turc-Carel C, Ambros P, Combaret V, Lenoir G, Aurias A, Thomas G and Delattre O. (1993). *EMBO J.*, **12**, 4481-4487.