

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

THESE

présentée pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE
EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

par

Christelle HUGUET

**Etude de l'expression du facteur de transcription
aviaire c-Rel dans le thymus *in vivo* : implication dans
l'apoptose, la prolifération et la maturation des
cellules T
et**

Phylogénèse des familles Rel/NF- κ B et I κ B

Présentée le 28 Mai 1997 devant la commission d'examen :

Président :	Pr Xavier DESBIENS
Rapporteurs :	Dr Jean IMBERT Dr Michel LANOTTE
Examineurs :	Pr Dominique STEHELIN Dr Bernard VANDENBUNDER Dr Corinne ABBADIE

REMERCIEMENTS

J'aborde ici, sans aucun doute, le chapitre le plus difficile et le plus plaisant à la fois.

Merci à messieurs Jean Imbert et Michel Lanotte d'avoir accepté d'évaluer ce travail, ce qui, j'en suis consciente, représente de longues heures de lecture peu distrayante.

Merci à Dominique Stéhelin de m'avoir accueillie dans son laboratoire, et surtout pour sa gentillesse et sa disponibilité. Merci également d'avoir partagé avec les gourmets et gourmands, dont je suis, certains délices strasbourgeois.

Merci à Bernard Vandembunder de m'avoir intégrée au groupe *in situ* et de s'émerveiller encore devant les petits pas de la recherche. Merci également d'avoir raconté avec enthousiasme le dernier livre ou le dernier film à ne pas manquer et surtout sans jamais omettre la fin !

Merci à Corinne Abbadie d'avoir encadré ce travail et de m'avoir enseigné en plus des techniques d'HIS et d'ICC, les joies de la microscopie et de la diapositive "Nec Plus!". Merci également d'avoir partagé avec moi le "mal au cœur" des chambres noires.

Merci à Fatima d'avoir multiplié les tests d'anticorps, toujours avec le sourire, et surtout de cuisiner à merveille les cornes de gazelle et autres délices des mille et une nuits.

Merci à Vincent Landet de m'avoir initiée aux plaisirs de l'évolution moléculaire et de l'écran multicolore du PC, le tout sur fond de René Aulry.

Merci à Virginie Mattot, d'avoir toujours été simplement M'am Virginie avec tout ce que cela comprend. A défaut d'incarner les demoiselles de Rochefort, quoique l'on fasse la différence reste de taille!, notre duo n'était pas si mal!

Merci à Véronique Fafeur, d'être en plus d'une source de conseils et d'échanges scientifiques, une excellente source de fantaisie et de "brin de folie", sans parler des croissants rochefort et pâté forestier...!

Merci à tous les membres du groupe *in situ*, les anciens comme les nouveaux, pour leur bonne humeur et l'aide qu'ils ont pu m'apporter.

Merci aux copains: Anne, Claire, Héléne, Zoulika, Delphine, Pierre-Antoine, Guillaume, Frédéric et j'en oublie sans doute pour tous les bons moments.

Merci à tous les membres, statutaires ou de passage, du laboratoire, de la laverie et du secrétariat avec qui j'ai pu interagir, discuter ou simplement plaisanter et qui font de ce laboratoire ce qu'il est, c'est à dire un endroit où il est agréable de travailler.

Quelques mentions spéciales:

Merci à mes parents pour leur soutien plus que financier.

Merci à Mazos pour son aide et sa patience, tout vient à point à qui sait attendre!

Une grande ombre au tableau, l'injuste absence de Marie-Pierre.

SOMMAIRE

RESUME	1
AVANT-PROPOS	2
ABREVIATIONS	5
INTRODUCTION	7
1. La famille Rel/NF-κB	8
1.1. Les facteurs de transcription de la famille Rel/NF- κ B	8
1.2. Le domaine d'homologie Rel ou RHD	10
1.2.1. Le domaine de liaison à l'ADN	10
1.2.2. Le domaine de dimérisation	11
1.2.3. Le signal de localisation nucléaire	13
1.2.4. La région I	13
1.3. Les domaines C-terminaux	14
1.3.1. Les domaines transactivateurs	14
1.3.2. Les motifs ankyrine et la séquence de type PEST	15
1.3.3. Le domaine de mort ou "death domain"	15
2. La famille IκB	16
2.1. Les membres de la famille I κ B	17
2.2. Les fonctions des protéines I κ B	18
2.2.1. La rétention cytoplasmique des facteurs Rel/NF- κ B: domaines impliqués et spécificités d'interaction	18
2.2.2. L'inhibition de la liaison à l'ADN des facteurs Rel/NF- κ B	20
2.2.3. La terminaison de l'activité transcriptionnelle et l'exportation vers le cytoplasme des facteurs Rel/NF- κ B	21
2.2.4. La prolongation de l'activité transcriptionnelle des facteurs Rel/NF- κ B	22
2.2.5. Le cas particulier de Bcl-3	22

3.	Le tandem Rel/NF-κB-IκB : mécanismes d'activation des facteurs Rel/NF-κB	23
3.1.	La dégradation induite des inhibiteurs I κ B entraînant la nucléarisation des facteurs Rel/NF- κ B	23
3.1.1.	La phosphorylation et la dégradation des inhibiteurs I κ B	23
3.1.2.	Les séquences impliquées dans la phosphorylation, l'ubiquitination et la dégradation par le protéasome	25
3.1.3.	Les kinases impliquées dans la phosphorylation induite des inhibiteurs I κ B	26
3.2.	Quelques signaux d'activation des facteurs Rel/NF- κ B induisant la dégradation des inhibiteurs I κ B	27
3.3.	Les boucles de régulation transcriptionnelle	30
3.3.1.	La boucle de régulation Rel/NF- κ B-I κ B	30
3.3.2.	L'autorégulation des facteurs Rel/NF- κ B	31
4.	Les régulations indépendantes des protéines IκB et Rel/NF-κB et les autres modes d'activation des facteurs Rel/NF-κB qui en découlent	32
4.1.	Autres modes d'activation ciblant les protéines I κ B	32
4.1.1.	Dégradation basale des protéines I κ B	32
4.1.2.	Quelques mécanismes de régulation des protéines I κ B ne passant pas par leur dégradation	34
4.2.	Autres modes de régulation ciblant directement les protéines Rel/NF- κ B	35
4.2.1.	La phosphorylation des protéines Rel/NF- κ B	35
4.2.2.	Modulation de la transcription des gènes Rel/NF- κ B	36
4.2.3.	Inhibition des facteurs Rel/NF- κ B par des interactions protéine-protéine	36
5.	Quelques fonctions biologiques des facteurs Rel/NF-κB	37
5.1.	Le pouvoir transactivateur des facteurs Rel/NF- κ B	37
5.2.	Les mécanismes biologiques utilisant les facteurs Rel/NF- κ B	40
5.2.1.	Les résultats des expériences de transgénèse et de recombinaison homologues	41

5.2.1.1. RelA	42
5.2.1.2. c-Rel	42
5.2.1.3. RelB	43
5.2.1.4. NF- κ B1	44
5.2.1.5. v-Rel	44
5.2.1.6. I κ B α	45
5.2.1.7. Bcl-3	45
5.2.1.8. Résultats d'expériences non publiés	46
5.2.2. Les facteurs Rel/NF- κ B et l'oncogenèse	47
5.2.3. Les facteurs Rel/NF- κ B et l'apoptose	48
RESULTATS ET DISCUSSION	52
1. Phylogénèse des familles Rel/NF-κB et IκB	53
1.1. Introduction	53
1.2. Les méthodes phylogénétiques	54
1.3. Résumé de l'article	56
Article 1: Rel/NF-κB transcription factors and IκB inhibitors : evolution from a unique common ancestor	57
1.4. Discussion	58
1.4.1 Les cas particuliers	58
1.4.2 La famille Rel/NF- κ B	59
1.4.3 La famille I κ B	61
1.4.4 La superfamille Rel/NF- κ B/I κ B	63
2. c-Rel : un facteur de transcription multifonctionnel	66
2.1. Résumé de la revue	66
Article 2 : v-Rel : a multifunctional transcription factor?	67
2.2. Evolution des connaissances sur la fonction physiologique de c-Rel	68
2.3. Evolution des connaissances sur le pouvoir transformant de v-Rel	69
3. Expression du proto-oncogène aviaire c-Rel in vivo	72

3.1.	Introduction	72
3.2	Expression du facteur de transcription c-Rel au cours du développement embryonnaire du thymus	74
3.2.1	Résumé de l'article	74
	Article 3 : The avian transcription factor c-Rel is expressed in lymphocyte precursor cells and antigen-presenting cells during the thymus development	75
3.2.2	Discussion	76
3.2.2.1	c-Rel est exprimé dans le noyau des cellules précurseurs de lymphocytes	76
3.2.2.2	c-Rel est exprimé dans le cytoplasme des cellules présentatrices d'antigènes	77
3.3	Expression du facteur de transcription c-Rel au cours de l'apoptose thymocytaire	79
3.3.1	Résumé de l'article	79
	Article 4 : The avian transcription factor c-Rel is induced and translocates into the nucleus of thymocytes undergoing apoptosis	80
3.3.2	Discussion	81
3.3.2.1	La protéine c-Rel est induite dans les thymocytes apoptotiques	81
3.3.2.2	La protéine c-Rel migre dans le noyau au cours de l'apoptose	82
3.3.2.3	Mécanisme d'activation de la protéine c-Rel	83
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	85
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	88

LISTE DES PUBLICATIONS

c-Rel : a multifunctional transcription factor?

Christelle Huguet, Paula Enrietto, Bernard Vandembunder and Corinne Abbadie.
Cell Death and Differentiation (1994), 1, 71-76

The avian transcription factor c-Rel is induced and translocates into the nucleus of thymocytes undergoing apoptosis.

Christelle Huguet, Virginie Mattot, Fatima Bouali, Dominique Stéhelin, Bernard Vandembunder and Corinne Abbadie.

Cell Death and Differentiation (1997) sous presse

The avian transcription factor c-Rel is expressed in lymphocyte precursor cells and antigen-presenting cells during the thymus development.

Christelle Huguet, Fatima Bouali, Paula Enrietto, Dominique Stéhelin, Bernard Vandembunder and Corinne Abbadie.

Soumis.

Rel/NF- κ B transcription factors and I κ B inhibitors : evolution from a unique common ancestor.

Christelle Huguet, Pascale Crépieux and Vincent Laudet.

Soumis.

RESUME

La famille Rel/NF- κ B regroupe des facteurs de transcription impliqués dans la régulation du développement embryonnaire et de la réponse immunitaire chez les arthropodes et les vertébrés. Ces facteurs sont retenus dans le cytoplasme par des protéines inhibitrices I κ B. Une stimulation entraîne la dégradation de l'inhibiteur et la nucléarisation des facteurs Rel/NF- κ B qui vont moduler la transcription de gènes cibles.

Les familles Rel/NF- κ B et I κ B englobent des protéines communes. Afin de définir s'il existe un lien évolutif entre ces familles, nous avons réalisé une étude phylogénétique des séquences protéiques de leurs membres. Les résultats nous ont conduit à définir un modèle d'évolution de ces protéines à partir d'un ancêtre unique dans une superfamille Rel/NF- κ B/I κ B. Ce modèle explique le partage des domaines ankyrines par des protéines des deux familles ainsi que les spécificités d'interactions entre les facteurs Rel/NF- κ B et leurs inhibiteurs I κ B.

Nous avons également étudié l'expression *in vivo* du proto-oncogène *c-rel*, un facteur Rel/NF- κ B, et de son inhibiteur I κ B α au cours de la maturation et de la sélection par apoptose des cellules T dans le thymus de poulet.

Nos résultats montrent que *c-Rel* n'est pas exprimée dans les thymocytes sains à l'exception des cellules précurseurs de lymphocytes. Dans ces cellules, la protéine *c-Rel* est constamment nucléaire, en rapport avec une faible expression du gène *ikba*, qui code I κ B α , et cette activation constitutive est observée pendant la prolifération de ces cellules.

c-Rel est également exprimée dans le cytoplasme de cellules présentatrices d'antigène du thymus et cette localisation est corrélée à une forte expression du gène *ikba*. Dans ces cellules, *c-Rel* pourrait réguler l'expression des gènes du complexe majeur d'histocompatibilité.

Enfin, la protéine *c-Rel* est détectée dans des thymocytes apoptotiques subissant la sélection naturelle. De plus, dans un système de culture organotypique où l'apoptose est provoquée, l'expression de *c-Rel* est induite post-transcriptionnellement. La protéine *c-Rel* induite migre ensuite dans le noyau en corrélation avec une décroissance de l'expression d'*ikba*. Cette activation suggère une participation de *c-Rel* dans le processus apoptotique.

AVANT-PROPOS

“La protéine c-Rel, produit du proto-oncogène *c-rel*, est un facteur de transcription, membre de la famille Rel/NF- κ B”

Cette phrase illustre assez bien l'étendue du sujet c-Rel et les diverses voies qui s'offrent à nous pour l'aborder avant même d'évoquer ses fonctions physiologiques. En effet, s'agissant du produit d'un gène que l'on classe dans la catégorie des proto-oncogènes, ce qui sous-entend son implication dans des phénomènes de cancérisation, nous pourrions aborder l'étude de c-Rel dans le cadre du rôle des facteurs de transcription dans l'oncogenèse. S'agissant d'un facteur de transcription, nous pourrions nous attarder longuement sur les phénomènes complexes de régulation de la transcription génique au sein desquels, ceux que l'on nomme les facteurs de transcription jouent des rôles déterminants aux côtés du premier rôle tenu par la machinerie transcriptionnelle de base. Et s'agissant enfin non seulement d'un facteur de transcription mais surtout d'un facteur de transcription de la famille Rel/NF- κ B, nous nous devons d'étudier c-Rel dans son contexte familial où les liens de parenté et les relations fraternelles conditionnent le devenir et le fonctionnement de chacun des membres de cette famille.

Sans pour autant faire une complète abstraction des facettes “oncogenèse” et “transcription” qui seront abordées aux moments opportuns, nous allons pénétrer directement dans le monde des protéines de la famille Rel/NF- κ B. Le sujet Rel/NF- κ B étant particulièrement vaste nous ne chercherons pas à être exhaustif, mais nous aurons soin de choisir dans la littérature, un certain nombre d'exemples significatifs pour illustrer les points abordés. L'introduction de ce mémoire a pour but de présenter les différents membres de la famille et leurs caractéristiques de fonctionnement, de donner un aperçu des mécanismes qui régulent leurs fonctions, en particulier leurs interactions avec les protéines inhibitrices de la famille I κ B, et d'aborder les phénomènes biologiques dans lesquels elles sont impliquées. c-Rel sera traité sur le même plan que les autres facteurs au cours cette introduction.

Nous ouvrirons ensuite un premier volet de ce travail de thèse présenté dans un article soumis pour publication et qui établit les relations de phylogénèse moléculaire unissant les

facteurs de transcription de la famille Rel/NF- κ B et leurs inhibiteurs I κ B. Le cas précis du facteur de transcription c-Rel sera détaillé dans une seconde partie du mémoire sur la base d'un article de revue publié au cours de la thèse et complété de données bibliographiques plus récentes. Suite à cette étude bibliographique plus rapprochée de la protéine c-Rel, nous aborderons un second volet de ce travail de thèse qui décrit l'expression du facteur de transcription c-Rel dans le thymus de poulet : au cours du développement des lymphocytes T pendant l'embryogenèse d'une part (dans un article soumis pour publication), et au cours de l'apoptose thymocytaire d'autre part (dans un article accepté pour publication). Les réflexions et les perspectives qu'engendrent ces travaux seront traités en conclusion du mémoire.

ABREVIATIONS

ADN : Acide déoxyribonucléique

APC : Antigen Presenting Cell

ARN : Acide ribonucléique

DSPI : Dorsal Switch Protein 1

FADD : Fas Associated Death Domain

G-CSF : Granulocyte-Colony Stimulating Factor

GM-CSF : Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor

HCMV : Human cytomegalovirus

HIV-1 : Human Immunodeficiency Virus Type-1

HMGI(Y) : High-Mobility-group I (Y)

HRI kinase : Haem-Regulated eIF-2 kinase

HILVI : Human T-Cell Leukemia Virus Type I

IE : Immediate-Early

I κ B : Inhibiteur κ B

IL-(1) : Interleukine-(1)

IL-2R : IL-2 Receptor

IRF-1 : Interferon regulatory factor 1

kD : kiloDalton

LMP1 : Latent-Infection Membrane Protein 1

LPC : Lymphocyte Precursor Cell

LPS : Lipopolysaccharide

MEKK1 : Mitogen-activated protein kinase/ERK Kinase Kinase-1

MHC : Major Histocompatibility Complex

MIP-2 : Macrophage inflammatory protein 2

NES : Nuclear Export Sequence

NF- κ B : Nuclear Factor κ B

NGF : Nerve Growth Factor
NGFR : Nerve Growth Factor Receptor
NLS : Nuclear Localisation Sequence
NO : oxyde nitrique
nrg : non-rel gene
PHA : Phytohémagglutinine
PKA : Protéine Kinase A
PKC : Protéine Kinase C
PKR : double-stranded RNA-activated Ser/Thr Protein Kinase
PMA : Phorbol 12-Myristate 13-Acetate
RHD : Rel Homology Domain
SRE : Serum Responding Element
SRF : Serum Responsive Factor
TCR : T Cell Receptor
TNF : Tumor Necrosis Factor
TNFR1 : Tumor Necrosis Factor Receptor 1
TPCK : N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone
TRADD : TNFR Associated Death Domain
TRAF-1 : TNFR associated-Factor 1
TUNEL : Terminal deoxyTransferase mediated dUTP Nick End Labelling
VCAM1 : Vascular Cell Adhesion Molecule 1

Il sera fait usage dans ce mémoire de termes de langue anglaise et d'un certain jargon scientifique (phosphoryler, transactiver, transactivateur, surexprimer, surexpression...) lorsque ceux-ci s'avèrent incontournables ou rendent la lecture plus aisée, c'est pourquoi je prie le lecteur de m'en excuser.

INTRODUCTION

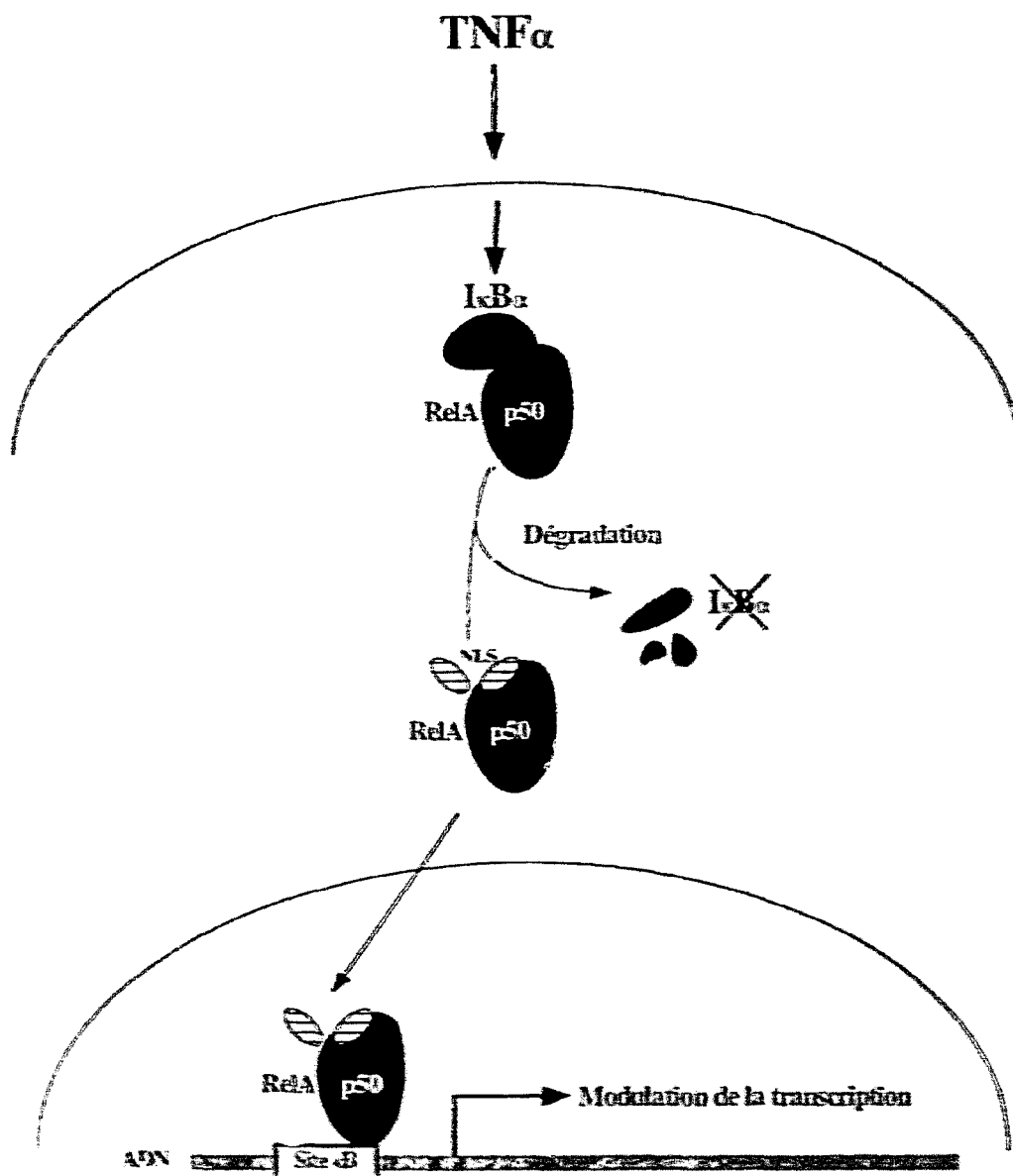


Figure 1 : Activation du facteur de transcription RelA/p50

Le facteur de transcription "NF- κ B" a été défini, à l'origine, comme un facteur nucléaire (NF) régulant la transcription du gène des chaînes κ des immunoglobulines (Sen and Baltimore, 1986a; Sen and Baltimore, 1986b). Le facteur "NF- κ B" est constitué du dimère RelA/p50 et la séquence à laquelle il se fixe a pris le nom de site κ B. Des comparaisons de séquences ont ensuite révélé que les facteurs c-Rel et v-Rel présentaient des identités de séquence avec les protéines RelA et p50. Les facteurs Rel/NF- κ B sont, en règle générale, exprimés dans le cytoplasme, où ils sont retenus par des protéines inhibitrices I κ B, dans l'attente de signaux qui induiront leur libération et leur migration dans le noyau cellulaire où ils moduleront la transcription de leurs gènes cibles. Le plus étudié de ces facteurs est constitué du dimère RelA/p50 qui est séquestré dans le cytoplasme de différents types cellulaires par la protéine inhibitrice I κ B α . A titre d'exemple, une stimulation par le TNF α induira la dégradation d'I κ B α libérant le dimère RelA/p50 qui une fois dans le noyau pourra moduler la transcription de gènes cibles présentant des sites spécifiques κ B répondant aux facteurs Rel/NF- κ B. (figure 1).

1. La famille Rel/NF- κ B

L'appartenance à cette famille de protéine est basée sur la présence d'un domaine d'environ 300 acides aminés, le domaine d'homologie Rel (RHD pour "Rel Homology Domain"), commun à tous les facteurs Rel/NF- κ B et sur lequel nous nous attarderons après avoir présenté les différents membres de la famille.

1.1. Les facteurs de transcription de la famille Rel/NF- κ B

La famille Rel/NF- κ B comprend 6 membres différents chez les vertébrés, 3 chez la drosophile et 1 chez l'aropnée. Ils peuvent être répartis en deux groupes, selon qu'ils présentent ou non dans leur partie C-terminale un domaine de régulation de la transcription appelé domaine transactivateur (figure 2).

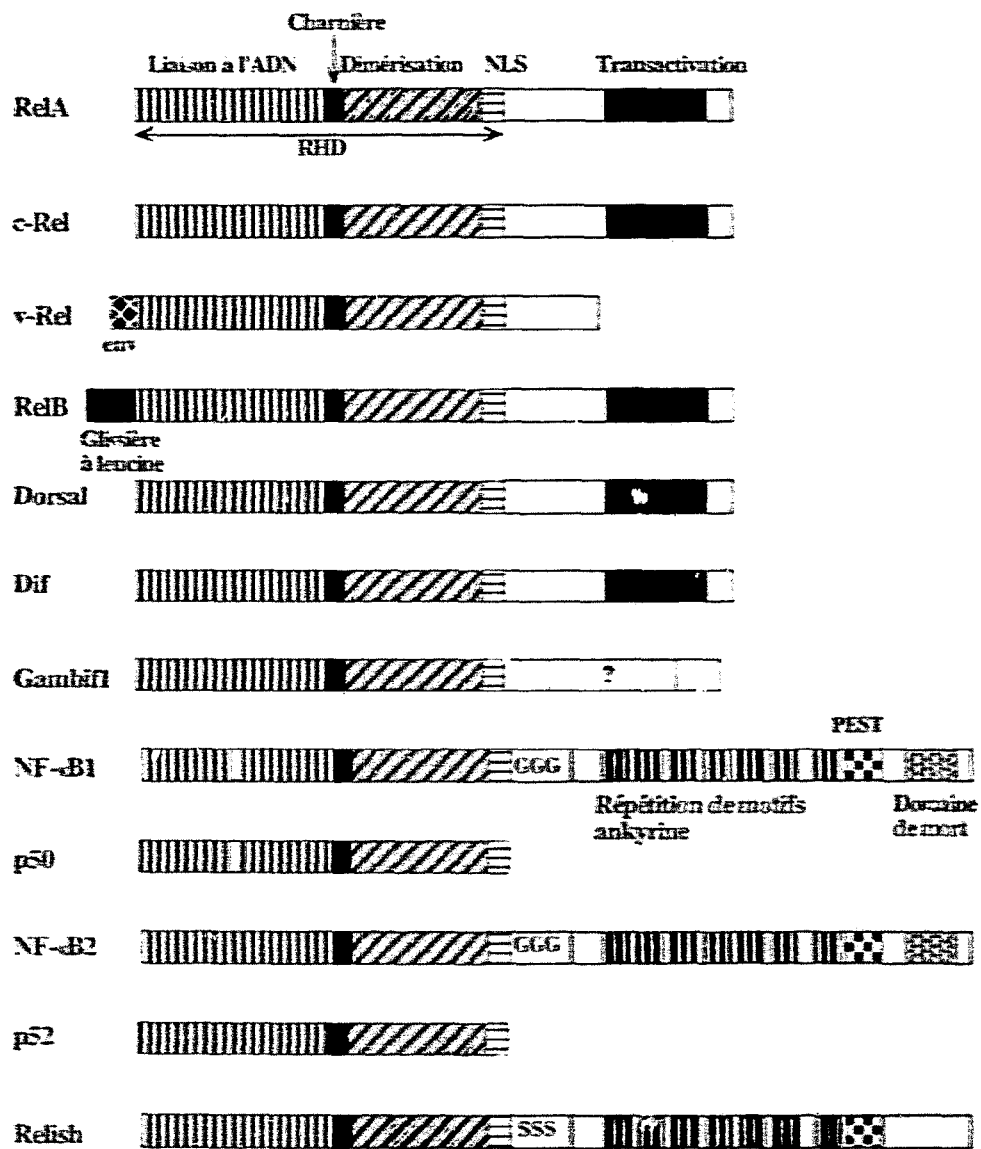


Figure 2 : La famille Rel/NF-κB

Les protéines c-Rel (produit du gène *c-rel*), RelA, également appelée p65, (*rela*), RelB (*relb*), et les protéines de drosophile Dorsal (*dorsal*) et Dif (*dif*) appartiennent à la classe des facteurs à domaines transactivateurs (Brownell et al., 1989; Grumont and Gerondakis, 1989; Capobianco et al., 1990; Wilhemsen et al., 1984; Tamahill and Wardle, 1995; Ruben et al., 1991; Deloukas and Van Loon, 1993; Nolan et al., 1991; Kao and Hopwood, 1991; Ikeda et al., 1993; Ruben et al., 1992; Ryseck et al., 1992; Suzuki et al., 1995; Steward, 1987; Ip et al., 1993). v-Rel (produit du gène *v-rel*), l'équivalent viral de c-Rel, et Gambif1 (*Gambif1*), la protéine d'anophèle, peuvent également être associés à la classe des transactivateurs, car bien qu'un domaine de transactivation n'ait pas été clairement défini dans leur extrémité C-terminale, ils ont la faculté d'activer la transcription (Wilhemsen et al., 1984; Barillas-Mury et al., 1996).

A la seconde classe de facteur de la famille Rel/NF- κ B, appartiennent les protéines NF- κ B1 et NF- κ B2, encore appelées p105 et p100 (produits des gènes *nfkb1* et *nfkb2*) ainsi que la protéine de drosophile Relish (*relish*). Elles présentent à la place d'un domaine de transactivation des répétitions de motifs ankyrine dans leur extrémité C-terminale (Kieran et al., 1990; Ghosh et al., 1990; Meyer et al., 1991; Neri et al., 1991; Schmid et al., 1991; Capobianco et al., 1992; Mercurio et al., 1992; Ikeda et al., 1993; Bours et al., 1992; Sif and Gilmore, 1993; Ikeda et al., 1994; Dushay et al., 1996). Les protéines NF- κ B1 et NF- κ B2 sont des précurseurs qui seront coupés protéolytiquement pour donner naissance aux sous-unités p50 et p52 respectivement, qui représentent les facteurs de transcription actifs, capables d'interagir avec les différents membres de la famille Rel/NF- κ B (voir le paragraphe dimérisation ci-après) (Bours et al., 1990; Ghosh et al., 1990; Kieran et al., 1990; Meyer et al., 1991).

Récemment, une nouvelle protéine Rel/NF- κ B, très proche de la p50 car reconnue par des anticorps dirigés contre cette dernière, a été identifiée dans des lymphomes de cellules B. Cette protéine de 55 kD est également présente dans des cellules de rat issues de souris déficientes pour le gène *nfkb1* et donc pour la protéine p50, ce qui indique que la p55 est issue d'un gène différent, non-identifié (Phillips et al., 1996).

Avant de décrire plus en détail les domaines C-terminaux des protéines Rel/NF- κ B, nous allons aborder leur domaine N-terminal commun, le RHD.

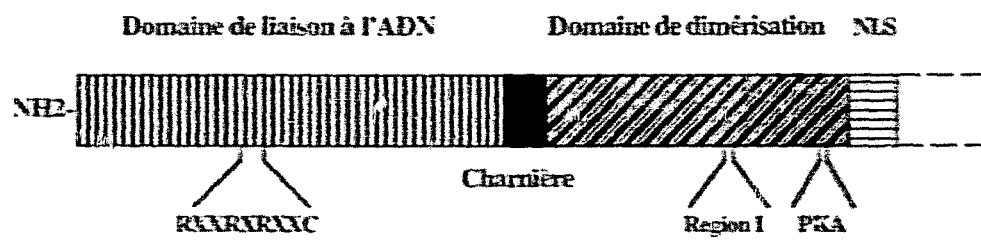


Figure 3 : Organisation du Domaine d'Homologie Rel (RHD)

1.2. Le domaine d'homologie Rel ou RHD

Le RHD est la signature des facteurs de la famille Rel/NF- κ B qui présentent entre 35% et 61% d'identité dans ce domaine (Bours et al., 1992; Ryseck et al., 1992; Ip et al., 1993). Le RHD comprend des séquences cruciales au fonctionnement des facteurs de transcription Rel/NF- κ B : le domaine de liaison à l'ADN, le domaine de dimérisation, le signal de localisation nucléaire et les domaines d'interaction avec les protéines inhibitrices de la famille I κ B (figure 3).

1.2.1. Le domaine de liaison à l'ADN

Le domaine de liaison à l'ADN a été localisé par des expériences de délétion et de mutagenèse dirigée dans la partie N-terminale du RHD (Logeat, 1991; Bressler et al., 1993; Coleman et al., 1993). Le motif RXXRXXXC est essentiel à la liaison à l'ADN (Kumar et al., 1992; Bressler et al., 1993; Toledano et al., 1993). Le résidu cystéine de ce motif est indispensable et doit impérativement se trouver sous forme réduite, son oxydation interférant avec la liaison à l'ADN (Toledano and Leonard, 1991; Kumar et al., 1992; Matthews et al., 1993; Toledano et al., 1993; Hayashi et al., 1993). Le domaine de liaison à l'ADN des facteurs de transcription Rel/NF- κ B est d'un genre nouveau comme en témoigne l'étude du complexe formé d'un homodimère p50 lié à l'ADN qui a été cristallisé dans deux laboratoires simultanément (Ghosh et al., 1995; Müller et al., 1995). Les résultats de cristallographie confirment des données de prédiction de structure établies préalablement (Lin et al., 1994). Ce domaine est replié en feuillet β et relié par une large boucle au domaine de dimérisation lui aussi replié en feuillet β . Ce genre de repliement est très proche de celui des immunoglobulines et l'homodimère ainsi replié et lié à l'ADN présente une allure caractéristique de papillon (figure 4) (pour revue : Chytil and Verdine, 1996; Müller et al., 1996). Si le domaine de liaison à l'ADN a été longtemps considéré comme seul responsable de la reconnaissance spécifique des séquences consensus κ B 5'-GGGRNYYCC-3' sur la molécule d'ADN (Urban and Baeuerle, 1990; Urban et al., 1991; pour revue : Baeuerle and Henkel, 1994; Miyamoto and Verma, 1995), il

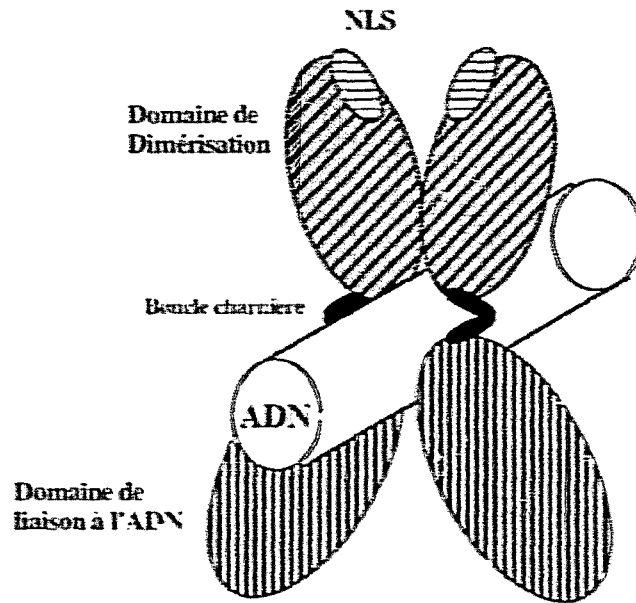


Figure 4 : Représentation schématique de la structure tridimensionnelle du RHD d'un homodimère p50 lié à l'ADN

semble en fait que des résidus du domaine de dimérisation puissent également jouer un rôle dans cette reconnaissance (Schmid et al., 1994). Des études de mutagenèse dirigée ainsi que l'analyse de la structure cristalline du complexe p50/p50-ADN montrent également que des résidus des deux domaines, liaison à l'ADN et dimérisation, interagissent avec la molécule d'ADN (Ryseck et al., 1995; Müller et al., 1995; Ghosh et al., 1995).

A cette étape, il est important de préciser que d'autres facteurs de transcription, les facteurs NF-AT, présentent un domaine de liaison à l'ADN homologue à celui des protéines Rel/NF- κ B. Bien que l'identité de séquence dans ce domaine soit faible (<20%) (Northrop et al., 1994), les facteurs NF-AT adoptent le même repliement tridimensionnel que p50/p50, lorsqu'ils se lient à l'ADN (Wolfe et al., 1997). Pour ces différentes raisons, ils peuvent être considérés comme des parents éloignés de la famille Rel/NF- κ B (McCaffrey et al., 1993; Northrop et al., 1994; Jain et al., 1995) et nous les retrouverons dans l'étude phylogénétique des facteurs Rel/NF- κ B et I κ B.

Notons que les facteurs NF-AT, en dépit de leur ressemblance avec le domaine de liaison à l'ADN du RHD, ne reconnaissent pas les sites consensus κ B (pour revue Chytil and Verdine, 1996; Wolfe et al., 1997). Ils reconnaissent par contre des variants du site κ B (Good et al., 1996; Rooney et al., 1995; Harhaj et al. 1996a) et peuvent même être en compétition avec des facteurs Rel/NF- κ B pour un même site (Casolaro et al., 1995). Par ailleurs, il existe des facteurs n'ayant aucune identité de séquence avec les facteurs Rel/NF- κ B qui se lient à des sites consensus κ B, mais qui ne seront pas évoqués dans notre étude (pour revue : Miyamoto and Verma, 1995).

1.2.2. Le domaine de dimérisation

Ce domaine est principalement responsable de l'association en dimères des facteurs Rel/NF- κ B, mais pas exclusivement puisqu'il intervient aussi dans la liaison à l'ADN (voir ci-dessus). Il est localisé à l'extrémité C-terminale du RHD (Logeat, 1991; Bressler et al., 1993; Doerre et al., 1993; Ganchi et al., 1993) et se replie lui aussi en feuillets β (Ryseck et al., 1995; Müller et al., 1995; Ghosh et al., 1995). Au sein de ce domaine, se trouve un site consensus de

phosphorylation pour la PKA (Protéine Kinase A), conservé chez les membres de la famille Rel/NF- κ B à l'exception de RelB et p52 (Bours et al., 1992; Ryseck et al., 1992), qui pourrait intervenir dans le choix du partenaire de dimérisation (Mosialos and Gilmore, 1993; Ganchi et al., 1993). Par exemple, la phosphorylation de RelA sur ce site entraîne l'impossibilité de former des dimères RelA/RelA sans entraver la formation d'hétérodimères RelA/p50 (Ganchi et al., 1993). Ce site semble également être important pour la localisation cytoplasmique de c-Rel, car lorsqu'il est rendu non fonctionnel c-Rel est essentiellement nucléaire (Mosialos et al., 1991).

Après avoir présenté la structure du domaine de dimérisation, il est grand temps que nous évoquions plus précisément cette caractéristique majeure des facteurs de transcription Rel/NF- κ B qu'est la dimérisation. En effet, ces facteurs se lient à l'ADN sous forme de dimères, d'homodimères, comme p50/p50 dont la structure cristalline vient d'être présentée, ou d'hétérodimères. Tous les facteurs Rel/NF- κ B peuvent s'associer en homo- ou hétérodimères, exceptés le facteur RelB qui ne forme que des hétérodimères avec p50 ou p52 (Ruben et al., 1992; Ryseck et al., 1992; Dobrzanski et al., 1993; Dobrzanski et al., 1994; Suzuki et al., 1995) et les protéines de drosophile Dorsal et Dif qui semblent fonctionner en homodimères *in vivo* (Govind et al., 1992; Ip et al., 1993), bien qu'elles aient la capacité de former des hétérodimères *in vitro* (Gross et al., 1996). Le choix du partenaire de dimérisation est très important car il conditionne le degré d'affinité pour les différents sites κ B rencontrés dans les promoteurs de gènes cibles (Urban and Baerle, 1990; Neri et al., 1991; Kunsch et al., 1992; Bours et al., 1992; Fujita et al., 1992; Perkins et al., 1992; Franzoso et al., 1993; Duckett et al., 1993; Parry and Mackman, 1994). Un seul exemple, les homodimères p50 et p52 peuvent toutes deux lier le site κ B de la séquence activatrice (enhancer) du gène HLA humain, mais seul p50/p50 peut lier le site κ B de la séquence activatrice du gène murin de la chaîne κ des immunoglobulines (Neri et al., 1991). Dès lors, on comprend que la composition du dimère Rel/NF- κ B entre en jeu dans le choix du gène cible qui sera régulé. Nous verrons dans un chapitre ultérieur que de la composition du dimère dépendent aussi en partie les capacités d'activer ou de réprimer la transcription des gènes cibles. Cependant, il est clair que le dimère n'est pas seul en jeu et il faut garder à l'esprit qu'en fonction du contexte du promoteur ciblé,

différents cofacteurs moduleront la fonction du dimère Rel/NF- κ B; ce point particulier sera également abordé plus tard.

1.2.3. Le signal de localisation nucléaire

Afin de se lier aux sites κ B sur l'ADN, les dimères Rel/NF- κ B doivent migrer dans le noyau. Les mécanismes de transport vers le noyau des facteurs Rel/NF- κ B ne sont pas bien connus, ni même la forme dimérique ou monomérique qu'ils adoptent pour franchir la membrane nucléaire. Par contre une séquence de localisation nucléaire (NLS pour Nuclear Localisation Signal) a pu être localisée à l'extrémité C-terminale du RHD; elle consiste en une suite d'acides aminés chargés positivement et représente une cible pour l'inhibition des facteurs Rel/NF- κ B par les protéines I κ B, mécanisme sur lequel nous reviendrons plus tard (Blank et al., 1991; Beg et al., 1992; Ganchi et al., 1992; Henkel et al., 1992; Matthews et al., 1993; Zabel et al., 1993; Govind et al., 1996). Cependant, il semblerait que cette séquence ne soit pas indispensable dans la sous-unité mature p50, car des protéines p50 mutantes, ne contenant pas de NLS, forment des homodimères qui migrent efficacement dans le noyau (Ishikawa et al., 1996). Pour Dorsal, en plus du NLS, les 40 premiers acides aminés N-terminaux sont également impliqués dans le transport vers le noyau (Govind et al., 1996).

1.2.4. La région I

Le RHD dans son ensemble semble impliqué dans les interactions avec les protéines I κ B, cependant la spécificité d'interaction avec les différents inhibiteurs I κ B dépend d'une région particulière du domaine de dimérisation des facteurs Rel/NF- κ B, la région I.

Une étude réalisée sur les protéines Dorsal et Dif a permis de définir avec précision cette région de 7 acides aminés, en partie responsable de la spécificité d'interaction de ces protéines avec Cactus, une protéine inhibitrice de type I κ B. Par homologie, on trouve une région I équivalente chez les protéines p50, RelA et c-Rel (Tatei and Levine, 1995). Dorsal et Dif, qui interagissent toutes deux avec Cactus, présentent 6 acides aminés conservés sur 7 dans cette

région, de même que RelA et c-Rel, qui interagissent préférentiellement avec I κ B α (Liou et al., 1992; Hatada et al., 1993). Par contre, p50 ne présente que 2 acides aminés en commun avec RelA et c-Rel dans la région I (Tatei and Levine, 1995) et interagit préférentiellement avec NF- κ B1, qui a également une fonction d'inhibiteur I κ B (Liou et al., 1992; Ishikawa et al., 1996).

1.3. Les domaines C-terminaux

1.3.1. Les domaines transactivateurs

Les protéines c-Rel, RelA, RelB, Dorsal et Dif présentent un domaine de transactivation bien délimité dans leur partie C-terminale (Bull et al., 1990; Kamens et al., 1990; Ip et al., 1991; Richardson and Gilmore, 1991; Schmitz and Baenerle, 1991; Ballard et al., 1992; Dobrzański et al., 1993; Ip et al., 1993). Le domaine de transactivation de RelA est constitué d'une séquence de résidus acides comme celui de la protéine VP16 du virus de l'herpès (herpes simplex) (Schmitz and Baenerle, 1991; Ballard et al., 1992; Blair et al., 1994). Une étude réalisée chez *Saccharomyces cerevisiae* montre que RelA conserve sa capacité transactivatrice chez la levure et définit deux domaines transactivateurs supplémentaires chez RelA: une glissière à leucine et un domaine riche en proline (Moore et al., 1993). c-Rel présente lui aussi un domaine de transactivation acide comparable à celui de RelA ainsi qu'une autre région transactivatrice dans sa partie C-terminale (Bull et al., 1990; Kamens et al., 1990; Ishikawa et al., 1993; Sarkar and Gilmore, 1993). En comparaison, v-Rel, l'équivalent viral de c-Rel, ne présente pas ces domaines (Ishikawa et al., 1993; Kamens et al., 1990; Sarkar and Gilmore, 1993) mais peut quand même activer la transcription dans des cellules peu différenciées (Walker et al., 1992; Ishikawa et al., 1993; Imuzuka et al., 1994; Hrdličková et al., 1994). RelB présente également un domaine transactivateur acide en C-terminal et possède en amont du RHD une séquence similaire aux glissières à leucine (Bours et al., 1992; Ryseck et al., 1992; Dobrzanski et al., 1993; Bours et al., 1994). De façon surprenante, une étude montre que si le RHD de RelA ne présente, comme attendu, aucune activité transactivatrice celui de p50 peut activer la transcription chez la levure lorsqu'il est fusionné au domaine de liaison à l'ADN de la protéine

Gal4 alors que la protéine p50 native est dénuée d'activité transactivatrice propre chez les eucaryotes supérieurs (Moore et al., 1993).

1.3.2. Les motifs ankyrine et la séquence de type PEST

Les motifs ankyrine sont des répétitions d'une séquence d'environ 33 acides aminés dont la caractéristique est de promouvoir des interactions protéine-protéine (Michaely and Bennett, 1992). Les protéines NF- κ B1 et NF- κ B2 présentent 7 motifs ankyrine dans leur partie C-terminale (Frachiolla et al., 1993; Héron et al., 1995). Relish, la protéine de drosophile présentant la même organisation protéique que NF- κ B1 et NF- κ B2, ne contient que 6 motifs ankyrine, et l'on peut supposer que sa maturation protéolytique produira un facteur de transcription actif analogue à p50 et p52 (Dushay et al., 1996).

Les domaines ankyrines sont reliés au RHD par une séquence riche en glycine pour NF- κ B1 et NF- κ B2 et une séquence riche en sérine pour Relish. Ces séquences semblent jouer un rôle de signal pour la dégradation de la partie ankyrine lors de la maturation de ces précurseurs en facteur p50 et p52 (Betts and Nabel, 1996; Lin and Ghosh, 1996).

Les motifs ankyrine des protéines NF- κ B1, NF- κ B2 et Relish sont suivis d'une séquence PEST que l'on considère généralement comme une séquence qui sensibilise les protéines à la dégradation (Rechsteiner, 1990). Il est clairement établi que cette séquence PEST est requise pour la dégradation de la partie ankyrine de NF- κ B1 et la libération du facteur p50 en réponse à une stimulation chimique par le PMA et l'ionomycine (MacKichan et al., 1996).

1.3.3. Le domaine de mort ou "death domain"

Pour clore le chapitre des différents domaines protéiques des facteurs Rel/NF- κ B, un mot seulement pour signaler l'existence d'un domaine nommé domaine de mort ou "death domain". Il est situé après la séquence PEST à l'extrémité C-terminale des protéines NF- κ B1 et NF- κ B2 (Feinstein et al., 1995). Ce domaine semble se replier en une série d'hélices alpha reliées par des boucles. Son nom est dû à sa découverte dans un certain nombre de molécules

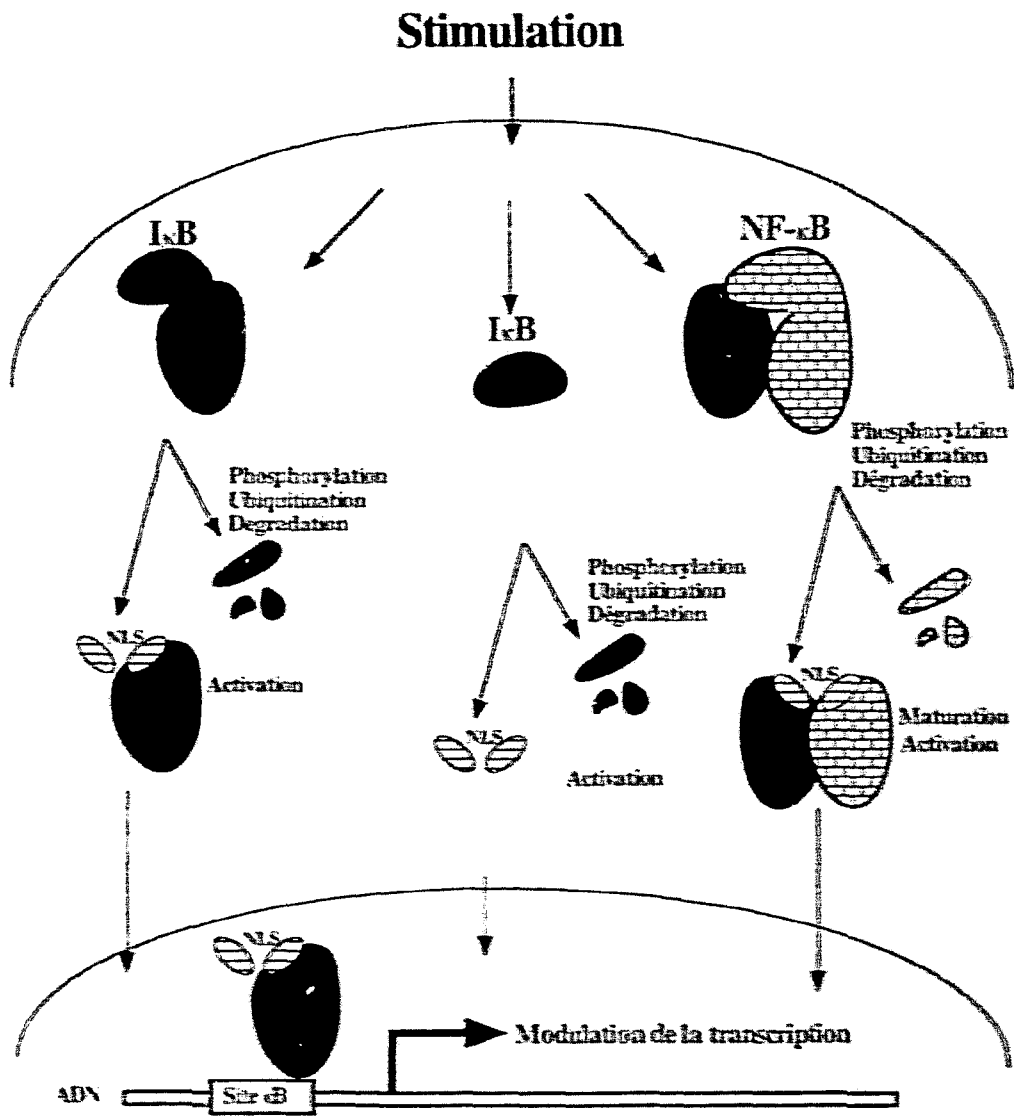


Figure 5 : Activation des facteurs de transcription Rel/NF- κ B

impliquées dans l'apoptose, par exemple le récepteur Fas/Apo1 ou encore les récepteurs au TNF, TNFR1 (Tumor Necrosis Factor Receptor 1) ou au NGF, NGFR (Nerve Growth Factor Receptor). Ce domaine est responsable d'interactions protéine-protéine et a été impliqué dans la signalisation de messages cytotoxiques ainsi que dans l'activation des facteurs Rel/NF- κ B par le TNF α ou le ligand de Fas (Feinstein et al., 1995; Marsters et al., 1996). Sa fonction dans les protéines NF- κ B1 et NF- κ B2 n'est pas connue.

Nous connaissons donc deux classes de facteurs de transcription Rel/NF- κ B, les facteurs directement fonctionnels, à domaine transactivateurs, RelA, c-Rel *etc.* et les facteurs p50 et p52 qui sont obtenus par élimination des motifs ankyrine des précurseurs NF- κ B1 et NF- κ B2. Il reste à cette étape de notre description plusieurs points à aborder : les signaux qui régissent la maturation des précurseurs NF- κ B; les acteurs de cette maturation et enfin, les fonctions des formes précurseurs de p50 et p52 autres que celle de produire des sous-unités matures Rel/NF- κ B.

Pour mieux aborder ces différents points, il nous faut introduire la notion d'inhibiteur des facteurs de transcription Rel/NF- κ B et la famille des protéines inhibitrices I κ B.

2. La famille I κ B

Comme nous l'avons brièvement décrit en préambule de cette introduction, les facteurs Rel/NF- κ B, qui exercent leurs fonctions dans le noyau, sont en fait séquestrés dans le cytoplasme par des protéines inhibitrices de la famille I κ B dans l'attente d'une stimulation qui induira leur migration dans le noyau (figure 5) (Baeuerle, 1988a; Baeuerle, 1988b; Morrison et al., 1989; Davis et al., 1990; Kochel et al., 1991; Mercurio et al., 1993; Scheinman et al., 1993; Naumann et al., 1993; Naumann et al., 1993; Zabel et al., 1993; Hralickova et al., 1995). Avant, d'aborder les différentes fonctions et les régulations des protéines I κ B, nous commenceront par présenter les membres de cette famille (figure 6).



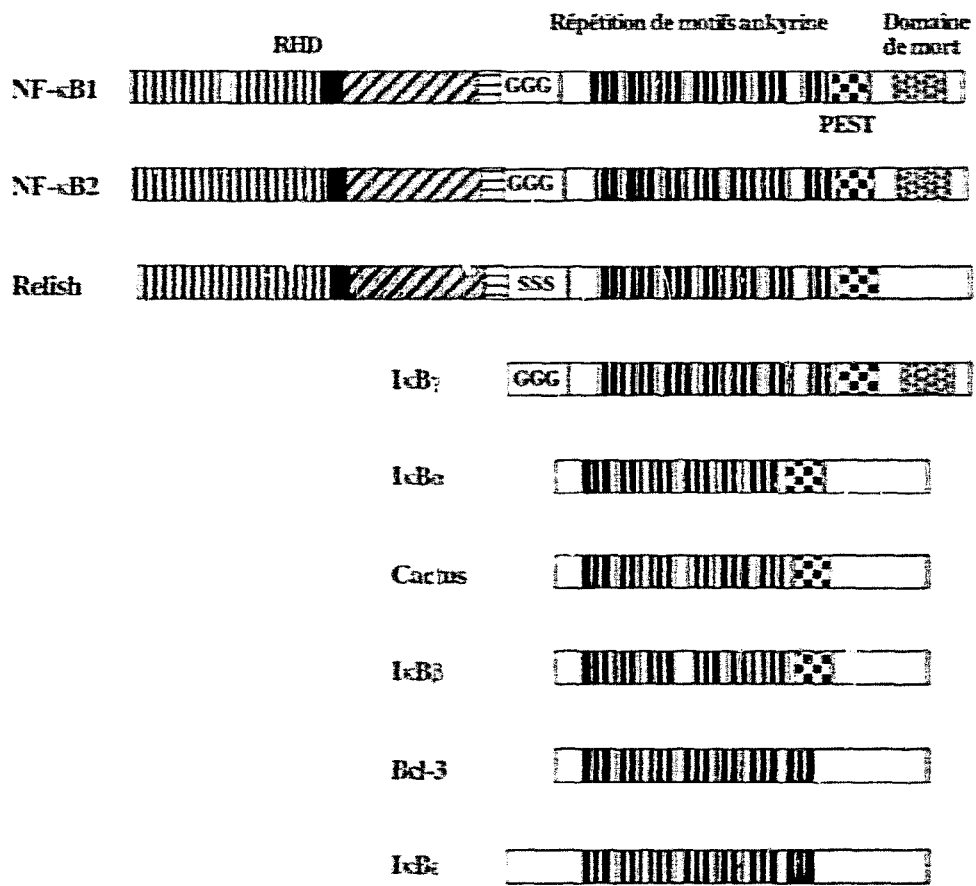


Figure 6 : La famille IκB

2.1. Les membres de la famille IκB

Il s'agit de protéines composées, au moins en partie, de répétitions de motifs ankyrine qui leur permettent d'interagir avec les facteurs de transcription Rel/NF-κB. La famille IκB³ constitue une sous-famille de la vaste famille des protéines à motifs ankyrine qui contient entre autres des protéines du cytosquelette (Michaely and Fennet, 1992). Si d'autres protéines à motifs ankyrine, comme la myotrophine cardiaque semble présenter une activité de type IκB en interagissant *in vitro* avec les dimères RelA/p50 (Sivasubramanian et al., 1996), cette fonction *in vivo* n'a été attribuée, pour l'instant, qu'à des protéines typiques de la famille IκB.

Cette famille comprend deux classes de protéines. La première est constituée des protéines NF-κB1, NF-κB2 et Relish qui contiennent le RHD et des motifs ankyrine, ce qui leur confère l'appartenance aux deux familles Rel/NF-κB et IκB. Les protéines précurseurs NF-κB1 et NF-κB2, dans leur forme native, interagissent avec d'autres facteurs Rel/NF-κB et les retiennent dans le cytoplasme (figure 5) (Blank et al., 1991; Henkel et al., 1992; Rice et al., 1992; Naumann et al., 1993; Naumann et al., 1993; Hrdlickova et al., 1995).

La seconde classe contient les protéines IκB_c, que nous qualifierons de courtes, car elles ne contiennent que des motifs ankyrine. Cette classe d'IκB courtes englobe : IκBα (produit du gène *ikba*, encore appelé MAD-3) et son homologue de drosophile *Cactus* (*cactus*, IκBβ (*ikkb*)), IκBγ (*ikbg1*) et Bcl-3 (*bcl3*) (Zabel and Bauerle, 1990; Haskill et al., 1991; De Martin et al., 1993; Tewari et al., 1992; Davis et al., 1991; Kerr et al., 1991; Geisler et al., 1992; Roth et al., 1991; Link et al., 1992; Thompson et al., 1995; Inoue et al., 1992; Ohno et al., 1990; Kerr et al., 1992; Wolczyn et al., 1992). Une nouvelle IκB humaine, IκBε, très proche d'IκBα et IκBβ vient d'être décrite et s'ajoute à cette classe des IκB courtes (Whiteside et al., 1997).

Il faut préciser qu' IκBγ est identique à la partie C-terminale de NF-κB1 et qu'elle est caractérisée dans des cellules lymphoïdes de souris uniquement (Inoue et al., 1992). Cette protéine IκBγ n'est issue ni de la traduction d'un ARN messager produit par épissage alternatif, ni d'un clivage protéolytique de NF-κB1, mais de la traduction d'un ARN messager dont la transcription débute à l'intérieur de l'intron 11 du gène *ikbg1* (Héron et al., 1995). Une protéine équivalente, que l'on nommerait IκBδ, issue du gène *ikbd2*, n'a pas été décrite.

Une autre I κ B, produit du gène A238L, a été décrite chez le virus ASFV (African Swine Fever Virus) et présente des homologies avec I κ B α (Yanez et al., 1995; Powell et al., 1996). Enfin, une protéine I κ B-R, produit putatif d'un ADN complémentaire isolé de cellules épithéliales humaines, présenterait des homologies avec Cactus mais ne contiendrait que 3 motifs ankyrine, et serait spécifique de l'inhibition de la liaison à l'ADN de p50 sous forme homo- ou hétérodimère. Cette protéine est présente dans des lignées de cellules épithéliales et son ARN messager est détecté dans le coeur et les muscles squelettiques (Ray et al., 1995). Un autre ADN complémentaire dont le produit serait I κ BL, contenant 2 motifs ankyrine complets et un incomplet, a été décrit mais aucune étude fonctionnelle de la protéine n'est disponible pour l'instant (Albertella and Campbell, 1994). Nous ne traiterons par la suite que des deux classes d'inhibiteurs I κ B définis préalablement, car les autres protéines I κ B sont moins étudiées ou les études ne sont pas publiées.

2.2. Les fonctions des protéines I κ B

Les protéines courtes I κ B partagent *in vivo* avec les précurseurs NF- κ B1 et NF- κ B2 la fonction de rétention des facteurs de transcription Rel/NF- κ B dans le cytoplasme, à l'exception de Bcl-3, dont la fonction particulière sera traitée séparément. Elles présentent d'autres fonctions, toujours liées à la régulation des facteurs Rel/NF- κ B, que nous aborderons dans un deuxième temps. Afin de présenter uniquement des fonctions redondantes, nous verrons que chaque protéine I κ B présente des particularités fonctionnelles.

2.2.1. La rétention cytoplasmique des facteurs Rel/NF- κ B : domaines impliqués et spécificités d'interaction

Comme nous venons de le voir, la famille I κ B est constituée de protéines à motifs ankyrine et chaque motif présente environ 33 acides aminés (Michaely and Bennet, 1992). Les protéines NF- κ B1 et NF- κ B2 contiennent 7 motifs ankyrine (Frachiolla et al., 1993; Héron et

Rel/NF- κ B	I κ B					
	I κ B α	I κ B β	I κ B γ	Bcl-3	NF- κ B1 I κ B γ	NF- κ B2
RelA	+++	+++	+++	-	+	+
c-Rel	+++	+++	+++	-	+	+
RelB	+++	nd	nd	-	nd	nd
p50	+/	-	-	+++	+++	nd
p52	+/	-	-	+++	nd	+++
ν -Rel	+	nd	nd	nd	+	+

Figure 7 : Spécificités d'interaction entre les facteurs Rel/NF- κ B et les inhibiteurs I κ B

al., 1995), Relish 6 motifs ankyrine (Dushay et al., 1996) et les protéines I κ B courtes 5 ou 6 motifs ankyrine, si le dernier motif moins conservé est ou non inclus (Hatada et al., 1992; Kidd, 1992; Hatada et al., 1993; Jaffray et al., 1995; De Martin et al., 1995; Whiteside et al., 1997). Il semble que la présence de tous les motifs ankyrine soit nécessaire à l'interaction avec les facteurs Rel/NF- κ B (Hatada et al., 1992; Hatada et al., 1993; Inoue et al., 1992; Ernst et al., 1995; Jaffray et al., 1995; Rotjakob et al., 1996). La séquence PEST est parfois également requise comme dans l'interaction entre v-Rel et I κ B α (Rotjakob et al., 1996).

C'est en masquant leur signal de localisation nucléaire que les protéines I κ B retiennent les facteurs Rel/NF- κ B dans le cytoplasme (Kerr et al., 1991; Kidd, 1992; Beg et al., 1992; Ganchi et al., 1992; Henkel et al., 1992; Inoue et al., 1993; Zabel et al., 1993; Matthews et al., 1993; Kumar and Gelinas, 1993; Tatei and Levine, 1995; White et al., 1996).

Il existe des spécificités d'interaction entre les facteurs Rel/NF- κ B et les différents inhibiteurs I κ B (figure 7). On peut observer des complexes NF- κ B1/RelA, NF- κ B1/c-Rel, NF- κ B1/v-Rel et NF- κ B1/p50 dans le cytoplasme (Mercurio et al., 1993; Davis et al., 1990; Lim et al., 1990) (Morrison et al., 1989; Kochel et al., 1991; Henkel et al., 1993; Naumann et al., 1993; Hrdlickova et al., 1995), bien que certaines études tendent à montrer que NF- κ B1 interagit préférentiellement avec p50 (Hatada et al., 1993; Liou et al., 1992; Ishikawa et al., 1996). De même, NF- κ B2 peut s'associer à RelA, c-Rel, v-Rel et p50 (Lim et al., 1990; Scheinman et al., 1993; Mercurio et al., 1993; Naumann et al., 1993; Sun et al., 1994; Yamaoka et al., 1996). I κ B γ , identique à la partie C-terminale de NF- κ B1, est également capable d'interagir avec différents facteurs Rel/NF- κ B *in vitro* et interagit préférentiellement avec les dimères p50/p50 (Inoue et al., 1992; Liou et al., 1992). Cependant, son rôle *in vivo* n'est pas clair et cette protéine n'a pas été détectée chez l'homme ou le poulet. I κ B α est capable d'interagir avec tous les facteurs Rel/NF- κ B, mais plus efficacement avec les complexes contenant RelA, c-Rel, ou v-Rel (Baumert, 1988; Baumert and Baltimore, 1989; Lim et al., 1990; Urban and Baumert, 1990; Kerr et al., 1991; Davis et al., 1991; Tevan et al., 1992; Stams and Bose, 1992; Scott et al., 1993; Zabel et al., 1993; Dobrzanski et al., 1994; Hansen et al., 1994; Perez et al., 1995; Hrdlickova et al., 1995). I κ B β et I κ B ϵ interagissent avec RelA et c-Rel, mais pas avec p50 (Thompson et al., 1995; Whiteside et al., 1997).

La spécificité d'interaction des protéines I κ B avec les différents facteurs Rel/NF- κ B peut être attribuée à la région I présente dans le RHD des facteurs Rel/NF- κ B (cf. introduction 1.2.4.) mais aussi à un groupe de trois acides aminés situés au début du premier motif ankyrine d'I κ B α et de la partie C-terminale de NF- κ B1 (Hatada et al., 1993). En effet, la délétion de ces trois acides aminés dans la première ankyrine de NF- κ B1 abolit complètement son interaction avec p50, sans modifier ses interactions avec RelA et c-Rel. La même délétion chez I κ B α abolit son interaction avec RelA. Il semblerait que dans les deux cas, ces acides aminés soient responsables d'une conformation protéique plus propice à la liaison avec RelA ou p50 (Hatada et al., 1993). Le nombre de motif ankyrine pourrait également jouer un rôle dans la spécificité d'interaction comme le suggère J.E. Thompson, *et al.* soufign, qui que Bcl-3, NF- κ B1 et I κ B γ , qui présentent 7 motifs ankyrine, interagissent préférentiellement avec p50 alors qu'I κ B α et I κ B β , qui en présentent 6 interagissent plutôt avec RelA et c-Rel (Thompson et al., 1995).

2.2.2. L'inhibition de la liaison à l'ADN des facteurs Rel/NF- κ B

La fonction d'inhibition de la liaison à l'ADN des facteurs Rel/NF- κ B a été décrite pour I κ B α en même temps que sa fonction de rétention cytoplasmique par de nombreux auteurs et pour les différentes espèces où elle est connue (Bauerle, 1988; Zabel and Bauerle, 1990; Urban et al., 1991; Haskill et al., 1991; Kerr et al., 1991; Davis et al., 1991; Jaffray et al., 1995; Kidd, 1992; Diehl et al., 1993; Sun et al., 1993), (Ernst et al., 1995; Arezazana-Seisdedos et al., 1995; Beauparlant et al., 1996). Il s'avère que cette fonction ne s'applique qu'à des complexes contenant RelA, c-Rel ou RelB, car la liaison à l'ADN des dimères p50/p50 et p52/p52 n'est pas inhibée par I κ B α (Urban et al., 1991; Haskill et al., 1991; Beg et al., 1992; Kerr et al., 1992; Lion et al., 1992; Fransoso et al., 1993; N. Van et al., 1993; Matthews et al., 1993) et pourrait même être accentuée par l'interaction avec celle-ci (Duckett et al., 1993). Tout comme la rétention cytoplasmique, l'inhibition de la liaison à l'ADN présente une certaine spécificité et requiert la présence des motifs ankyrine. Par contre, il semble que la séquence acide de type PEST soit indispensable pour inhiber la liaison à l'ADN (Hatada et al., 1993; Jaffray et al., 1995; Ernst et al., 1995; Beauparlant et al., 1996).

Cette fonction d'inhibition de la liaison à l'ADN est également partagée par I κ B γ qui inhibe la liaison des dimères p50/p50 et de complexes contenant RelA ou c-Rel *in vitro* (Inoue et al., 1992; Bell et al., 1996), ainsi que par I κ B β qui inhibe des complexes contenant RelA et c-Rel (Zabel and Bauerle, 1990; Kerr et al., 1991; Urban et al., 1991; Chu et al., 1996; Thompson et al., 1995) et pour qui une phosphorylation dans la séquence PEST est requise pour cette fonction (Kerr et al., 1991; Link et al., 1992; Chu et al., 1996; Suyang et al., 1996).

In vivo, la fonction d'inhibition de la liaison à l'ADN est particulière aux protéines courtes I κ B, car les précurseurs NF- κ B1 et NF- κ B2 sont essentiellement cytoplasmiques (Blank et al., 1991; Henkel et al., 1992; Inoue et al., 1992; Rice et al., 1992; Rice and Ernst, 1993; Scheinman et al., 1993; Chang et al., 1994). Cependant, des études montrent que NF- κ B1 et NF- κ B2 possèdent également la capacité d'inhiber la liaison à l'ADN (Rice et al., 1992; Liou et al., 1992; Hatada et al., 1992; Nammann et al., 1993; Matthews et al., 1993).

2.2.3. Terminaison de l'activité transcriptionnelle et exportation vers le cytoplasme des facteurs Rel/NF- κ B

Cette fonction de terminaison de l'activité transcriptionnelle Rel/NF- κ B dans le noyau est spécifique d'I κ B α . En effet, dans les cellules isolées de souris déficientes pour le gène *ikba*, si la fonction de rétention des facteurs Rel/NF- κ B dans le cytoplasme est assurée par les autres protéines I κ B, la fonction de terminaison n'est pas compensée (Beg et al., 1995; Klement et al., 1996). La stimulation, qui induit l'activation des facteurs Rel/NF- κ B par la dégradation de l'inhibiteur I κ B provoque également sa resynthèse. La protéine I κ B α nouvellement produite migre dans le noyau et se lie au dimère Rel/NF- κ B, ce qui déstabilise l'interaction ADN/Rel/NF- κ B et met fin à l'activité transcriptionnelle Rel/NF- κ B (Arenzana-Seisdedos et al., 1995; Beg et al., 1995). I κ B α prend également en charge le retour dans le cytoplasme des facteurs Rel/NF- κ B et ce, grâce à une séquence d'exportation NES (Nuc. Export Sequence) localisée dans sa partie C-terminale (Arenzana-Seisdedos et al., 1997) (figure 8).

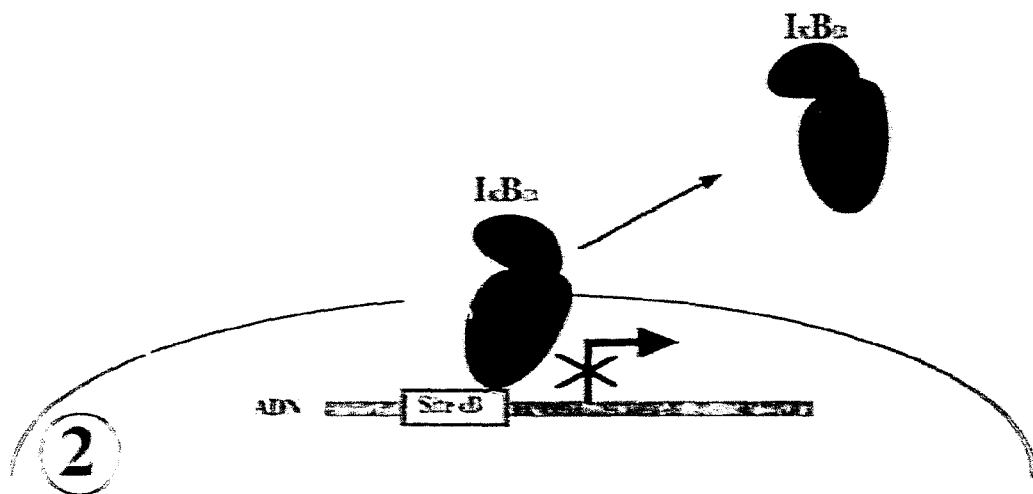
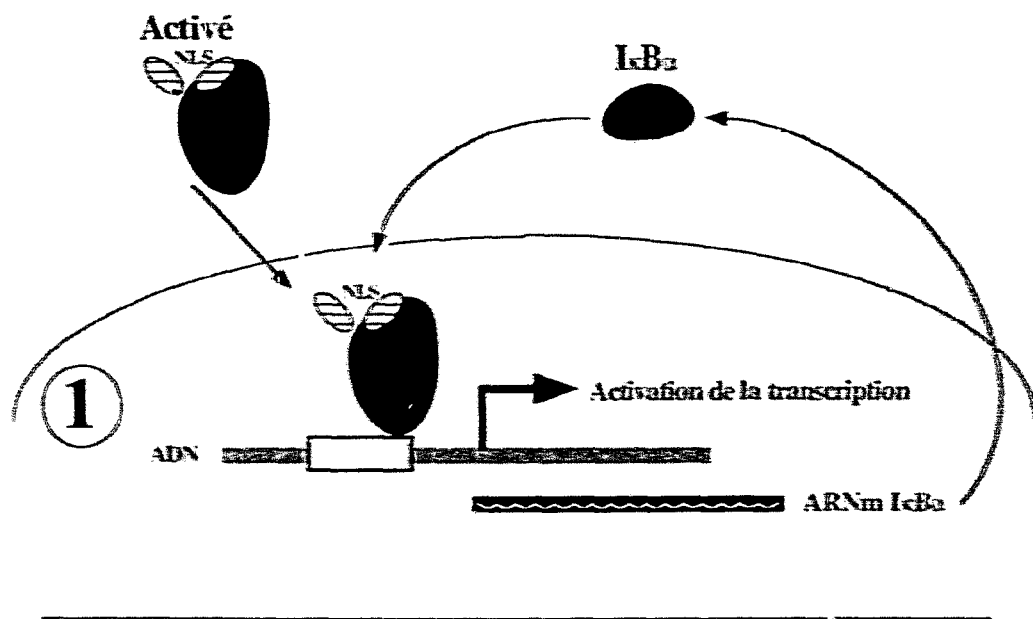


Figure 8 : Terminaison de l'activité transcriptionnelle des facteurs Rel/NF- κ B

2.2.4. Prolongation de l'activité transcriptionnelle des facteurs Rel/NF- κ B

I κ B β , à l'inverse d'I κ B α , est capable de prolonger l'activation des facteurs Rel/NF- κ B et cette fonction lui est spécifique. Elle est aussi nouvellement synthétisée suite à l'activation des facteurs Rel/NF- κ B, en faible quantité et sous une forme non phosphorylée qui lui permet d'interagir avec RelA/p50 mais pas de le retenir dans le cytoplasme ni d'inhiber sa liaison à l'ADN. Le dimère Rel/NF- κ B ainsi lié à une I κ B β non phosphorylée serait protégé des I κ B α nouvellement produites et de leur fonction de terminaison de l'activité transcriptionnelle, permettant ainsi la prolongation de l'activation (figure 9). A noter que cette fonction d'I κ B β n'a été décrite, pour l'instant, que dans une seule étude (Suyang et al., 1996).

2.2.5. Le cas particulier de Bcl-3

Les premières études ont identifié Bcl-3 comme un inhibiteur de la liaison à l'ADN spécifique des dimères p50/p50 et p52/p52 (Kerr et al., 1992; Hatada et al., 1992; Franzoso et al., 1992; Wulczyn et al., 1992; Franzoso et al., 1993; Nolan et al., 1993; Naumann et al., 1993; Inoue et al., 1993). Cependant, à la différence des autres I κ B connues, elle ne présente pas la fonction de rétention cytoplasmique car c'est en fait une protéine essentiellement nucléaire (Bours et al., 1993; Franzoso et al., 1993; Fujita et al., 1993; Caamano et al., 1996). De plus, Bcl-3 pourrait faciliter l'activité transcriptionnelle des hétérodimères RelA/p50 en inhibant la liaison à l'ADN des dimères p50/p50 qui n'activent pas directement la transcription faute de domaine transactivateur (Franzoso et al., 1992; Franzoso et al., 1993). D'autres études, en contradiction avec les précédentes, présentent Bcl-3 comme un activateur propre de la transcription. En effet, l'association de Bcl-3 avec p50/p50 et p52/p52 entraîne une activation de la transcription *in vivo* (Fujita et al., 1993; Bours et al., 1993; Caamano et al., 1996) et ce, par le biais de séquences activatrices N-terminales riches en proline et C-terminales riches en proline et sérine. Quelque soit la fonction que l'on prête à Bcl-3, sa phosphorylation est nécessaire pour une complète efficacité (Nolan et al., 1993; Caamano et al., 1996).

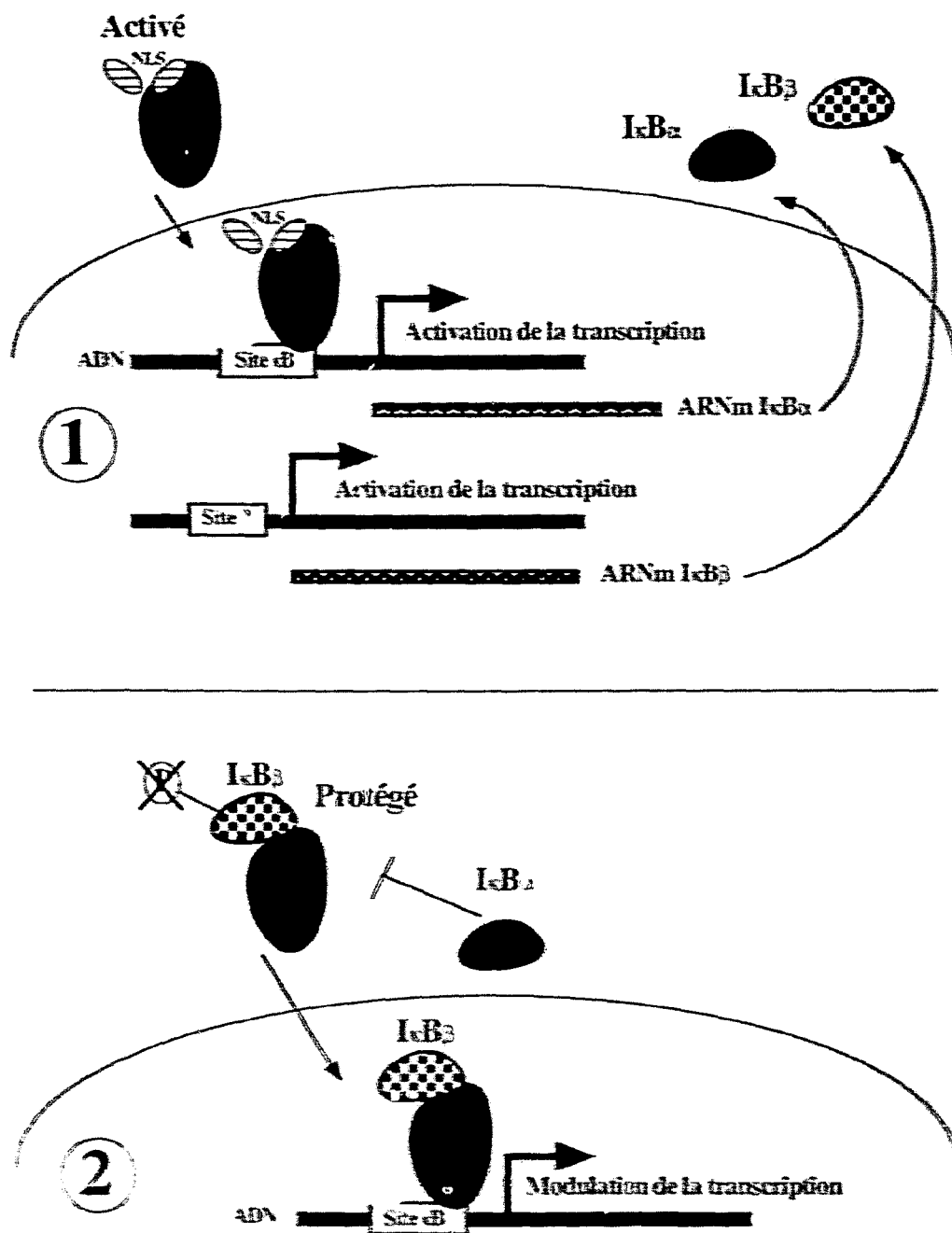


Figure 9 : Prolongation de l'activité transcriptionnelle des facteurs Rel/NF- κ B

3. Le tandem Rel/NF- κ B-I κ B : mécanismes d'activation des facteurs Rel/NF- κ B

Pour plus de clarté, nous venons de présenter séparément les protéines Rel/NF- κ B et I κ B et leur fonctions respectives de régulateur de la transcription et d'inhibiteurs. Cependant, et nous l'avons déjà évoqué au cours des précédents chapitres, ces fonctions sont indissociables tant les interactions entre ces protéines sont étroites et conditionnent leurs comportements réciproques. Il est donc grand temps de les réunir et d'approcher en détail le fonctionnement et la régulation de ce tandem Rel/NF- κ B-I κ B, en commençant par ce qui aurait pu être l'un des premiers chapitres de cette introduction, la dégradation des inhibiteurs I κ B et sa conséquence directe la nucléarisation des facteurs Rel/NF- κ B.

3.1 La dégradation induite des inhibiteurs I κ B entraînant la nucléarisation des facteurs Rel/NF- κ B

3.1.1 La phosphorylation et la dégradation des inhibiteurs I κ B

Des études démontrent que la phosphorylation des inhibiteurs I κ B est indispensable à l'activation des facteurs Rel/NF- κ B (Ghosh and Baltimore, 1990; Naumann and Schneider, 1994). Cependant, l'utilisation d'inhibiteurs de protéases variés (sérine protéases, cystéine protéases, protéasome) montrent que cette phosphorylation, qui représente le premier événement induit par la stimulation, n'est pas suffisante et que la dégradation de l'inhibiteur est requise pour libérer le dimère Rel/NF- κ B. Ceci est non seulement vérifié pour I κ B α et I κ B β (Beg et al., 1993; Mellis et al., 1993; Henkel et al., 1993; Finco et al., 1994; Sun et al., 1994; Traenkle et al., 1994; Alkalay et al., 1995; Belvin et al., 1995; Lin et al., 1995; DiDonato et al., 1995; Milligan et al., 1996; Betts and Nabel, 1996; MacKichan et al., 1996), mais aussi pour les

précurseurs NF- κ B1 et NF- κ B2 qui subissent une maturation par la dégradation de leur partie ankyrine en réponse à une stimulation (Mellits et al., 1993; Mercurio et al., 1993; Naumann and Scheidereit, 1994; Harhaj et al., 1996b).

On peut noter que la vitesse de dégradation d'I κ B α en réponse à un stimulus peut varier et s'avère en général plus élevée que celle d'I κ B β et d'I κ B ϵ (Henkel et al., 1993; Sun et al., 1993; Thompson et al., 1995; Kitajima et al., 1996; Milligan et al., 1996; Whiteside et al.). Ceci a été clairement décrit dans des fibroblastes embryonnaires où une stimulation par le LPS entraîne une réponse biphasique : la dégradation d'I κ B α induit la réponse rapide puis celle d'I κ B β un peu retardée permet la persistance de l'activation (Thompson et al., 1995).

La dégradation de NF- κ B1 et NF- κ B2 est également plus lente que celle d'I κ B α , NF- κ B2 représentant la protéine dont la dégradation induite est la plus retardée (Naumann and Scheidereit, 1994; Betts and Nabel, 1996). Cependant, dans certains types cellulaires, la dégradation des précurseurs suit la même cinétique que celle d'I κ B α (Rice et al., 1992), ce qui suggère que la cinétique de dégradation dépend de la protéine I κ B ciblée mais aussi du type cellulaire. Concernant le délai de maturation des précurseurs, des expériences réalisées en présence d'inhibiteurs de la synthèse protéique suggèrent que le précurseur NF- κ B1 déjà présent et lié à un autre facteur Rel/NF- κ B ne serait pas l'espèce majoritairement civée en réponse au stimulus, mais que ce sont des précurseurs NF- κ B1 nouvellement synthétisés, suite à la stimulation, qui subiraient l'essentiel de la maturation (Harhaj et al., 1996b). Cette explication attrayante du délai de dégradation n'a cependant pas été confirmée par d'autres expériences. Dans un autre esprit, il a été suggéré que, compte-tenu de la lenteur de dégradation des précurseurs, ceux-ci représenteraient des réserves de p50 et p52 susceptibles de reconstituer les stocks cytoplasmiques de sous-unités diminués par la stimulation, plutôt que des complexes sollicités dans la réponse rapide des facteurs Rel/NF- κ B aux stimulations (Siebenlist et al., 1994).

3.1.2 Les séquences impliquées dans la phosphorylation, l'ubiquitination et la dégradation par le protéasome

C'est par des expériences de mutagenèse dirigée et de délétion de séquences que les acides aminés N-terminaux sérine 32 et 36 ciblés par la phosphorylation induite d'I κ B α ont été identifiés (Brockman et al., 1995; Brown et al., 1995; Traenckner et al., 1995; Chen et al., 1995; Whiteside et al., 1995; Chen et al., 1996; DiDonato et al., 1996; Roff et al., 1996; Rodriguez et al., 1996; Sun et al., 1996). Les sérines 19 et 23 sont les acides aminés équivalents ciblés par la phosphorylation chez I κ B β (DiDonato et al., 1996). Les sérines 157 et 161 sont requises pour la dégradation d'I κ B ϵ en réponse au LPS et pourraient être les cibles d'une phosphorylation induite (Whiteside et al., 1997). La phosphorylation des résidus sérine N-terminaux entraîne la polyubiquitination d'I κ B α (Chen et al., 1995; DiDonato et al., 1996; Krappmann et al., 1996; Roff et al., 1996), sur les acides aminés N-terminaux lysine 21 et 22 (Baldi et al., 1996; Rodriguez et al., 1996). La phosphorylation de résidus sérines N-terminaux et l'ubiquitination sont également impliqués dans la maturation de NF- κ B1 (Palombella et al., 1994; Oran et al., 1995).

L'ubiquitination, enfin, signale les inhibiteurs pour la dégradation par le protéasome (Goldberg, 1995; Hochstrasser, 1996). L'utilisation d'un inhibiteur du protéasome montre que celui-ci est responsable de la dégradation d'I κ B ϵ (Whiteside et al., 1997). D'autres expériences ont montré l'implication directe du protéasome 26S dans la dégradation d'I κ B α et la maturation induite de NF- κ B1 (Palombella et al., 1994; Chen et al., 1995).

En règle générale, la séquence PEST ne semble pas requise pour la dégradation induite des inhibiteurs I κ B et seuls les motifs ankyrine sont nécessaires (Aoki et al., 1996; Krappmann et al., 1996) et en particulier le dernier motif ankyrine d'I κ B α contenant une séquence riche en glutamine et leucine (Sun et al., 1996). Cependant, d'autres études ont montré que la séquence PEST était requise pour la dégradation induite d'I κ B α (Whiteside et al., 1995) et que la phosphorylation sur des résidus sérine et thréonine *et* la séquence PEST était nécessaire en plus des motifs ankyrine à la dégradation induite de NF- κ B1 (MacKiehan et al., 1996).

3.1.3 Les kinases impliquées dans la phosphorylation induite des inhibiteurs I κ B

L'identification de la ou des kinases impliquées dans la dégradation des inhibiteurs I κ B est au centre des recherches menées actuellement sur le système Rel/NF- κ B-I κ B. Les premières études datent pourtant de 1990, avec l'implication de la protéine kinase C et de la protéine kinase HRI (Haem-regulated eIF-2 kinase) qui activent Rel/NF- κ B *in vitro* et ciblent I κ B α (Ghosh and Baltimore, 1990).

Depuis, de nombreuses kinases ont été impliquées dans la phosphorylation des inhibiteurs. La kinase Raf-1 est capable d'interagir physiquement avec I κ B α *in vivo*, de la phosphoryler *in vitro* et une protéine de fusion glutathion-S-transférase-Raf-1 peut activer la libération de RelA/p50 *in vitro* (Li and Sedivy, 1993). Il semble que l'activation de RelA/p50 par la phytohémagglutinine (PHA) dans les cellules T passe également par une kinase Raf (Kanno and Siebenlist, 1996).

La kinase PKR (double-stranded RNA-activated Ser/Thr Protein Kinase) activée par l'ARN double brin est aussi capable de phosphoryler I κ B α *in vitro* (Kumar et al., 1994).

Un complexe kinasique de masse moléculaire supérieure à 700 kD, isolé à partir de cellules non-stimulées, est capable de phosphoryler spécifiquement I κ B α sur les résidus sérines 32 et 36, à condition de subir une ubiquitination préalable qui semble ici activer sa fonction plutôt que d'entraîner sa dégradation (Chen et al., 1996). La kinase MEKK1 (Mitogen-activated protein kinase/ERK Kinase Kinase-1) entraîne elle aussi la phosphorylation d'I κ B α *in vivo* mais indirectement via l'activation par phosphorylation du complexe kinasique de 700 kD (Lee et al., 1997).

Enfin, deux kinases de masse moléculaire 36 et 41 kD entraînant la phosphorylation d'I κ B α sur des résidus C-terminaux ont été identifiées grâce à la détection de leur activité kinasique en gel d'agarose (*in gel* kinase assay) (Bennett et al., 1996).

Si certaines candidates semblent prometteuses, il reste néanmoins à déterminer s'il existe une unique I κ B α -kinase vers qui convergeraient les différentes voies d'induction des facteurs

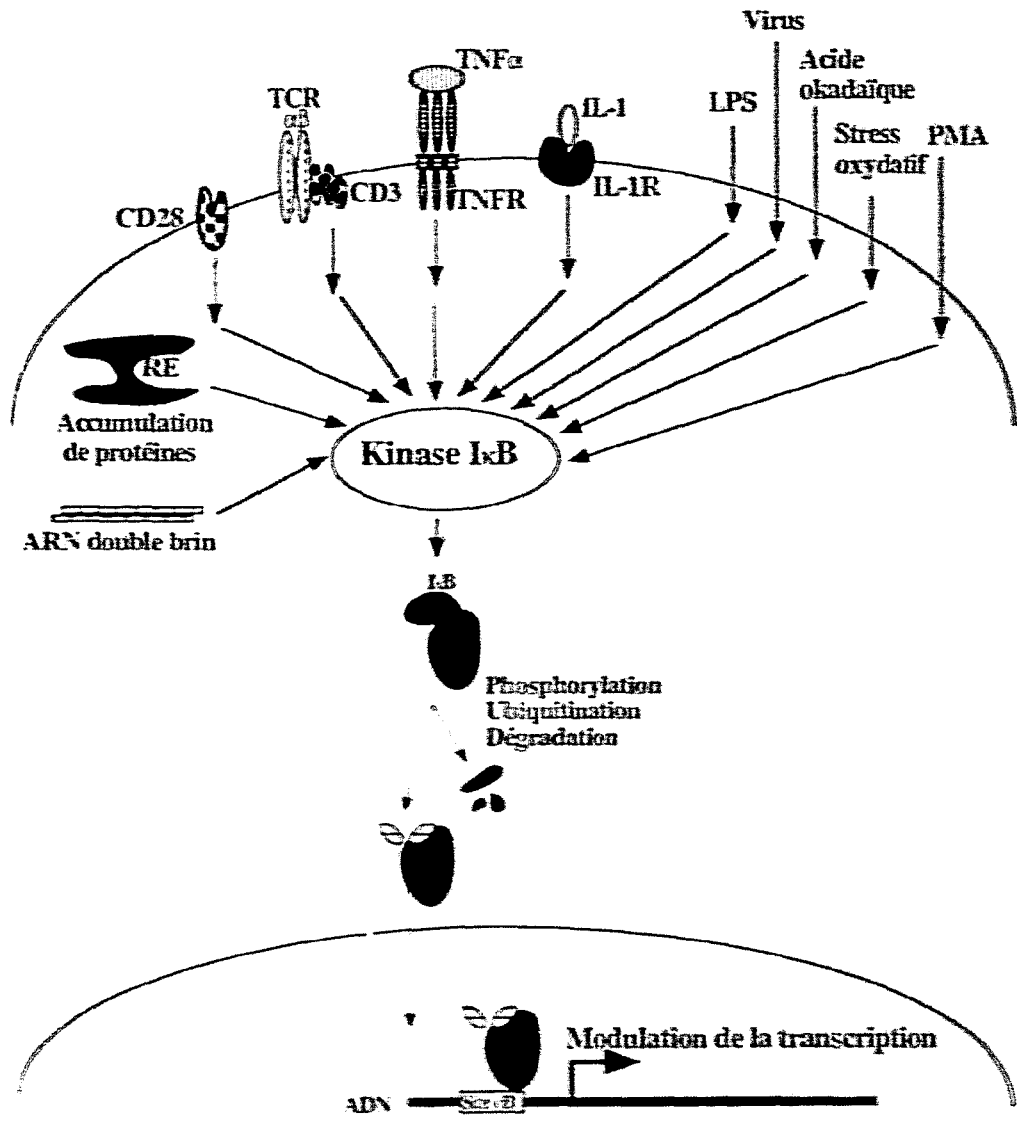


Figure 10 : Signaux d'activation des facteurs Rel/NF- κ B

Rel/NF- κ B, ou si en fonction de ces voies, différentes kinases ayant pour même cible I κ B α peuvent être sollicitées.

3.2. Quelques signaux d'activation des facteurs Rel/NF- κ B induisant la dégradation des inhibiteurs I κ B

Il existe, nous l'avons déjà compris, des signaux spécifiques qui induisent la dégradation de l'inhibiteur I κ B afin d'induire l'activité transcriptionnelle des facteurs Rel/NF- κ B (figure 10). Nous allons voir au travers de quelques exemples, choisis parmi la multitude des signaux d'activation connus, que ceux-ci n'empruntent pas une seule et même voie de signalisation.

Parmi ces signaux, de nombreuses cytokines peuvent être citées : l'IFN γ (interféron γ), les interleukines IL-1 et IL-2, les TNF α (Tumor Necrosis Factor α) et TNF β *etc.*

Le TNF α est sans doute l'agent le plus utilisé pour activer les facteurs Rel/NF- κ B *in vitro*. Il est clair que le TNF α induit la phosphorylation, l'ubiquitination et la dégradation d'I κ B α (Henkel et al., 1992; Brown et al., 1993; Sun et al., 1993; Traenckner et al., 1994; DiDonato et al., 1995; Read et al., 1994; Arenzana-Seisdedos et al., 1995; Traenckner et al., 1995; Aoki et al., 1996; Beg and Baltimore, 1996) (Claudio et al., 1996; Roff et al., 1996; Van Antwerp et al., 1996; Wang et al., 1996; Arenzana-Seisdedos et al., 1997). Il active les kinases de 36 et 41 kD qui ciblent directement I κ B α (Bennett et al., 1996), mais aussi la kinase MEKK1 qui cible la kinase-I κ B α (Lee et al., 1997). Les voies de signalisation conduisant du récepteur au TNF α à l'activation de RelA/p50 ont été explorées et par exemple les céramides, seconds messagers produits par la dégradation de la sphingomyéline et communs aux voies de signalisation du TNF α , induisent également la dégradation d'I κ B α (Kitajima et al., 1996). Les deux récepteurs au TNF, TNFR1 et TNFR2, peuvent entraîner l'activation de RelA/p50 (Laegreid et al., 1994). L'activation de RelA/p50 via le récepteur TNFR1 passe par les protéines TRADD (TNFR associated death domain) (Hsu et al., 1995) et TRAF-2 (TNFR associated) (Hsu et al., 1996; Liu et al., 1996). Alors que le TNF α semble toujours induire la dégradation de I κ B α , son effet sur la maturation des précurseurs est plus variable. Il n'active pas la

maturation de NF- κ B2 (Sun et al., 1994) bien qu'il induise celle de NF- κ B1 (Mellits et al., 1993). Son effet sur I κ B β est également variable en fonction du type cellulaire (Thompson et al., 1995; DiDonato et al., 1996).

Il est intéressant de noter que d'autres récepteurs de la famille des récepteurs au TNF entraînent l'activation des facteurs Rel/NF- κ B, par exemple le récepteur CD95 (APO-1/Fas) des cellules T (Ponton et al., 1996), le récepteur Apo-3 récemment cloné (Marsters et al., 1996) et le récepteur CD30, qui de façon similaire au TNFR1 utilise TRAF-2 pour activer RelA/p50 (Ansieau et al., 1996).

Parmi les cytokines qui activent Rel/NF- κ B, le cas de l'IL-1 est également à souligner. Elle est très souvent utilisée *in vitro* comme inducteur de l'activité Rel/NF- κ B et cible la dégradation d'I κ B α (Arenzana-Seisdedos et al., 1995; DiDonato et al., 1995), mais aussi d'I κ B β (Thompson et al., 1995; DiDonato et al., 1996). L'IL-1 induit également les kinases 36 et 41 kD (Bennett et al., 1996). Cette voie est intéressante car le récepteur à l'IL-1 ressemble au récepteur membranaire Toll qui est impliqué dans l'activation de Dorsal chez la drosophile, suggérant que les voies de signalisation sont conservées au cours de l'évolution (Wasserman, 1993).

Des agents mitogènes chimiques, comme les esters de phorbol dont le plus utilisé est le PMA, souvent en association avec un ionophore calcique comme l'ionomycine, induisent la dégradation rapide d'I κ B α (Henkel et al., 1992; Brown et al., 1993; Sun et al., 1993; Alkalay et al., 1995; Brown et al., 1995; Lin et al., 1995; Perez et al., 1995; Traenckner et al., 1995) et d'I κ B β (DiDonato et al., 1996), et activent également la maturation de NF- κ B1 (MacKichan et al., 1996).

La stimulation de la molécule d'adhésion CD28 et du corécepteur CD3 a aussi des effets mitogènes qui passent par l'activation de Rel/NF- κ B au travers de la dégradation d'I κ B α (Costello et al., 1993; Costello et al., 1993; Alkalay et al., 1995; Harhaj et al., 1996a) et d'I κ B β (Harhaj et al., 1996a).

Des inhibiteurs de phosphatases comme l'acide okadaïque ou la calyculine A induisent aussi la phosphorylation et la dégradation d'I κ B α (Traenckner et al., 1994; Lin et al., 1995;

Chen et al., 1995; Traenckner et al., 1995). Dans le cas de l'acide okadaïque, c'est le complexe kinasique 700 kD qui pourrait être ciblé (Chen et al., 1996).

Des agents bactériens comme le LPS (Lipopolysaccharide) peuvent également induire la dégradation d'I κ B α et d'I κ B β (Cordle et al., 1993; Rice and Ernst, 1993; Henkel et al., 1993; Thompson et al., 1995; Milligan et al., 1996; Suyang et al., 1996), mais ne semblent pas activer la maturation des précurseurs (Rice and Ernst, 1993). Le LPS induit aussi les kinases 36 et 41 kD (Bennett et al., 1996).

De même, certaines protéines virales induisent la dégradation des inhibiteurs I κ B et nous prendrons deux exemples, en commençant par la protéine Tax du virus leucémogène humain HTLV1 (Human T-Cell Leukemia Virus Type I). Tax induit la phosphorylation d'I κ B α sur les sérines 32 et 36 (Sun et al., 1994; Brockman et al., 1995; Lacoste et al., 1995) et également celle d'I κ B β (Good and Sun, 1996). Le second exemple est celui de la protéine LMP1 (Latent Infection Membrane Protein 1) du virus d'Epstein Barr qui interagit avec les protéines TRAF normalement associées au récepteur TNFR1 et qui active la maturation de NF- κ B1 et NF- κ B2 (Paine et al., 1995; Devergne et al., 1996; Kaye et al., 1996).

Nous citerons seulement l'activation par l'ARN double brin d'I κ B α et NF- κ B1 (Mellits et al., 1993), car comme nous l'avons vu précédemment, une kinase PKR activée par l'ARN double brin pourrait être impliquée dans la régulation Rel/NF- κ B-I κ B (Kumar et al., 1994).

Enfin, le stress oxydatif et les radicaux oxygènes libres ont été largement impliqués dans l'activation des facteurs Rel/NF- κ B (pour revue Schreck and Baenerle, 1994) ainsi qu'une variété de stress physiques comme les rayons ultraviolets (pour revue Siebenlist et al., 1994; Miyamoto and Verma, 1995). Et pour terminer, même la charge protéique du réticulum endoplasmique (Pahl and Baenerle, 1995; Pahl et al., 1996) ou la dépolymérisation des microtubules du cytosquelette (Rosette and Karin, 1995) peuvent entraîner l'activation des facteurs Rel/NF- κ B.

Nous venons d'entrevoir quelques exemples des signaux qui activent la dégradation des inhibiteurs I κ B et il faut en retenir deux points essentiels : 1) des signaux très variés activent les facteurs Rel/NF- κ B, ce qui les implique dans des fonctions physiologiques distinctes; 2)

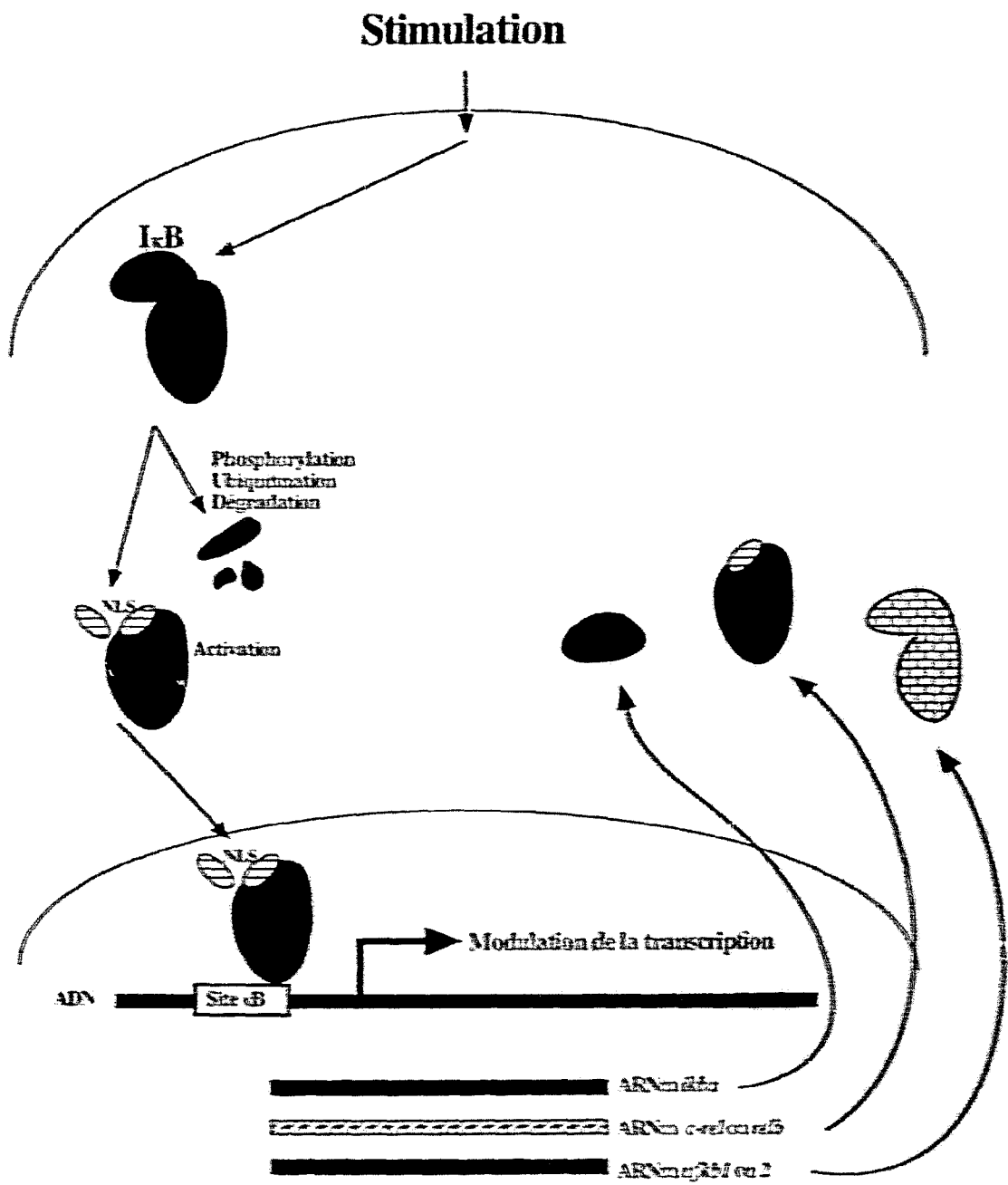


Figure 11 : Boucles de régulation transcriptionnelle

différents inhibiteurs I κ B peuvent être sollicités par ces signaux, ce qui sous-entend d'une part que la vitesse de réponse variera en fonction de la cinétique de dégradation propre à chaque I κ B et d'autre part que différents dimères et donc différents gènes cibles seront activés.

Dans la régulation du tandem Rel/NF- κ B-I κ B, il n'y a pas que les I κ B qui régulent les Rel/NF- κ B, mais aussi les Rel/NF- κ B qui régulent les I κ B et même les Rel/NF- κ B qui s'autorégulent (figure 11).

3.3. Les boucles de régulation transcriptionnelle

Les boucles de régulation transcriptionnelle des différents gènes Rel/NF- κ B et I κ B par les facteurs Rel/NF- κ B passent par des sites κ B présents dans les promoteurs de ces gènes (Ten et al., 1992; Cogswell et al., 1993; De Martin et al., 1993; Grumont et al., 1993; Chiao et al., 1994; Ito et al., 1994; Le Bail et al., 1993).

3.3.1. La boucle de régulation Rel/NF- κ B-I κ B

Comme nous l'avons décrit auparavant, après une stimulation par des inducteurs très différents qui entraînent d'abord sa dégradation, I κ B α est rapidement resynthétisée en réponse à des dimères Rel/NF- κ B activés contenant aussi bien RelA que c-Rel (Beg et al., 1993; Brown et al., 1993; Corille et al., 1993; Henkel et al., 1993; Scott et al., 1993; Miyamoto et al., 1994; Sun et al., 1993; Read et al., 1994; Tzen et al., 1994; Lacoste et al., 1995; Perez et al., 1995; Schatzle et al., 1995). L'induction de la transcription d'I κ B α par RelB est controversée. En effet, RelB/p52 semble réguler I κ B α dans des cellules cos (Dobrzanski et al., 1994) alors que la surexpression de RelB dans des cellules lymphoïdes de souris transgéniques n'influence pas le niveau d'expression d'I κ B α (Weih et al., 1996). La resynthèse rapide d'I κ B α lui permet de jouer son rôle d'inhibiteur de la liaison à l'ADN des facteurs Rel/NF- κ B (Arenzana-Seisdedos et al., 1995) et de les ramener dans le cytoplasme (Arenzana-Seisdedos et al., 1997). Cette boucle est responsable du caractère transitoire de l'activation des facteurs Rel/NF- κ B en réponse à une

stimulation. I κ B ϵ est également resynthétisée suite à l'activation des facteurs Rel/NF- κ B (Whiteside et al., 1997).

Les précurseurs NF- κ B1 et NF- κ B2 sont contrôlés transcriptionnellement par des complexes contenant RelA et c-Rel (Ten et al., 1992; Beg et al., 1993; Cordle et al., 1993; Grumont and Gerondakis, 1994; Liptay et al., 1994; Miyamoto et al., 1994; Sun et al., 1994; Harhaj et al., 1996a). Cependant, cette activation n'est pas responsable de la terminaison de l'activation des facteurs Rel/NF- κ B.

Enfin, il semblerait qu'I κ B β ne soit pas régulée transcriptionnellement par les dimères Rel/NF- κ B (Thompson et al., 1995), bien qu'elle soit quand même rapidement resynthétisée après sa dégradation induite. Sa fonction après la resynthèse étant rappelons-le tout à fait opposée à celle d'I κ B α puisqu'elle permet de prolonger l'activité transcriptionnelle Rel/NF- κ B (Suyang et al., 1996).

3.3.2. L'autorégulation des facteurs Rel/NF- κ B

RelB est régulé transcriptionnellement par RelA/p50 dans les lymphocytes B primaires, en réponse à une stimulation par le CD40 mais pas par le LPS ou par des anticorps dirigés contre les immunoglobulines M (Ryseck et al., 1992; Neumann et al., 1996). La transcription du gène *c-rel* est activée par des complexes Rel/NF- κ B dans différents types cellulaires en réponse à des stimulations variées (Hannink and Temin, 1990; Cordle et al., 1993; Grumont and Gerondakis, 1994; Sun et al., 1994). Dorsal est également capable de réguler sa propre transcription (Lemaire et al., 1995).

Le gène *rela* par contre n'est pas régulé par les dimères Rel/NF- κ B (Ruben et al., 1991; Uebela et al., 1993).

En dehors de la régulation du tandem Rel/NF- κ B-I κ B par la dégradation induite de l'inhibiteur et les boucles de régulation consécutives, il existe d'autres modes d'activation des facteurs Rel/NF- κ B basés sur des mécanismes de régulation indépendants des protéines I κ B et Rel/NF- κ B.

4. Les régulations indépendantes des protéines I κ B et Rel/NF- κ B et les autres modes d'activation des facteurs Rel/NF- κ B qui en découlent

4.1. Autres modes d'activation ciblant les protéines I κ B

4.1.1. Dégradation basale des protéines I κ B

La dégradation basale est responsable de la durée de vie normale des protéines I κ B, c'est-à-dire en absence de stimulation de la cellule. I κ B α est soumise à la dégradation basale même lorsqu'elle est complexée à RelA et c-Rel, le dimère est alors réassocié avec une I κ B α nouvellement synthétisée (Rice and Ernst, 1993). Cependant, l'association à un dimère Rel/NF- κ B stabilise I κ B α et les précurseurs et allonge leur durée de vie en absence de stimulation, ceci nécessitant la présence des motifs ankyrine (Kidd, 1992; Scott et al., 1993; Sun et al., 1993; Hrdlickova et al., 1994; Perez et al., 1995; White et al., 1995; Beauparlant et al., 1996; Harhaj et al., 1996a; Krappmann et al., 1996).

Des processus de phosphorylation sont impliqués dans la dégradation basale des protéines I κ B. En effet, I κ B α est une protéine phosphorylée à l'état basal dont la durée de vie est comprise en moyenne entre 30 minutes et 1 heure pour différents types cellulaires (Davis et al., 1991; Kidd, 1992; Rice and Ernst, 1993; Sun et al., 1993; Hrdlickova et al., 1994). Une phosphorylation constitutive des précurseurs a également été démontrée pour NF- κ B2 (Neumann and Scheidereit, 1994; Betts and Nebel, 1996). La phosphorylation basale d'I κ B α et des précurseurs se fait dans leur partie C-terminale au niveau de la séquence acide de type PEST (Baroga et al., 1995; Whiteside et al., 1995; Lin et al., 1996; McElhinny et al., 1996). Cette phosphorylation cible des résidus sérine et en particulier les S-283, S-289, S-293 et un résidu thréonine T-291 et implique la kinase CKII (Baroga et al., 1995; Lin et al., 1996; McElhinny et al., 1996). L'élimination de la séquence PEST, la mutation du site CKII ou l'élimination de la

CKII des extraits cellulaires *in vitro* conduisent tous à une augmentation de la durée de vie d'I κ B α (Lin et al., 1996; McElhinny et al., 1996; Van Antwerp and Verma, 1996).

Enfin, c'est également le protéasome qui prend en charge la dégradation et la maturation basale des inhibiteurs I κ B, mais dans ce cas suite à la phosphorylation l'ubiquitination n'est pas requise (Palombella et al., 1994; Krappmann et al., 1996).

La modulation de la dégradation ou de la maturation basale des protéines inhibitrices I κ B représente une autre voie d'activation des facteurs Rel/NF- κ B. En effet, une expression constitutive de facteurs Rel/NF- κ B a été décrite dans différentes lignées cellulaires lymphoïdes ou myéloïdes, qu'il s'agisse d'homodimères p50/p50, d'hétérodimères RelB/p50 ou c-Rel/p50 (Lembocher et al., 1995; Frankenberger et al., 1994; Feuillard et al., 1994; Weih et al., 1994; Lewin et al., 1997). Nous prendrons l'exemple des cellules B matures WEHI 231 où le dimère c-Rel/p50 est constamment nucléaire (Rice and Ernst, 1993; Grumont and Gerondakis, 1994; Liou et al., 1994) alors qu'I κ B α est présente et fonctionnelle puisqu'elle interagit avec les dimères Rel/NF- κ B dans le cytoplasme (Liou et al., 1994; Miyamoto et al., 1994). En fait, c'est une augmentation d'environ 35 fois de la dégradation basale d'I κ B α qui est responsable de l'activation constitutive de c-Rel/p50 dans ces cellules (Miyamoto et al., 1994).

Il est également possible d'agir sur la maturation des précurseurs, par exemple la protéase du virus HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus Type-1) est capable de cliver NF- κ B1 en générant une espèce p50 plus courte, en fait une p45, et augmente ainsi la quantité de dimère RelA/p45 fonctionnel dans le noyau (Rivière et al., 1991). La protéine Ad12-13s-E1A de l'adénovirus humain de type 12 semble par contre empêcher la maturation de NF- κ B1 et ainsi diminuer les quantités disponibles de p50 (Schontzen et al., 1995).

Pour réguler les facteurs Rel/NF- κ B nous connaissons déjà deux voies qui passent par les inhibiteurs I κ B : l'induction de la dégradation et de la maturation dans le schéma classique et la modulation de la durée de vie et de la maturation constitutive des protéines I κ B. Il en existent en fait d'autres passées par les protéines I κ B et dont nous allons voir quelques exemples.

4.1.2. Quelques mécanismes de régulation des protéines I κ B ne passant pas par leur dégradation

Un autre mode de régulation d'I κ B α est représenté par l'association physique de la protéine virale Tax avec I κ B α mais aussi avec le précurseur NF- κ B1, ce qui interfère avec la rétention cytoplasmique des facteurs Rel/NF- κ B et par conséquent les active (Watanabe et al., 1993; Petropoulos et al., 1996).

La dexaméthasone, un glucocorticoïde synthétique, induit une augmentation de la transcription du gène *ikba* favorisant ainsi l'inhibition des facteurs Rel/NF- κ B (Scheinman et al., 1995, Anphan et al., 1995). Une augmentation du taux d'ARN messager d'I κ B α , qui favorise l'inhibition des facteurs Rel/NF- κ B a aussi été décrite dans les monocytes, suite à leur adhésion. Cette régulation de la quantité d'ARN messager d'I κ B α ne passerait ni par l'augmentation de la transcription du gène *ikba* ni par la stabilisation des ARN messagers mais par une régulation de la maturation des ARN messagers d'I κ B α dans le noyau des monocytes adhérents (Lofqvist et al., 1995).

La phosphorylation de résidus tyrosine semble également réguler I κ B α . En effet, dans les cellules T Jurkat, le pervanadate, un activateur de la phosphorylation des résidus tyrosine, induit l'activation de RelA en provoquant la phosphorylation d'I κ B α sur la tyrosine 42. Cette phosphorylation induit la dissociation du complexe Rel/NF- κ B-I κ B sans dégradation d'I κ B α et mettrait en jeu la tyrosine kinase p56^{lck}, car dans les cellules ICaM1 où cette kinase n'est pas exprimée le pervanadate n'induit pas l'activation des facteurs Rel/NF- κ B (Imbert et al., 1996). Une autre étude montre aussi qu'en réponse au pervanadate, on détecte une espèce d'I κ B α phosphorylée sur la tyrosine 42 qui est résistante à la dégradation induite par l'acide okadaïque dans un système de reconstitution *in vitro* (Singh et al., 1996).

4.2. Autres modes de régulation ciblant directement les protéines Rel/NF- κ B

4.2.1. La phosphorylation des protéines Rel/NF- κ B

Indépendamment de leurs inhibiteurs, les protéines RelA et c-Rel peuvent subir une phosphorylation en réponse à une stimulation. c-Rel est rapidement phosphorylée sur des résidus tyrosine suite à l'action du G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor) sur des neutrophiles humains. Il s'agit d'une réponse spécifique car le GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor) dans le même système n'entraîne pas cette phosphorylation (Draker et al., 1994). RelA est phosphorylée en réponse au TNF α dans des cellules HeLa alors que c-Rel ne l'est pas (Naumann and Scheidereit, 1994). Dorsal existe à l'état phosphorylé dans l'embryon, et peut être phosphorylé par une kinase activée via le récepteur membranaire Toll (Gillespie and Wasserman, 1994).

Plusieurs kinases ont été impliquées dans ces phénomènes. *In vitro*, la PKA et la PKC phosphorylent RelA, NF- κ B1 et NF- κ B2 mais seule l'efficacité de liaison à l'ADN de RelA est augmentée (Naumann and Scheidereit, 1994). L'isotype ζ de la PKC est responsable de l'activation de RelA/p50 en réponse au TNF α dans des cellules NIH3T3, mais sa cible directe n'est pas identifiée (Diaz-Meco et al., 1993). Par contre, une étude réalisée sur l'activité transcriptionnelle de RelA en présence de génistéine, un inhibiteur de tyrosine-kinase, montre qu'en absence d'activité tyrosine-phosphorylante la translocation de RelA dans le noyau et sa liaison à l'ADN en réponse au LPS ne sont pas modifiées tandis que son activité transcriptionnelle est fortement réduite (Yeza et al., 1996).

L'initiation de RelA peut également passer par des phosphorylations. En effet, lorsque la voie de la PKA est activée par la forskoline dans des cellules T, la liaison à l'ADN de RelA est fortement diminuée. En fait, c'est la migration de RelA dans le noyau des cellules T qui est inhibée par le traitement à la forskoline. (Naumann et al., 1995).

4.2.2. Modulation de la transcription des gènes Rel/NF- κ B

En dehors de la boucle d'autorégulation la transcription des facteurs Rel/NF- κ B peut également être la cible de régulation. Cependant ce domaine a été moins étudié et nous ne disposons que de quelques exemples. A nouveau on peut citer la protéine Tax du virus HTLV1 qui active la transcription des gènes *nfkb2* et *c-rel* dans les cellules T infectées (Li et al., 1993; Lenoix et al., 1994). Les facteurs IE (Immediate-Early) du virus HCMV (Human Cytomegalovirus) transactivent les promoteurs de *nfkb1* et *rela* (Yurochko et al., 1995). La régulation peut également se faire par un blocage de la transcription des facteurs Rel/NF- κ B comme c'est le cas avec le facteur Rep- κ B, représentant un complexe protéique nucléaire qui lie des sites κ B du promoteur du gène *nfkb2* en absence de dimères Rel/NF- κ B classiques et réprime sa transcription (Liptay et al., 1994).

4.2.3. Inhibition des facteurs Rel/NF- κ B par des interactions protéine-protéine

Nous prendrons l'exemple de la régulation des facteurs Rel/NF- κ B par les glucocorticoïdes. La dexaméthasone entraîne une inhibition de la transcription induite par RelA (Scheinman et al., 1995) et ceci est en fait le résultat d'une interaction physique entre RelA/p50 et le récepteur aux glucocorticoïdes qui bloque à la fois la liaison de ce récepteur et celle de RelA/p50 à leurs sites spécifiques sur l'ADN (Ray and Prefontaine, 1994; Scheinman et al., 1995). La répression des facteurs Rel/NF- κ B dans les cellules endothéliales traitées par des glucocorticoïdes ne relevant pas d'une induction d'I κ B α , il est vraisemblable qu'il s'agisse là aussi d'une interaction physique des facteurs Rel/NF- κ B avec le récepteur aux glucocorticoïdes (Brestjan et al., 1996). Des interactions identiques ont été décrites avec le récepteur à la progestérone, dont la liaison à l'ADN est affectée par RelA, et réciproquement, mais pas par celle de c-Rel ou NF- κ B1 (Kalkhoven et al., 1996).

Il existe donc en plus de la voie de régulation classique du tandem Rel/NF- κ B-I κ B, de nombreuses autres voies ciblant soit les I κ B soit les Rel/NF- κ B, et c'est cet ensemble de régulations complexes qui définit le cadre dans lequel les facteurs Rel/NF- κ B vont remplir leurs fonctions de facteur de transcription, chapitre que nous pouvons aborder à présent pour clore cette introduction.

5. Quelques fonctions biologiques des facteurs Rel/NF- κ B

Dans un premier temps nous avons planté le décor en énumérant les domaines protéiques, les caractéristiques fonctionnelles de ces domaines et les régulations des différentes protéines afin de mieux comprendre les relations qui unissent les facteurs de transcription Rel/NF- κ B et leurs inhibiteurs I κ B. Cependant il nous reste à évoquer un dernier niveau de régulation directement lié à l'activité transcriptionnelle des facteurs Rel/NF- κ B avant de découvrir quelques exemples de leurs terrains d'action biologiques. En effet une fois activés, c'est à dire libérés de leurs inhibiteurs et prêts à fonctionner dans le noyau, les facteurs Rel/NF- κ B sont soumis à des interactions avec des cofacteurs nucléaires qui vont moduler leur capacité à réguler la transcription.

5.1. Le pouvoir transactivateur des facteurs Rel/NF- κ B

La fonction intrinsèque des facteurs Rel/NF- κ B est de moduler la transcription et le plus couramment en l'activant. Nous avons vu dans le premier chapitre de cette introduction, que l'on pouvait présenter les facteurs de transcription Rel/NF- κ B en deux classes, selon qu'ils possèdent (RelA, c-Rel ...) ou non (p50 et p52) un domaine transactivateur dans leur partie C-terminale.

Dans le dimère RelA/p50, c'est RelA qui est responsable du pouvoir transactivateur (Schwartz and Beemerle, 1991). Le complexe RelA/c-Rel est un transactivateur encore plus puissant que RelA/p50 (Hansen et al., 1994). Pour activer la transcription, RelA, c-Rel et v-Rel interagissent directement avec des protéines de la machinerie transcriptionnelle de base comme

TBP (TATA-Binding Protein) et TFIIB (Ker et al., 1993; Xu et al., 1993). Cependant cette capacité transcriptionnelle est modulée par des interactions avec d'autres protéines dont voici quelques exemples.

Sur le promoteur de l'IL-8, l'interaction de C/EBP β avec différents facteurs Rel/NF- κ B augmente de manière réciproque la liaison à l'ADN de ces facteurs sur leurs sites respectifs (Stein and Baldwin Jr., 1993). A l'inverse sur le promoteur de l'IL-6, la transcription à partir des sites pour le récepteur aux oestrogènes est réprimé par des interactions de RelA avec C/EBP β et ce récepteur aux oestrogènes (Stein and Yang, 1995).

Les facteurs de transcription c-Fos et c-Jun interagissent également avec RelA entraînant une augmentation de la transcription aux sites κ B et AP-1 (Stein et al., 1993). De même, c-Fos et c-Jun interagissent avec c-Rel et v-Rel en augmentant la transcription du gène *ikba* dans des fibroblastes embryonnaires de poulet (Schatzle et al., 1995; Kralova et al., 1996).

Dans le même esprit, RelA/p50 interagit avec IRF-1 (Interferon regulatory factor 1) pour induire l'expression d'un gène du MHC (Major Histocompatibility Complex) de classe I (Drew et al., 1995) et l'interaction de RelA avec IRF-1 et la protéine HMGI(Y) [High-Mobility-group I (Y)] active le promoteur de VCAM1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1) (Neish et al., 1995). L'interaction avec HMGI(Y) est également requise pour l'activation des gènes GM-CSF et IL-2 par c-Rel en réponse à une stimulation de la molécule d'adhésion CD28 de la cellule T (Himes et al., 1996). Par contre, l'interaction d'une autre protéine HMGI, la protéine de drosophile DSP1 (Dorsal Switch Protein 1), avec Dorsal ou p50 en hétérodimère avec RelA, c-Rel ou RelB les transforme en répresseur de la transcription des promoteurs du gène *zen* de drosophile et du gène humain de l'IFN β via les sites NRE (Lehming et al., 1994).

Enfin, des protéines virales peuvent moduler les fonctions transactivatrices des facteurs Rel/NF- κ B. Par exemple, Tax interagit avec RelA ou c-Rel dans un complexe qui lie les sites κ B et augmente le pouvoir transactivateur de ces facteurs (Suzuki et al., 1994).

Les sous-unités p50 et p52 des précurseurs NF- κ B1 et NF- κ B2 ne possèdent pas de domaine transactivateur et c'est pour cela qu'en homodimères elles répriment généralement la transcription en occupant les sites κ B. Par exemple, la liaison du site κ B du promoteur de *c-myc*

par des dimères p50/p50 diminue fortement son activité (Lee et al., 1995). Les dimères p50/p50 inhibent l'expression des gènes du MHC de classe I dans des cellules tumorales métastatiques alors que RelA/p50 l'active (Plaksin et al., 1993). Dans les cellules T, l'alternance de dimères p50/p50 et RelA/p50 régule l'expression du récepteur à l'IL-2: dans la cellule au repos, la liaison du dimère p50/p50 sur le promoteur de la chaîne α de l'IL-2R empêche la fixation du facteur SRF (Serum Responsive Factor) à son site SRE (Serum Responding Element) proche du site κ B; suite à une stimulation, p50/p50 est remplacé par un dimère RelA/p50 et SRF peut, en présence de ce dernier, lier son site SRE. La transcription de l'IL-2R α est alors activée à partir des deux sites SRE et κ B (Algaré et al., 1995). La coopération de c-Rel et RelA avec SRF pour l'activation du promoteur de l'IL-2R α est également décrite *in vitro* dans des cellules cos où ces facteurs activent la transcription à partir des sites κ B et SRE d'un vecteur d'expression (Pierce et al., 1995). Une autre étude montre que l'activation de la transcription sur d'un vecteur d'expression contenant les sites κ B et SRE du promoteur de l'IL-2R α implique bien la liaison du SRF au site SRE en interaction avec RelA ou c-Rel. Cependant, dans ce contexte l'activation transcriptionnelle est indépendante du site κ B et passe uniquement par le SRE, RelA et c-Rel n'ayant qu'un rôle de cofacteur du SRF (Franzoso et al., 1996). Les dimères p52/p52 répriment également la transcription à partir de sites κ B (Chang et al., 1994).

Cependant, le fait de ne pas posséder de domaine transactivateur n'implique pas que les homodimères p50 et p52 ne puissent jamais activer la transcription. En effet, nous en avons déjà vu un exemple avec Bcl-3 qui active la transcription à des sites κ B en interaction avec les dimères p50/p50 ou p52/p52 (voir introduction 2.2.5.). Un autre exemple est celui de la fonction des homodimères p50 et p52 dans la région initiatrice du virus HIV-1. Ceux-ci fonctionnent comme des activateurs de la transcription des gènes viraux en favorisant la liaison au site d'initiation de la protéine TFII-I, qui va recruter la machinerie transcriptionnelle de base (Montano et al., 1996).

Un dernier exemple intéressant est celui des interactions entre les homodimères p50 et p52, le facteur RelA et la protéine YB-1 du virus neurotrope du polyome humain JC (Human neurotropic polyomavirus JC). La transcription par YB-1 à partir du domaine D du promoteur de ce virus est réprimé par RelA mais par contre favorisée par les homodimères p50 et p52 parce

qu'ils lèvent l'inhibition de RelA. D'un autre côté, la transcription à partir de site κ B par RelA est plutôt favorisée par l'interaction avec YB-1, ce qui suggère qu'en fonction du site de liaison le même couple de protéine RelA-YB-1 peut être activateur ou represser (Raj et al., 1996).

Il est clair à présent que le pouvoir transactivateur des facteurs de transcription Rel/NF- κ B ne dépend pas seulement de leur propre domaine transactivateur mais qu'il est modulé par des interactions avec différents cofacteurs en fonction du promoteur ciblé, ce qui pourrait expliquer des réponses différentes en fonction des types cellulaires ou des stimulations mettant en jeu ces cofacteurs.

Pour tenter de rassembler ce que nous avons évoqué dans les chapitres précédents et dans ce dernier chapitre, nous pouvons rappeler comme facteurs qui modulent la fonction transactivatrice des facteurs Rel/NF- κ B: les variations dans le site κ B (séquence consensus), la composition du dimère Rel/NF- κ B, le contexte du promoteur dans lequel se trouve le site κ B, les cofacteurs.

5.2. Les mécanismes biologiques utilisant les facteurs Rel/NF- κ B

Différentes fonctions biologiques sont attribuées aux facteurs Rel/NF- κ B en fonction de leurs territoires d'expression *in vivo* et de leurs gènes cibles. L'expression des facteurs de transcription Rel/NF- κ B et une étude détaillée des gènes cibles et de leur régulation est présentée dans les revues suivantes : (Baenkle and Henkel, 1994; Siebenlist et al., 1994; Kopp and Ghosh, 1995; Baenkle and Baltimore, 1996). En résumé, les facteurs Rel/NF- κ B sont essentiellement exprimés dans les organes hématopoïétiques et sont très largement impliqués dans la réponse immunitaire car ils régulent de nombreuses cytokines (TNF α , IFN β , GM-CSF, G-CSF), des interleukines (IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-8) et des protéines de la phase aiguë de la réponse immunitaire (composants du complément C3 et B). A noter que Dorsal, essentielle à l'établissement de la polarité dorso-ventrale de la larve de drosophile, présente avec Dif et Relish, les deux autres protéines Rel/NF- κ B de drosophile des fonctions dans l'immunité de la drosophile. De même, Gambif1 est impliquée dans l'immunité de l'anophèle. Les facteurs



Gène déficient	Phénotype majeur
<i>rela</i> (protéine RelA)	Létalité embryonnaire, apoptose des hépatocytes.
<i>c-rel</i> (protéine c-Rel)	Défauts de prolifération des cellules B et T matures.
<i>relb</i> (protéine RelB)	Réaction inflammatoire généralisée, dégénérescence des cellules dendritiques du thymus.
<i>nfkb1</i> (protéines p105, p50 et IκBγ)	Fonctions des cellules B altérées.
<i>nfkb2</i> (protéines p100 et p52)	Architecture des ganglions lymphatiques altérée.
<i>nfkb1/nfkb2</i>	Phénotype plus sévère que pour les déficiences simples.
<i>nfkb1/relb</i>	Phénotype plus sévère que pour les déficiences simples.
<i>relb/RAG-1</i>	Abolition de l'inflammation généralisée.
<i>relb/Nur77/N10TG</i>	Abolition de l'inflammation généralisée.
<i>ikba</i> (protéine IκBα)	Létalité, thymus, foie et rate atrophiés, granulopoïèse excessive, défauts de la peau.
<i>bcl3</i> (protéine Bcl-3)	Architecture des ganglions lymphatiques altérée.
Partie C-terminale de <i>nfkb1</i> (protéine IκBγ), équivalent à une surexpression de p50	Létalité, hyperplasie gastrique.
Partie C-terminale de <i>nfkb2</i> , équivalent à une surexpression de p52	Phénotype moins sévère que pour la surexpression p50.
Transgénèse	
<i>v-rel</i> (surexpression de la protéine v-Rel dans le thymus)	Létalité, lymphomes T
<i>bcl3</i> (surexpression de la protéine Bcl-3 dans le thymus)	Pas de phénotype.
<i>ikba</i> (surexpression de la protéine IκBα dans le thymus)	Défaut de l'activation thymocytaire, perte de cellules CD5 ⁺
LoxZ en aval du promoteur <i>c-rel</i> , équivalent à l'étude des sites d'expression de <i>c-rel</i>	Expression dans les bourgeons de membres au cours du développement.

Figure 12 : Phénotype majeur des souris déficientes pour ou surexprimant les gènes Rel/NF-κB et IκB

Rel/NF- κ B sont également impliqués dans des phénomènes d'adhésion cellulaire en régulant des protéines comme VCAM1, ELAM1 (E-sélectin) et ICAM1 (Intercellular cell adhesion molecule 1).

Le chapitre suivant est consacré aux fonctions révélées par les expériences de transgénèse et de recombinaison homologue (figure 12), puis nous évoquerons l'implication des différents facteurs Rel/NF- κ B dans l'oncogénèse, car la protéine c-Rel est le produit d'un proto-oncogène, et dans l'apoptose que nous avons étudiée en relation avec la protéine c-Rel aviaire.

5.2.1. Les résultats des expériences de transgénèse et recombinaison homologue.

5.2.1.1. RelA

Les souris déficientes pour RelA présentent un phénotype létal, qui survient entre le 15^{ème} et le 16^{ème} jour de développement embryonnaire (Beg et al., 1995). Au 14^{ème} jour de développement, les embryons sont apparemment sains et tout à fait comparables à des embryons témoins de même stade, ce qui suggère que RelA ne remplit aucune fonction vitale pour le développement précoce de l'embryon de souris. Le phénotype létal est le résultat d'une dégénérescence complète du foie par apoptose des hépatocytes. Par contre, les précurseurs hématopoïétiques du foie ne sont pas touchés et l'érythropoïèse se déroule normalement. Ce résultat suggère une fonction de protection vis à vis de l'apoptose pour le facteur RelA, dans les hépatocytes spécifiquement, car le taux d'apoptose dans le système nerveux de ces embryons est comparable à celui des embryons témoins.

Une stimulation par le TNF α de fibroblastes RelA $^{-/-}$, prélevés au 13^{ème} jour de développement sur des embryons déficients pour RelA, n'induit pas d'augmentation des ARN messagers d'I κ B α et du GM-CSF, ce qui suggère une fonction essentielle de RelA dans l'induction de ces gènes suite à une stimulation. Dans ces fibroblastes déficients pour RelA, la protéine I κ B β n'est plus détectée alors que ses ARN messagers sont normalement produits, reflétant sans doute l'absence de stabilisation de la protéine inhibitrice par RelA (Beg et al.,

1995). Les fibroblastes RelA^{-/-} présentent aussi une sensibilité accrue à l'apoptose induite par le TNF α , ce qui étend le rôle protecteur de RelA vis à vis de l'apoptose à ces cellules (Beg et al., 1996).

Des lignées de souris transgéniques exprimant *rela* sous le contrôle du promoteur proximal Ick ont été établies (Perez et al., 1995). Ces souris surexpriment RelA dans le thymus à tous les stades de développement des thymocytes. Cette surexpression ne modifie pas le développement des thymocytes, ce qui montre que RelA ne présente pas de fonction importante dans la maturation des cellules T, comme le suggérait son expression dans le thymus au cours du développement embryonnaire (Weih et al., 1994). Cependant, l'interprétation de ces résultats est à moduler car la protéine RelA surexprimée reste séquestrée dans le cytoplasme des thymocytes. En effet, les quantités de protéines I κ B α sont augmentées par stabilisation *via* la liaison à RelA, ce qui neutralise l'excès de protéine RelA (Perez et al., 1995).

5.2.1.2. c-Rel

Les souris déficientes pour c-Rel sont viables et se développent normalement (Königen et al., 1995). Le système hématopoïétique se développe également normalement, les cellules B de la rate et les thymocytes présentent respectivement une expression normale des chaînes κ des immunoglobulines et de la chaîne α du récepteur à l'IL-2, dont les promoteurs sont pourtant présentés comme des cibles de c-Rel *in vitro*. Le défaut majeur des cellules B c-Rel^{-/-} est de ne pas proliférer en réponse à une stimulation par le LPS et les immunoglobulines M de surface et via le CD40. Les cellules T c-Rel^{-/-} présentent également un défaut de prolifération en réponse à la costimulation du CD28 et du TCR (T Cell Receptor). Cette déficience est en relation avec l'absence de production d'IL-7 et peut être compensée par l'addition d'IL-2 exogène. A noter que dans les cellules T c-Rel^{-/-}, c-Rel est seulement nécessaire à la stimulation via l'élément de réponse au CD28, car ces cellules produisent normalement l'IL-2 en réponse au PMA et à l'ionomycine. c-Rel se révèle également nécessaire à la production des immunoglobulines G1 et G2a dans le cadre de la réponse humorale dépendante des cellules T (Königen et al., 1995).

Différentes lignées de cellules *c-Rel*^{-/-} ont été dérivées des souris déficientes pour le gène *c-rel*. L'étude détaillée de ces cellules par des équipes différentes est présentée ci-après.

Les cellules T *c-Rel*^{-/-} présentent une production réduite d'IL-3, IL-5, de GM-CSF, d'IFN γ et de TNF α en réponse au PMA. Par contre, la stimulation du CD3 et du CD28 n'entraîne aucune production de cytokine. L'apport d'IL-2 exogène ne restaure pas la production induite d'IL-3 et du GM-CSF suggérant que *c-Rel* est impliquée dans des voies de signalisation différentes pour stimuler la production des diverses cytokines (Köntgen et al., 1995).

La stimulation de macrophages péritonéaux *c-Rel*^{-/-} par le LPS entraîne une surproduction de GM-CSF (Gerondakis et al., 1996). *c-Rel* aurait donc des fonctions d'activateur du GM-CSF dans les cellules T et de répresseur de ce gène dans les macrophages.

Au niveau péritonéal, il faut distinguer les macrophages selon qu'ils sont migrants à partir des tissus suite à une stimulation où qu'ils sont résidents du liquide péritonéal : les macrophages *c-Rel*^{-/-} résidents produisent plus de GM-CSF mais aussi de G-CSF et d'IL-6 et exhibent une cytotoxicité moindre liée à une réduction de la production de NO imputable à une dérégulation de la NO-synthétase; par contre, les macrophages migrant dans liquide péritonéal ne présentent pas ces défauts (Grigoriadis et al., 1996). Ces résultats impliquent *c-Rel* dans des régulations positives et négatives de gènes différents dépendant du contexte cellulaire.

5.2.1.3. RelB

Les souris déficientes pour RelB sont viables mais présentent de sévères défauts dans les fonctions immunitaires (Weih et al., 1995). Ces animaux présentent une augmentation de la myélopoïèse au niveau de la moelle osseuse, avec comme conséquence une réduction de l'érythropoïèse dans cet organe. L'érythropoïèse se trouve alors augmentée au niveau du foie et de la pulpe rouge de la rate. La survie des cellules dendritiques du thymus nécessite la présence de RelB mais pas leur développement embryonnaire. Enfin, le développement des cellules B et T n'est pas modifié mais on détecte des réactions inflammatoires impliquant ces cellules dans divers organes lymphoïdes et aussi au niveau d'organes non-hématopoïétiques comme le foie,

les poumons, les muscles squelettiques *etc.* Ces réactions sont accompagnées d'une augmentation de la production de TNF α , d'IFN γ , d'IL-1 et d'IL-2, cytokines connues pour induire la réaction inflammatoire (Weih et al., 1995).

Des lignées de souris transgéniques surexprimant RelB dans le thymus sous le contrôle du promoteur proximal *lck* ont été établies (Weih et al., 1996). Ces souris ne développent aucun phénotype particulier dans le thymus et l'expression de gènes cibles des facteurs Rel/NF- κ B (MHC, IL-2R α , *ikba*) n'est pas modifiée bien que les complexes RelB liés à l'ADN soient en excès. En effet, contrairement à RelA, les protéines RelB ne sont pas retenues dans le cytoplasme par un excès de protéine I κ B α stabilisée. (Weih et al., 1996).

5.2.1.4. NF- κ B 1

Les souris déficientes pour le gène *nfkb1* sont viables mais présentent un défaut dans la réponse immunitaire impliquant les cellules B (Sha et al., 1995). Ces cellules ne prolifèrent pas en réponse au LPS et produisent beaucoup moins d'immunoglobulines et particulièrement des immunoglobulines E, suggérant un rôle de p50 dans le changement d'expression des chaînes lourdes des immunoglobulines. Les souris *p50^{-/-}* présentent également un défaut d'élimination de certains organismes pathogènes comme *Listeria monocytogenes* et *Streptococcus pneumoniae* mais sont plus résistantes à l'infection par le virus EMC (Encephalomyocarditis), et ceci en rapport avec une augmentation de l'expression de l'IFN β impliqué dans la résistance virale (Sha et al., 1995).

5.2.1.5. v-Rel

Des lignées de souris transgéniques surexprimant v-Rel sous le contrôle du promoteur proximal *lck* ont été établies afin d'étudier le pouvoir oncogénique de v-Rel dans les cellules T de mammifères (Carrasco et al., 1996). Ces souris meurent en développant des leucémies et des lymphomes à cellules T plutôt immatures, indiquant que v-Rel transforme des stades immatures de thymocytes. v-Rel est constamment nucléaire dans ces cellules et induit la surexpression

de l'IL-6, du TNF α , de ICAM1 et de la molécule d'adhésion DM-GRASP, alors que contrairement à son effet dans les cellules aviaires (Hrdlickova et al., 1994; Nehyba, 1994) il diminue l'expression du MHC de classe I. Comme la surexpression de RelA, celle de v-Rel stabilise la protéine I κ B α mais n'induit pas sa transcription. Par contre, la transcription de NF- κ B1 est induite par v-Rel et explique l'augmentation de p50 dans le noyau. Cependant, l'expression de v-Rel induit le même phénotype dans une lignée de souris déficiente pour p50, indiquant que l'activation constitutive de p50 n'est pas requise pour l'effet transformant de v-Rel. L'expression dans le même contexte d'une protéine c-Rel tronquée ne produit pas le même phénotype, indiquant que l'absence du domaine transactivateur chez v-Rel n'explique pas entièrement son pouvoir oncogénique (Carrasco et al., 1996).

5.2.1.6. I κ B α

Des lignées de souris déficientes pour la protéine inhibitrice I κ B α ont été établies (Beg et al., 1995). Ces souris présentent un phénotype létal qui survient en général chez les nouveau-nés de 8 jours, alors que les souris semblent normales à la naissance. Elles sont de petite taille et présentent un thymus, un foie et une rate atrophiés, par contre la granulopoïèse est augmentée dans la moelle osseuse probablement en rapport avec la surexpression du G-CSF et la peau est squameuse et présente des infiltrations de granulocytes et une membrane basale mal définie. Les molécules MIP-2 (Macrophage inflammatory protein 2) et VCAM1 sont également surexprimées. En absence d'I κ B α , on observe une activation constitutive de RelA/p50 et p50/p50 dans les thymocytes, ce qui explique la surexpression de certains de leurs gènes cibles. Par contre, les fibroblastes I κ B α ^{-/-} ne présentent qu'une faible activité constitutive des facteurs Rel/NF- κ B, car dans ces cellules ils sont retenus par I κ B β . Cependant après la stimulation par le TNF α , les facteurs Rel/NF- κ B restent dans le noyau très longtemps car la fonction de terminaison de la liaison à l'ADN spécifique à I κ B α n'est pas compensée par I κ B β . Ces résultats suggèrent que si l'inhibiteur majeur dans les cellules lymphoïdes est I κ B α , celui des fibroblastes est I κ B β . La double déficience pour I κ B α et p50, obtenue par le croisement des souris p50^{-/-} et I κ B α ^{-/-}, entraîne un retard dans la survenue du phénotype I κ B α ^{-/-} et

s'accompagne d'une diminution de l'activité constitutive Rel/NF- κ B dans les thymocytes, essentiellement constituée de RelB/p52 en absence de p50 (Beg et al., 1997).

5.2.1.7. Bcl-3

Des lignées de souris transgéniques surexprimant Bcl-3 sous le contrôle du promoteur proximal I κ k dans les thymocytes ont également été établies (Caamano et al., 1996). L'expression constitutive de Bcl-3 dans le noyau des thymocytes entraîne une forte augmentation de la liaison à l'ADN des homodimères p50 mais ne modifie presque pas celle des homodimères p52. Ces souris ne présentent pas de phénotype particulier : le développement des cellules T est normal et l'activation classique des complexes RelA/p50 par le PMA ou la PHA dans les thymocytes n'est pas modifiée (Caamano et al., 1996).

5.2.1.8. Résultats d'expériences non publiés

L'élimination de NF- κ B2, de Bcl-3, de la partie ankyrine de NF- κ B1 et NF- κ B2 (équivalent d'une surexpression de p50 et p52) par recombinaison homologue, ainsi que la transgénèse avec le gène LacZ en aval du promoteur de c-Rel et le gène *ikba* en aval du promoteur proximal I κ k ont été brièvement décrites au cours d'un congrès (cf. introduction 2.1.) et rapportées dans une revue (Bauerle and Baltimore 1996). En résumé et en attendant la publication détaillée de ces résultats, les souris NF- κ B2^{-/-} et Bcl-3^{-/-} présentent des défauts dans l'architecture des ganglions lymphatiques. La surexpression de p50 est létale et induit essentiellement une hyperplasie gastrique. La surexpression de p52 donne un phénotype similaire à celle de p50 en moins sévère. Le promoteur c-Rel est fortement activé au cours du développement de la souris dans le bourgeon de membre. La surexpression d'I κ B α dans le thymus induit une diminution du nombre de cellule T CD8⁺ et un défaut d'activation thymocytaire. Les souris doublement déficientes NF- κ B1/NF- κ B2 et RelB/NF- κ B1 ont des phénotypes plus sévères que les simples déficientes. Le croisement des souris RelB^{-/-} avec des

souris déficientes pour la lignée des cellules T (RAG-1 et *Nur77/N10TG*) abolit le phénotype d'inflammation généralisée, impliquant directement les cellules T dans ce phénotype.

L'ensemble de ces résultats illustre l'importance des facteurs Rel/NF- κ B dans le système immunitaire et nous allons voir que leur dérégulation entraîne souvent des phénomènes de cancérisation des cellules immunitaires.

5.2.2. Les facteurs Rel/NF- κ B et l'oncogénèse

Nous ne traiterons pas ici du pouvoir oncogénique de *v-Rel* qui est abordé dans l'article de revue présenté dans la seconde partie de ce mémoire et complété de données plus récentes.

Différents facteurs Rel/NF- κ B et I κ B ont été affectés par des translocations ou des réarrangements géniques impliqués dans la survenue de cancers. Le gène *nfkb2* a été identifié dans des cellules d'un cancer de type non-Hodgkin où une translocation chromosomique (t(10,14)(q24,q32)) fusionne la région constante du gène de l'immunoglobuline α 1 à NF- κ B1 ce qui élimine le domaine ankyrine de celle-ci (Neri et al., 1991). La protéine de fusion ainsi obtenue est constamment nucléaire (Chang et al., 1995). Des altérations de *nfkb2* ont été détectées dans d'autres types de lymphomes, des myélomes et des cancers pulmonaires (Frachiotto et al., 1993; Neri et al., 1991; Dejardin et al., 1995).

Bcl-3 a également été identifié dans une translocation chromosomique chez des patients atteints de leucémie lymphoïde chronique à cellules B (Ohtsuo et al., 1990). Son expression normale a été décrite dans les cellules B matures ce qui pourrait être en rapport avec son implication dans des cancers de ces cellules (Bhatia et al., 1991).

Des réarrangements du gène *c-rel* ont également été démontrés dans différents cancers (Brownell, 1988; Lu et al., 1991; Howldsworth et al., 1996; Joos et al., 1996). Parfois, le réarrangement d'autres gènes comme *bcl-2* ou *c-myc* accompagne celui de *c-rel* (Howldsworth et al., 1996). Dans un cas, *c-rel* a été trouvé en fusion avec un gène *nrj* (non-rel gene), dont la fonction n'est pas connue, et la protéine c-Rel-Nrj produite lie l'ADN mais n'a pas de domaine

transactivateur (Lu et al., 1991). La surexpression du gène *c-rel* aviaire entraîne la transformation de fibroblastes embryonnaires (Kralova et al., 1994; Abbadie et al., 1993)

Le gène *rela* est amplifié dans certains lymphomes humains à cellules B (Houldsworth et al., 1996). Un variant naturel de RelA issu d'un épissage alternatif est capable de transformer des cellules Rat-1 (Ruben et al., 1992; Narayanan et al., 1992). RelA est nécessaire au développement de tumeurs induites par la protéine Tax de HTLV-1, puisque ces tumeurs transplantées chez les souris nues régressent en présence d'ARN RelA antisens (Kitajima et al., 1992). Il semble que ce soit l'expression nucléaire constitutive de RelA_{p50} qui permette la transformation des fibroblastes de rat par Tax (Yamaoka et al., 1996). Enfin l'inhibition d'I κ B α par des ARN antisens entraîne la transformation des cellules NIH3T3 qui présentent alors une protéine RelA constitutivement nucléaire et dont l'activité transcriptionnelle est augmentée (Beauparlant et al., 1994).

En dehors de la survenue de cancer, d'autres pathologies qui nous ne développerons pas sont associées à des activations anormales des facteurs Rel/NF- κ B. L'activité transcriptionnelle de ces facteurs est en effet détournée, activée ou inhibée par un certain nombre de virus afin d'induire la transcription de leurs propres gènes, ou d'échapper à la réponse immunitaire (en inhibant la production de cytokines et d'interférons).

5.2.3. Les facteurs Rel/NF- κ B et l'apoptose

Les premières indications d'une fonction d'un facteur Rel/NF- κ B dans l'apoptose ont été fournies par l'observation d'une surexpression du gène *c-rel* aviaire *in vivo* dans des cellules apoptotiques au cours du développement précoce de l'embryon de poulet (Abbadie et al., 1993). Des études plus récentes mettent en évidence des fonctions de protecteur en général mais parfois d'inducteur de l'apoptose pour différents facteurs Rel/NF- κ B et ceci en fonction du contexte cellulaire ou de l'espèce.

Le traitement des cellules B WEHI 231 par des anticorps dirigés contre c-Rel ou avec une protéine de fusion GST-I κ B α induit l'apoptose, tandis que l'expression ectopique de la protéine c-Rel murine dans les mêmes cellules abolit l'apoptose induite par le TPCK (N-acetyl-L-

phénylalanine chlorométhyl ketone) ou par les anticorps anti-IgM dans ces cellules (Wu et al., 1996). De la même façon, le TGF β 1 induit l'apoptose de cellules B par une augmentation de la transcription d'*ikba* qui provoque la rétention dans le cytoplasme de RelA et c-Rel. La costimulation de ces cellules avec le TGF β 1 et le ligand du CD40 bloque l'apoptose et l'augmentation d'I κ B α ce qui maintient à leur niveau normal les quantités nucléaires de RelA et c-Rel mais aussi de c-Myc. L'effet protecteur vis-à-vis de l'apoptose et le maintien des niveaux de c-Myc sont également obtenus avec l'expression ectopique de c-Rel. Enfin, l'expression ectopique de c-Myc protège ces cellules de l'apoptose induite par le TGF β 1. Ces résultats indiquent que la protéine c-Rel murine protège les cellules B de l'apoptose induite par le TGF β 1 et que cette action est liée à sa capacité d'induire l'expression de c-Myc dans ces cellules (Aizawa et al., 1996). Dans le même esprit, le TNF α induit l'apoptose des cellules HeLa et la surexpression de la protéine humaine c-Rel bloque cette apoptose induite (Liu et al., 1996).

Par contre, la surexpression de la protéine aviaire c-Rel à l'aide de vecteurs rétroviraux induit l'apoptose des cellules de moelle osseuse (Abbadie et al., 1993).

L'ensemble de ces résultats suggère un rôle protecteur des protéines c-Rel vis à vis de l'apoptose à l'exception de la protéine c-Rel aviaire dont la surexpression induit l'apoptose.

v-Rel protège les cellules lymphoïdes qu'il transforme de l'apoptose induite *in vitro* et *in vivo* (Neiman et al., 1991). Un mutant v-Rel sensible à la température a le même effet protecteur sur les cellules de rate qu'il transforme, car le passage à la température non-permissive induit l'apoptose de ces cellules et la dégradation d'I κ B α . Cette dégradation d'I κ B α n'est pas classique et passe par un intermédiaire de dégradation à qui il manque les 4 premiers acides aminés N-terminaux (White et al., 1995). La surexpression de Bcl-2 dans ces cellules bloque l'apoptose induite par le changement de température. Par contre l'expression de la protéine CcmA du virus cow-pox, un inhibiteur de la protéase ICE impliquée dans l'apoptose, n'inhibe pas l'apoptose induite par le changement de température, mais empêche la formation de l'intermédiaire de dégradation d'I κ B α (White and Gilmore, 1996).

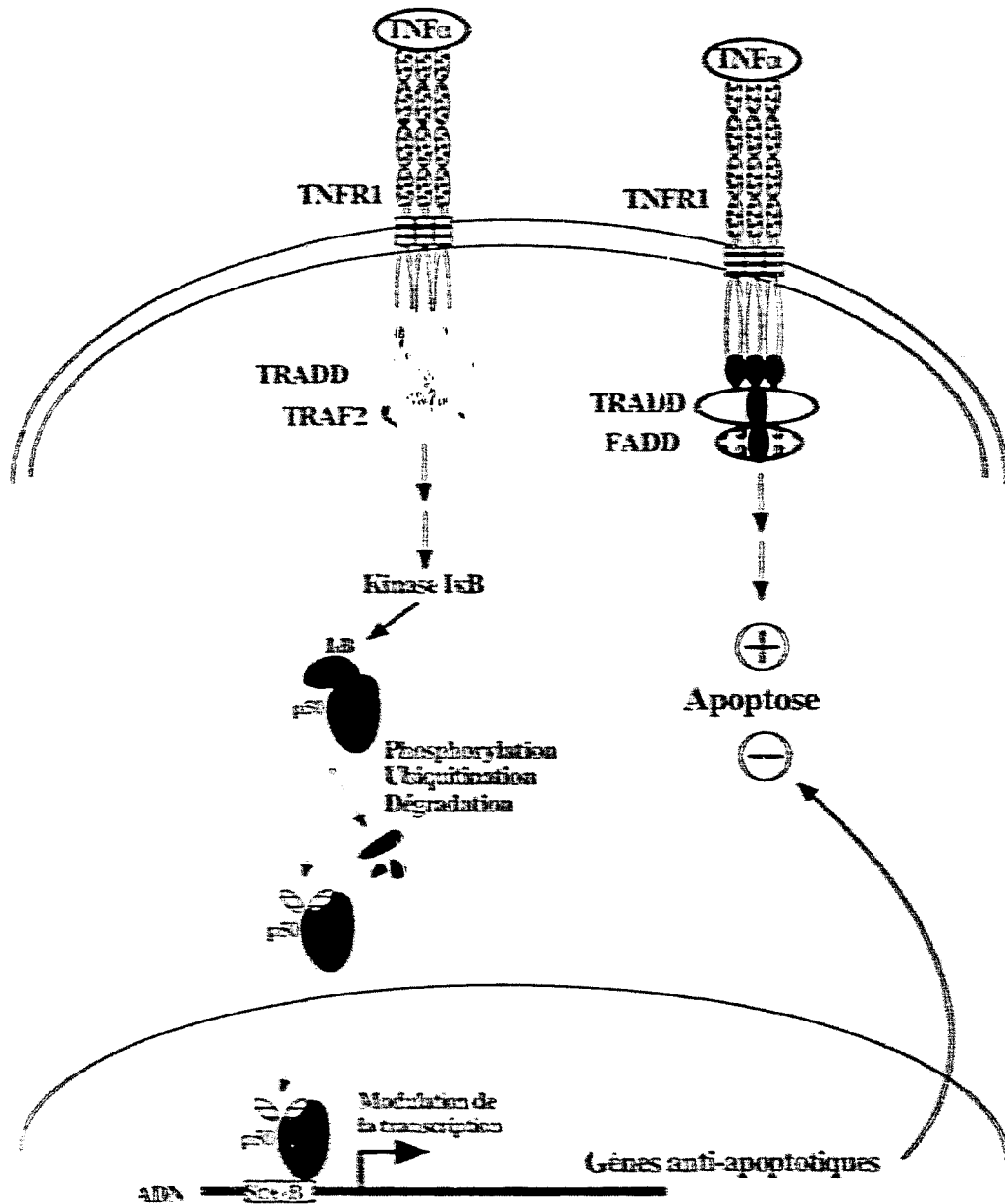


Figure 13 : Activation des facteurs Rel/NF- κ B et de l'apoptose par le TNF α , rôle anti-apoptotique de RelA

De nombreuses études mettent en évidence le rôle anti-apoptotique de RelA notamment en réponse au TNF α (figure 13). Les expériences de recombinaison homologe démontrent un rôle protecteur de RelA vis à vis de l'apoptose dans les hépatocytes, mais aussi dans les fibroblastes embryonnaires. En effet, le traitement des fibroblastes RelA $^{-/-}$ par le TNF α se traduit par une apoptose accrue en comparaison des fibroblastes témoins traités de la même manière (cf. introduction 5.2.1.1.). L'activation de RelA par le TNF α protège les cellules de fibrosarcome humain HT1080 de l'apoptose induite par des radiations ionisantes ou la daunorubicine (utilisée en chimiothérapie) (Wang et al., 1996). Enfin, l'expression d'un dominant négatif d'I κ B α résistant à la dégradation rend les cellules plus sensibles à l'apoptose induite par le TNF α (Van Antwerp et al., 1996). En fait des études récentes ont montré que le TNF α induit l'apoptose et l'activation des facteurs Rel/NF- κ B par des voies différentes (Hsu et al., 1996). L'apoptose passe par le recrutement des protéines TRAF2-FADD (Lin et al., 1996) et l'induction de Rel/NF- κ B par celui de TRAF2-TRADD (Hsu et al., 1995).

Certains résultats suggèrent cependant une fonction de RelA dans l'induction de l'apoptose. L'expression d'un dominant négatif de RelA protège les cellules de rein 293 de l'apoptose induite par la privation de sérum. Dans ce contexte, la surexpression de Bcl-2 a le même effet protecteur qui semble passer par une diminution de l'activité transcriptionnelle de RelA (Grimm et al., 1996). L'apoptose induite par le virus Sindbis dans des cellules de carcinome de la prostate AT-3 est inhibée par Bcl-2 et par un excès d'oligonucléotides contenant des sites κ B qui titrent les complexes RelA/p50 (Lin et al., 1995).

Enfin, une étude utilisant un mutant I κ B α résistant à la dégradation montre que l'inhibition de RelA n'a aucun effet sur l'induction de l'apoptose par le TNF α dans les cellules de carcinome mammaire humain MCF-7 (Cai et al., 1997).

La dexaméthasone induit l'apoptose des cellules T 2B4. Lorsque Bcl-2 est introduit dans ces cellules, elle résistent à l'apoptose induite en diminuant les dimères RelA/p50 et en augmentant les dimères p50/p50, suggérant un rôle à nouveau protecteur vis à vis de l'apoptose des homodimères p50 (Ivanov et al., 1995).

Ces études permettent d'attribuer aux différents facteurs de transcription Rel/NF- κ B une fonction dans l'apoptose avec, comme pour leurs autres fonctions, des rôles d'inhibiteur ou d'activateur dépendant du facteur impliqué, du contexte cellulaire et des cofacteurs présents.

Nous refermons ici l'introduction consacrée à la découverte des facteurs Rel/NF- κ B/I κ B et de leurs nombreuses facettes, pour entrer dans le chapitre des résultats et de la discussion du travail effectué sur la comparaison des séquences protéiques de ces facteurs et l'expression de c-Rel et de son inhibiteur I κ B α en particulier au cours du développement du thymus de poulet.

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Phylogénèse des familles Rel/NF- κ B et I κ B

1.1. Introduction

Nous avons vu dans l'introduction que les facteurs Rel/NF- κ B et I κ B interagissaient de façon étroite en régulant mutuellement leurs fonctions, leur durée de vie ou encore leur localisation subcellulaire. Mais revenons plutôt sur une caractéristique de ces familles de protéines qui est à l'origine du travail présenté dans ce chapitre.

Les précurseurs NF- κ B1 et NF- κ B2 ainsi que Relish contiennent les deux domaines, RHD d'une part et les motifs ankyrine d'autre part, qui caractérisent les familles Rel/NF- κ B et I κ B, elles créent ainsi un lien entre ces familles de protéines.

La question qui se pose s'énonce alors en deux propositions s'excluant mutuellement : 1) les protéines précurseurs NF- κ B et Relish d'une part et les protéines I κ B courtes d'autre part ont-elles évoluées indépendamment mais de façon convergente de telle sorte que leurs motifs ankyrine aient acquis les mêmes particularités? Ou 2) ces protéines différentes ont-elles un ancêtre commun qui aurait évolué en développant les particularités I κ B dans un premier temps, puis par le biais de la perte ou du gain du RHD produit les deux genres de protéines inhibitrices I κ B?

La réponse à cette question est d'importance car l'existence d'un ancêtre commun expliquerait facilement que différents types de protéine à motifs ankyrine aient une même spécificité d'interaction avec les facteurs Rel/NF- κ B, soient régulés de la même façon par ces facteurs et en plus aient développé des préférences d'interaction avec certains de ces facteurs. En effet dans l'esprit d'un passé commun, les protéines inhibitrices courtes interagiraient préférentiellement avec les Rel/NF- κ B courtes qui figureraient une ancestrale partie N-terminale, comme p50 représente la partie N-terminale de NF- κ B1.

Cette réflexion n'est que pure spéculation et l'on pourrait aussi bien argumenter sur la nécessité de développer des inhibiteurs spécifiques, les I κ B courtes en l'occurrence, pour

contrôler la fonction des Rel/NF- κ B courts qui n'ont pas ce régulateur interne constitué des motifs ankyrine mais des domaines transactivateurs puissants. Cette raison serait suffisante pour expliquer de fortes contraintes d'évolution sur les ankyrines des I κ B courtes les faisant ressembler à l'inhibiteur interne des précurseurs NF- κ B. Dans ce cas, on assisterait à une évolution convergente de deux genres de protéines qui acquièrent des spécificités communes d'interaction avec les protéines Rel/NF- κ B et de régulation par ces mêmes facteurs.

C'est pour proposer une réponse à la question énoncée précédemment que nous avons entamé une étude phylogénétique des protéines Rel/NF- κ B et I κ B en comparant leur séquence protéique dans les domaines conservés et en déterminant leur place respective dans un arbre phylogénétique, afin de découvrir s'il y a lieu de proposer un ancêtre commun pour les deux genres d'I κ B ou d'envisager une évolution convergente.

1.2. Les méthodes phylogénétiques

Pour ce faire nous avons réalisé un alignement des séquences protéiques dans les domaines conservés RHD et ankyrines entre chacun des membres dans les différentes espèces où il est connu, par exemple RelA humain, murin, aviaire, puis de chacun des groupes de membres entre eux, par exemple RelA, c-Rel, RelB *etc.*, et ce pour les deux familles Rel/NF- κ B et I κ B. Ces alignements ont ensuite été traités par des programmes informatiques dits de "reconstruction d'arbres phylogénétiques". Nous avons utilisé deux méthodes différentes de reconstruction d'arbres qui se complètent et permettent de proposer avec plus de confiance le meilleur scénario possible d'évolution.

La méthode de parcimonie analyse les différences de séquence à chaque site, c'est à dire à chaque acide aminé pour toutes les séquences alignées. On définit des sites variables, en d'autres termes qui ont évolué, pour établir un arbre. Ces sites variables sont des positions où l'on trouve des acides aminés différents en fonction des séquences. Ces sites doivent être informatifs, c'est à dire qu'ils doivent permettre de choisir entre les différents arbres possibles celui qui coûte le moins de mutation pour passer d'une séquence aux autres. S'il y a trop de différences entre les séquences et que chaque arbre possible coûte le même nombre de mutation

pour passer d'une séquence aux autres, ce site n'est pas informatif. Pour chaque site un arbre ou des arbres les plus parcimonieux sont définis. L'arbre final est celui qui lorsque l'on fait la somme de toutes les mutations pour tous les sites informatifs, coûte le moins de mutations pour passer d'une séquence aux autres.

La seconde approche est la méthode de distance analysée par l'association des plus proches voisins le "Neighbor-Joining". Par cette méthode, les différences entre séquences sont analysées globalement : chaque différence est enregistrée et la somme des différences est rapportée à la longueur de la séquence. On calcule ainsi un pourcentage de divergence par paire de séquences alignées. Ces données sont rassemblées dans une matrice dite de distance. La méthode de "Neighbor-Joining" conduit à associer en voisines directes les séquences qui présentent la plus faible distance les séparant dans la matrice. On obtient un arbre de distance dont la longueur des branches est proportionnelle à la divergence qui existe entre les séquences.

Par les deux méthodes, un certain nombre d'arbres possibles est testé avec statistiquement des branchements favorisés. On calcule des valeurs de bootstrap qui mesurent la solidité des branchements : par exemple parmi 100 arbres envisagés 83 présentent le branchement des séquences x et y entre elles. Lorsqu'une valeur de bootstrap est faible <60%, on considère le branchement proposé comme non soutenu, donc la position des séquences à ce branchement précis comme non définie et nous en verrons un exemple concret au cours de l'étude présentée dans l'article résumé ci-après.

Enfin des vitesses moyennes d'évolution sont calculées en nombre de mutation par site et par an pour les différents gènes homologues sur la base des distances séparant les séquences dans la matrice de distance rapportée aux années de divergence des espèces.

Quelques termes phylogénétiques (Solignac et al., 1995):

Plésiomorphie : Le terme plésiomorphe définit le status ancestral du caractère.

Simplésiomorphie : Le partage de l'état ancestral d'un caractère par plusieurs espèces est une simplésiomorphie.

Synapomorphie : Le partage d'un caractère dérivé, par rapport à l'état plésiomorphe, par plusieurs espèces est une synapomorphie.

Monophylie : un groupe est monophylétique s'il satisfait à l'exigence que toute espèce lui appartenant est plus étroitement apparentée à n'importe laquelle des espèces du groupe qu'à toute autre espèce n'en faisant pas partie

1.3. Résumé de l'article

Sur la base d'arbres de parcimonie et de distance obtenus à partir de l'alignement du RHD des protéines Rel/NF- κ B et des motifs ankyrine des protéines I κ B, nous définissons les relations phylogénétiques suivantes.

La famille des facteurs de transcription Rel/NF- κ B s'organise en quatre sous-familles composées de groupes : i) la sous-famille I rassemble les protéines Rel/NF- κ B courtes des groupes c-Rel, RelA, RelB et Dorsal/Dif; ii) la sous-famille II rassemble les groupes des protéines précurseurs NF- κ B1 et NF- κ B2; iii) Relish définit à lui seul la sous-famille III; iv) la sous-famille IV rassemble les facteurs de transcription NF-AT qui sont les membres les plus distants. Les sous-familles I et II sont les plus proches voisines, Relish ayant divergé beaucoup plus tôt que les autres protéines Rel/NF- κ B. Ceci permet de proposer qu'un ancêtre de structure RHD-motifs ankyrine ait existé avant la divergence arthropodes/vertébrés.

Trois sous-familles sont définies pour la famille I κ B : i) la sous-famille I regroupe les précurseurs NF- κ B1 et NF- κ B2; proche de celle-ci ii) la sous-famille II rassemble les protéines courtes I κ B α , I κ B β et Bcl-3; iii) Relish définit à nouveau une sous-famille distincte qui a divergé plus tôt.

Notre définition des groupes est en accord avec les caractéristiques structurales et fonctionnelles des différentes protéines. Nous mettons en évidence dans cette étude que les motifs ankyrine des précurseurs NF- κ B1 et NF- κ B2 ainsi que ceux de Relish sont du type spécifique I κ B, suggérant un domaine à motifs ankyrine ancestral commun. Ces protéines établissant un lien clair entre les deux familles, nous proposons un modèle dans lequel les protéines Rel/NF- κ B et I κ B seraient issues d'un ancêtre commun unique de structure RHD-motifs ankyrine. Ce modèle expliquerait les spécificités d'interactions entre les différents facteurs Rel/NF- κ B et les inhibiteurs I κ B.

ARTICLE 1

Title page

Rel/NF- κ B transcription factors and I κ B inhibitors: Evolution from a unique common ancestor

Christelle HUGUET¹, Pascale CREPIEUX² and Vincent LAUDET^{2*}

¹Laboratoire de régulation des processus invasifs, de l'angiogenèse et de l'apoptose, EP560, IFR3 Institut de Biologie de Lille, 1 rue du Professeur Calmette, 59021 Lille France.

²Laboratoire des mécanismes du développement et de la cancérisation, UMR319, IFR3 Institut de Biologie de Lille, 1 rue du Professeur Calmette, 59021 Lille France.

Tel (33) 3 20 87 10 94 ; Fax (33) 3 20 87 11 11; e-mail: vlandet@infobiogen.fr

*To whom correspondance should be addressed

Keywords: Ankyrin repeat protein, Rel Homology Domain, NF-AT, Molecular Phylogeny

Running title : Rel/NF- κ B and I κ B evolution.

ABSTRACT

From the sequences of Rel/NF- κ B and I κ B proteins, we constructed an alignment of their Rel Homology Domain (RHD) and ankyrin repeat domain. Using this alignment, we performed tree reconstruction with both distance matrix and parsimony analysis and estimated the branching robustness using bootstrap resampling methods. We defined four subfamilies of Rel/NF- κ B transcription factors: (i) cRel, RelA, RelB, Dorsal and Dif; (ii) NF- κ B1 and NF- κ B2; (iii) Relish and (iv) NF-AT factors, the most divergent members. Subfamilies I and II are clustered together whereas Relish diverged earlier than other Rel/NF- κ B proteins. Three subfamilies of I κ B inhibitors were also defined: (i) NF- κ B1 and NF- κ B2; (ii) close to subfamily I, the short I κ B proteins I κ B α , I κ B β and Bcl-3; (iii) Relish that diverged earlier than other I κ B inhibitors. Our definition of groups and subfamilies fits to structural and functional features of the Rel/NF- κ B and I κ B proteins. We also showed that ankyrin repeats of NF- κ B1, NF- κ B2 and Relish are short I κ B-specific ankyrin motifs. These proteins defining a link between Rel/NF- κ B and I κ B families, we propose that all these proteins evolved from a common ancestral RHD-ankyrin structure within a unique superfamily, explaining the specificities of interaction between the different Rel/NF- κ B dimers and the various I κ B inhibitors.



INTRODUCTION

Transcription factors represent key molecules that convert signals received by the cell into activation or repression of genes that lead to cell responses such as proliferation, differentiation or apoptosis. The Rel/NF- κ B transcription factors are involved in the immune response, *i.e.* in immunoreceptor gene expression, cytokine and growth factor regulation, and also in embryonic development and programmed cell death (reviewed in Baueerle and Henkel, 1994; Euguet *et al.*, 1994; Sabrun *et al.*, 1990; Kopp and Ghosh, 1995). These Rel/NF- κ B proteins share a 300 amino acid N-terminal domain, named the Rel Homology Domain (RHD), which harbors a DNA-binding region, a dimerization domain, a nuclear localization signal and a region of interaction with inhibitory proteins of the I κ B family (reviewed in Chytil and Verdine, 1996; Miyamoto and Verma, 1995; Verma *et al.*, 1995). Some of the Rel/NF- κ B proteins, namely cRel, RelA, RelB/Rel, Dorsal and Diff (the "ready-to-use" members), contain a transactivating domain in their C-terminal half (for references see Table 1). The others, the p50 and p52 subunits, are proteolytically matured from the precursor proteins NF- κ B1 (p105) and NF- κ B2 (p100) respectively and are devoid of transactivating domain (Table 1). Relish, a gene structurally related to NF- κ B genes, has been recently cloned in *Drosophila* (Dashay *et al.*, 1996). Members of the Rel-NF- κ B family bind DNA as homo or heterodimers and recognize the consensus decameric sequence 5'-GGGPaNNPyPyCC-3' which is named κ B site. Different κ B sites among gene promoters are bound with different affinities by the various dimers which therefore bind certain target genes preferentially (reviewed in Chytil and Verdine, 1996; Miyamoto and Verma, 1995; Miller *et al.*, 1996). In addition, depending on the dimers, the transcription of the target gene is activated or repressed: for example RelA/p50, RelA/cRel, RelB/p50, RelB/p52 are potent transcriptional activators, whereas p50/p50 or p52/p52 homodimers generally repress transcription (reviewed in Siebenlist *et al.*, 1994; Verma, *et al.*, 1995).

The various Rel/NF- κ B dimers are submitted to different regulations by inhibitors of the I κ B family (reviewed in: Miyamoto and Verma, 1995). The I κ B family is a subfamily

of ankyrin repeat proteins including I κ B α , I κ B β , I κ B γ , Bcl-3, NF- κ B1 and NF- κ B2. The NF- κ B precursor proteins present ankyrin repeats in their C-terminal half thereby exhibiting I κ B inhibitory functions (reviewed in: Siebenlist, et al., 1994). The I κ B proteins bind the various Rel/NF- κ B dimers with different affinities, and retain them in the cytoplasm (reviewed in : Miyamoto and Verma, 1995). Activation of the Rel/NF- κ B proteins requires phosphorylation and subsequent degradation of the I κ B inhibitors, thus allowing the transcription complex to translocate into the nucleus (reviewed in : Finco and Baldwin, 1995; Thanos and Maniatis, 1995; Verma, et al., 1995).

Once in the nucleus, the Rel/NF- κ B transcription factors will regulate the transcription of various target genes including their own genes in an autoregulatory loop, thus reconstituting the stocks of Rel/NF- κ B proteins in the cytoplasm. Moreover, they will activate the transcription of their I κ B inhibitors leading to the production of new I κ B proteins. The newly synthesised I κ B α will terminate the activation of Rel/NF- κ B factors by migrating into the nucleus and displacing the Rel/NF- κ B dimers from the DNA. On the contrary, the newly synthesised I κ B β will continue the activation by protecting the Rel/NF- κ B dimers from the inhibition of the newly synthesised I κ B α (reviewed in : Baeuerle and Baltimore, 1996; Gilmore et al., 1996; Miyamoto and Verma, 1995).

A large set of experimental data recently illustrated how sophisticated the relationships between the Rel/NF- κ B transcription factors and their I κ B inhibitors are : autoregulatory loops, proteins displaying both the roles of transcription factor and inhibitor, various combinations of transcriptional and inhibitory elements undergoing different regulations. In fact, the combination of the Rel/NF- κ B and I κ B families constitutes a powerful and tightly controlled pathway to respond to various stimuli and to mediate specific cell response. Therefore, it is important to understand how these two families of genes evolved and diversified to reach such a level of specificity and autoregulation. To address this question, we studied in parallel the molecular evolution of the Rel/NF- κ B and I κ B proteins. This phylogenetical analysis allowed to define the structure of the putative ancestor genes and to propose an evolutionary model that clusters both families in a unique Rel/NF- κ B/I κ B superfamily.

MATERIALS AND METHODS

Construction of the database and sequence alignments

Sequences were extracted from the EMBL and Genbank data libraries using the FASTA program in the Infobiogen network. To perform the FASTA search we used the full size sequences of the following factors: *Homo RelA*, *Homo cRel*, *Homo IRel*, *Homo NF- κ B1*, *Drosophila Dorsal*, *Homo I κ B α* , *Homo Bcl-3*, *Drosophila Cactus*. The last search in the database was performed on the Genbank release of August 1996. The Relish sequence was a kind communication from Dr. D. Holtmark.

Sequences of the Rel Homology Domain and the ankyrin repeats were aligned using the ED program of the MUST package (Phillippe, 1993). This program allows a color visualization of the aligned sequences and the alignment is done by eye. Each erythroid ankyrin sequence chosen as a reference outgroup encloses more than 20 ankyrin repeats exhibiting some differences in their sequence. We submitted the sequences to the Clustal V program which allowed to compare each of the I κ B ankyrin repeat motif with the best corresponding motif in the erythroid ankyrin (Higgins and Sharp, 1988). The final alignment is done by eye using the ED program of MUST.

The regions which are ambiguously aligned, i.e. outside of the RHD and between the repeats of ankyrin motifs, were excluded from the analysis. From the initial alignment of Rel/NF- κ B sequences containing 1534 sites, 298 sites among which 286 were variable and 269 informative were retained in the final alignment. From the initial alignment of I κ B sequences containing 2620 sites, 194 sites among which 182 were variable and 171 informative remain in the final alignment. The final alignments were used for a distance matrix and parsimony analysis.

Phylogenetical reconstruction procedures

Distance matrix was calculated using a Boolean method: every change including gaps is considered as 1, identical amino acids as 0. Tree reconstruction was performed using the Neighbor Joining program available on MUST together with bootstrap analysis using 1000

replicates (Philippe, 1993). This analysis was performed on several data sets: alignments containing different amounts of gaps for both the Rel/NF- κ B and I κ B sequences. We checked that suppression of the positions with gaps from the alignment gives trees with identical topologies. For the Rel/NF- κ B family, only the bootstrap values of some internal branches were lowered by the suppression of the gaps suggesting that gaps carry phylogenetical informations. For the I κ B family the presence of gaps resulted in a decrease of bootstrap values of internal branches of the tree. Since these gaps are mainly located between the ankyrin repeats which are in variable numbers between the different members, the information leading to the definition of the subfamilies (i.e. those concerned in the internal branches of the tree) is likely contained inside the ankyrin motif rather than in the arrangement of these repeats.

Parsimony analysis was performed using the 3.0 version of the PAUP software (Swofford, 1991). To limit calculation time, the number of sequences in this analysis was decreased by exclusion of the mouse sequences when human homologues are known. We checked that this choice does not alter the conclusions of the analysis. On each parsimony analysis, 100 bootstrap replicates were performed.

All analysis were performed on a Macintosh Power PC 6100/66.

Determination of evolutionary rates

To avoid saturation artifacts generated by the use of widely divergent species evolving at different rates, we excluded from the data set the *Drosophila* sequences and kept homologues of each molecule in human, rat, mouse, chicken or *Xenopus*. Only cRel, RelA, RelB, NF- κ B1, NF- κ B2, I κ B α and the reference outgroup of ankyrins remained in the analysis.

The data matrices comparing the different homologous versions of each molecule were calculated with standard errors using MEGA (Suzar et al., 1993) and crude data were transformed into evolutionary speed and expressed as a number of mutations per site and per year (M/S/Y) using the following divergence times: *Mus-Rattus*: 13 Myr, *Homo-Mus* and *Homo-Rattus*: 70 Myr, *Manacids-Gallus*: 300 Myr, *Mammals-Xenopus* and *Gallus-Xenopus* 360 Myr. Data were converted into Poincaré units (IPAU= 10^9 M/S/Y). Evolutionary speeds for various molecules were then averaged and expressed with error bars for all the sequences.

RESULTS

Alignment of sequence of the Rel/NF- κ B and I κ B proteins

In order to produce a complete list of all known full length sequences of the members of both the Rel/NF- κ B and I κ B families (Table 1), we performed several searches in the Genbank and EMBL databases using the FASTA program. Only complete cDNA sequences were kept. Therefore, since we only found a 3' flanking region for the mouse Bcl-3 gene in the data banks (accession number M90397) despite its cloning cited by Ito *et al.* (Ito *et al.*, 1994), it has not been included in this study. Thirty-seven sequences were retained in this analysis: 25 in the Rel/NF- κ B family and 14 in the I κ B family ; the NF- κ B1, NF- κ B2 and Relish sequences belong to both families. Three ankyrin genes (erythroid ankyrin or ankyrin 1) were chosen as an outgroup for the I κ B family.

The complete alignment of the Rel/NF- κ B sequences is 1534 amino acid long with some gaps, essentially due to the NF-AT genes and to a sequence insertion of approximately 40 amino acids in the N-terminal part of the RHD of NF- κ B1. This sequence does not participate in DNA-binding and forms an α -helix structure longer than that found in c-Rel or RelA (Ghosh *et al.*, 1995; Müller *et al.*, 1995). The I κ B sequence alignment is 2620 amino acid long with numerous gaps, mostly located between the ankyrin repeat motifs since there are differences in the number of repeats of each protein (8 for NF- κ B1, 5 for I κ B α). The ankyrin motifs can also be of variable length (Frachiolla *et al.*, 1993; Héron *et al.*, 1995; Jaffray *et al.*, 1995). Generation of the phylogenetic trees was based on the separate alignment of the RHD sequences and the ankyrin repeat sequences respectively. NF-AT4 and I κ B γ do not appear in the trees since NF-AT4 and NF-AT α are a same protein and I κ B γ messenger RNA is transcribed from a secondary start site of transcription of the NF- κ B1 gene and thus I κ B γ is identical to the C-terminus of the NF- κ B1 protein.

Three subfamilies of Rel/NF- κ B transcription factors

The topology of the distance tree is shown in Fig. 1A left panel. By locating the last internal branch in this tree, we can define 4 subfamilies of Rel/NF- κ B proteins. These

subfamilies are: (i) a large one comprising the three following groups of proteins: cRel/vRel and RelA, RelB/IRel, Dorsal/Dif; (ii) a second subfamily containing NF- κ B1 and NF- κ B2 groups; (iii) a third subfamily defined by Relish. The NF-AT genes belong to a fourth subfamily that can be considered as an outgroup in view of its wide divergence compared with the three other subfamilies. A branching order between the subfamilies can be assessed from the tree topology. Subfamily I (cRel, RelA, ...) and subfamily II (NF- κ B1, NF- κ B2) appear to be clustered together with a bootstrap value of 82% and are clustered with subfamily III (Relish) with a 100% bootstrap value.

Parsimony analysis was then performed with a reduced data set (see Materials and Methods). The data set contains a clear phylogenetical signal since after independent choices of 10,000 random trees we found g_i statistics values of -0.782232 ± 0.0058 which are clearly significant according to (Hillis and Ruelisenbeck, 1992). The trees obtained have a consistency index of 0.789. The overall topology of this tree (Fig. 1A right panel) was similar to the distance tree with the notable exception of the placement of Relish which is linked to the Dorsal/Dif group inside subfamily I. The monophyly of this subfamily is supported by 61% bootstrap only. The low bootstrap value of 53% which clusters Relish with Dorsal and Dif led us to consider this relationship as unresolved. Since these bootstrap values are weak and since Relish is structurally distant from subfamily I members, we consider it as a unique member of a distinct subfamily as indicated in the distance tree.

It is interesting to study the topologies inside the subfamilies and groups. According to the distance tree, subfamily I is constituted of three groups among which cRel and RelA are the closest neighbors and belong to the same group, followed by the RelB group and finally the Dorsal/Dif group. These clusters are supported by high bootstrap values from 80% to 100%. cRel, RelA and RelB genes represent typical paralogue genes descended from the duplication of a unique ancestral gene. Inside the groups, genes are homologues of different species and we confirmed in this study previous data showing that Xrel1 represents a *Xenopus* homologue of RelA and that IRel is a human homologue of mouse RelB and of the recently cloned *Xenopus* RelB. We also show that Xrel2 can be identified as a *Xenopus* homologue of cRel. The most salient features of the Rel/NF- κ B factors are their ability to dimerize and to recognize different

versions of the κ B site. These features are harbored by the RHD and subtle variations in the RHD sequence dictates the specificity of the various members of this family. Therefore, a high identity between two species in this domain points to them as homologous genes. For these reasons, we consider Xrel2 as a cRel homologue, despite their divergent C-terminal sequences (Tannahill and Wardle, 1995).

The branching order of *Gallus* and *Xenopus* RelA, supported by 88% bootstrap in the distance analysis, does not fit with the species evolution. Indeed, since birds are closer to mammals than to amphibians, *Gallus* RelA should be a closer neighbor of *Homo* RelA than Xrel1. Given that both the methods of distance and parsimony clustered *Gallus* RelA with the other RelA genes with high bootstrap values, it is unlikely that this gene represents a new Rel/NF- κ B member, and we favor the hypothesis of an artefactual mis-placement of *Gallus* RelA due to an acceleration of sequence divergence.

From the distance tree of Fig. 1A, it is clear that Dorsal and Dif may be considered as homologues of the cRel, RelA and RelB genes. It appears clearly that one specific duplication of the arthropod lineage occurred to give rise to Dorsal and Dif which are linked together with a 93% bootstrap value. The parsimony analysis gave similar group and subfamily topology. However, it did not resolve any branching order for the RelB and Dorsal/Dif groups inside subfamily I.

The second subfamily is constituted of the paralogous genes NF- κ B1 and NF- κ B2 that also resulted from a vertebrate-specific gene duplication. Interestingly, the *Drosophila* homologue of the NF- κ B subfamily members remains to be found since Relish, which exhibits a related gene organization, is not related more to NF- κ B genes than to any other member of the family. Thus, one *Drosophila* homologue of NF- κ B and one vertebrate homologue of Relish may be discovered.

The NF-AT subfamily IV is composed of four paralogous genes. The distance tree and the parsimony analysis provided a different branching order for the NF-AT genes, consequently it is difficult to choose between the two topologies. The cloning of one or more *Drosophila* related gene(s) would help in the determination of the true topology.

In conclusion the Rel/NF- κ B family of transcription factors can be divided in four subfamilies (Fig. 2A). Subfamily I clusters the proteins which contain a RHD and a transactivation domain (TA) as basic organization : cRel, RelA, RelB and Dorsal/Dif. Subfamily II groups NF- κ B1 and NF- κ B2 which are precursor proteins presenting the RHD in their N-terminus and ankyrin repeats in their C-terminus. Subfamily III is defined by Relish which displays the same precursor structure as NF- κ B1 and NF- κ B2. Subfamily IV groups NF-AT proteins that present serine-proline boxes upstream of their RHD and are distantly related to the Rel/NF- κ B RHD.

Three subfamilies of I κ B inhibitors

The I κ B sequences were treated similarly and the trees generated are shown in Fig. 1B. The localization of the internal branch of the distance tree (left panel) allows to distinguish in a first approach four subfamilies among the I κ B proteins in addition to the ankyrin outgroup. These subfamilies are : (i) NF- κ B1 and NF- κ B2 (100% bootstrap value); (ii) I κ B α with Cactus (72%); (iii) I κ B β and Bcl-3 (82%) and (iv) Relish alone that diverged before any other subfamily. In the parsimony analysis (right panel), the NF- κ B, I κ B α and Relish subfamilies are still well defined, however this method separates I κ B β and Bcl-3 as different subfamilies. Thus, whether I κ B β and Bcl-3 are more closely related together than to any other member of the family remains undetermined. The parsimony tree gave an identical result but the branching order between the four subfamilies remains unresolved by this analysis, except for Relish which diverged first. The data set contains a clear phylogenetical signal since after independent choices of 10,000 random trees we found g1 statistics values of -0.872186 ± 0.0035 which are clearly significant according to (Hillis and Huelsenbeck, 1992). The trees obtained have a consistency index of 0.836.

Again, inside the subfamilies, vertebrate specific gene duplications gave rise to paralogous genes such as NF- κ B1 and NF- κ B2. Of note, as for the RHD domain tree, Relish constitutes a different subfamily (III) and cannot represent a direct arthropod homologue of NF- κ B genes. The *Drosophila* Cactus gene represents the homologue of the unique I κ B α gene. Apparently, no vertebrate specific gene duplication has given rise to a paralogous version of

I κ B α but the discovery of a new paralogue is still possible. I κ B β and Bcl-3 define two different subfamilies or two very distant paralogue genes of a unique subfamily, whose homologue in *Drosophila* remains to be found.

In conclusion the I κ B family can be divided into three subfamilies (Fig. 2B): (i) the robust subfamily I, where NF- κ B1 and NF- κ B2 proteins play an I κ B inhibitory function as precursor proteins ; (ii) subfamily III, where an I κ B-like inhibitory function is expected for Relish, considering its similarities with the NF- κ B molecules; (iii) the three following groups: I κ B α , I κ B β and Bcl-3 that could be grouped in a unique large subfamily II (the monophyly of which is uncertain) of pure I κ B short ankyrin repeat proteins according to their structural features.

Evolutionary rates

In order to compare the speed of evolution of the different Rel/NF- κ B and I κ B molecules, homologous versions of genes in human, mouse, chicken and *Xenopus* were selected from the complete data set. Then the number of amino acid differences existing for a given molecule between the various homologous sequences was computed. This number was transformed into an evolutionary rate (number of mutations per site and per year, M/S/Y; 10^{-9} M/S/Y = 1 PAU) (Fig. 3). The RHD and the ankyrin repeats were treated separately. In both Rel/NF- κ B and I κ B families, paralogous genes exhibited very similar evolutionary speeds : cRel, RelA and RelB evolved respectively at 0.77, 0.79 and 1.0 PAU; NF- κ B1 and NF- κ B2 evolved at 0.26 and 0.51 PAU in the RHD and at 0.80 and 1.02 PAU in the ankyrin repeats, respectively.

Interestingly, NF- κ B genes evolved much more slowly in their RHD than the other Rel/NF- κ B proteins did. In fact, the NF- κ B RHD evolved at an average speed of 0.38 PAU compared to 0.85 PAU for the RHD of other Rel/NF- κ B. Thus, there is approximately twice as much constraint on the RHD of the precursor proteins as on the RHD of subfamily I.

On the other hand the ankyrin repeats of the precursor proteins evolved at the same rate as the short I κ B molecules, between 0.8 and 1 PAU, and both evolved 8-10 fold faster than ankyrin repeats of the reference ankyrins. This suggests that the ankyrin repeats of the precursor proteins are "I κ B-specific ankyrin repeats" and that the ankyrin repeats of the I κ B

proteins have evolved towards a specialized function that requires less constraint than classical ankyrin repeats. The evolutionary speed analysis also indicates that within the Rel/NF- κ B proteins, the ankyrin repeats evolved faster than the RHD, which may reflect more constraints on the RHD than on the ankyrin repeats. This result was expected given the strongly constrained DNA binding role of the RHD.

When compared to the DNA binding and ligand binding domains of other transcription factors such as the nuclear receptors, the RHD and ankyrin repeats appears to be less constrained. Nuclear receptors evolved at an averaged speed of 0.303 PAU which corresponds to the accumulation of 1% sequence divergence in 16.5 million years (V.L., submitted). However, this averaged speed hides considerable variations within the nuclear receptor superfamily (from 0.078 PAU to 1.0 PAU). In comparison, the Rel/NF- κ B and I κ B families appears remarkably homogeneous when considering the apparent stability of their evolutionary rates.

DISCUSSION

The NF- κ B and Relish proteins are common to both the families of transcription factors and inhibitors suggesting an evolutionary link between the two families. To search for the involved evolutionary mechanism(s), we analyzed in parallel the evolutionary relationships within both the Rel/NF- κ B and the I κ B families. Interestingly, as discussed below, the branching order and definition of subfamilies and groups follow structural and functional features in both families. Our analysis revealed that the pattern of gene duplication events that explain the present diversity of Rel/NF- κ B and I κ B families is very similar to what happened for other transcription factor families. We previously demonstrated that the diversity of ETS genes and nuclear receptors, as for the Hox/HOM or Myc families, arises very early during metazoan evolution and then increases specifically in the vertebrate lineage (Atchley and Fitch, 1995; Holland and Garcia-Fernandez, 1996; Laudet et al., 1992; Laudet et al., 1993). Likewise, the existence of paralogous members such as c-Rel, RelA and RelB or NF- κ B1 and NF- κ B2, shows that the diversity of Rel/NF- κ B or I κ B families members was also increased during vertebrate evolution.

The Rel/NF- κ B family.

Among Rel/NF- κ B molecules the closest neighbors are cRel and RelA, that belong to the first group of subfamily I. The second group is composed of RelB proteins presenting, in addition to the basic organization RHD-transactivation domain (TA), a leucine zipper in their N-terminus. cRel, RelA and RelB paralogous genes diverged with similar evolutionary speed, although the RelB gene seems to have slightly accelerated. Despite their highly conserved features, they strikingly differ in their dimerization specificity: in contrast to cRel and RelA, RelB proteins are unable to homodimerize (Dobrzanski et al., 1993; Ruben et al., 1992b; Ryseck et al., 1992; Suzuki et al., 1995). The third group of subfamily I proteins contains *Drosophila* Dorsal and Dif which present the basic organization RHD-TA and bind DNA as homodimers only. The Dorsal/Dif group is composed of genes issued from a duplication that occurred specifically in the arthropod lineage. Regulation of Dorsal nuclear uptake by Cactus is homologous to the vertebrate regulation pathway of Rel/NF- κ B factors by I κ B factors (reviewed in : Miyamoto and Verma,

1995; Wasserman, 1993). The specificity of interaction with the inhibitor is mediated by a 6 amino acid region of the RFD, termed region I, conserved in Dorsal/Dif, RelA, cRel and p50 (Tatei and Levine, 1995). The acquisition of the heterodimerization potential by the vertebrate members extends even more the abilities of a few transcription factors to regulate numerous genes in different cell types. The specificity displayed by the different Rel/NF- κ B subfamilies of genes has been acquired mostly after duplication of a common ancestor. Thus, duplication events have increased the diversity and regulatory abilities of Rel/NF- κ B proteins during evolution.

Subfamily II contains the NF- κ B1 and NF- κ B2 groups of precursor proteins. Sequence identities in the RHD define the NF- κ B1 and NF- κ B2 species as the closest paralogous genes constituting a distinct subfamily II. This reflects common structural and functional characteristics such as a similar genomic organization (Frachiolla, et al., 1993; Héron, et al., 1995), transcriptional up-regulation by Rel/NF- κ B proteins, and similar proteolytic maturation. Nevertheless, each protein exhibits particularities which could explain the selective advantage to maintain similar copies of both genes after duplication. For example, they bind the various κ B sites with a different specificity, a property which has likely been acquired by divergence after duplication in the vertebrate lineage.

Subfamily III contains Relish that displays the precursor structure of NF- κ B proteins but diverged earlier than any other Rel/NF- κ B molecule, including the *Drosophila* Dorsal and Dif genes. Therefore, Relish may represent the founder of a new subfamily of Rel/NF- κ B genes.

In the absence of any other reference, the NF-AT subfamily has been chosen as outgroup, although it is considered as a Rel/NF- κ B family member. Indeed, NF-ATc has been suggested recently to adopt a similar DNA-bound conformation as p50, with several conserved key DNA contact residues (Wolfe et al., 1997). However, NF-AT proteins do not dimerize or interact with I κ B inhibitors, and they do not bind κ B sites (reviewed in : Chytil and Verdine, 1996). All four NF-AT genes are probably descended from the vertebrate duplication of an ancestor gene that diverged very early from the Rel/NF- κ B branch. For this reason, a *Drosophila* homologue of NF-AT genes should be discovered.

The I κ B family

As the Rel/NF- κ B family, the organization of the I κ B family that we describe here is well supported by the known functional characteristics of these factors. The topology of both the distance and parsimony trees and the analysis of evolutionary speeds clearly indicate that all three defined subfamilies harbor I κ B-like ankyrin repeats and thus form a cluster of subfamilies equally distant to the erythroid ankyrin. The most prominent feature that dictates their belonging to the I κ B subfamily of ankyrin proteins are the fact that they inhibit the Rel/NF- κ B transcription factors and their ability to undergo a common pathway of degradation involving phosphorylations and proteasome-dependent degradation (reviewed in : Miyamoto and Verma, 1995; Siebenlist, et al., 1994; Verma, et al., 1995).

Relish appears as an early offshoot of the I κ B family and its structure should be comparable to the one of the ancestor. It is interesting to note that both RHD and ankyrin repeat domains provide the same information, i.e. the divergence of Relish before NF- κ B as a result of an early duplication. Relish is expected to exhibit an I κ B inhibitory function since it presents the classical structural organization of NF- κ B proteins: six complete ankyrin repeats preceded by a serine rich sequence that mimics the glycine rich sequence of NF- κ B proteins, and followed by an acidic PEST-like sequence (Dashay, et al., 1996).

The other type of long I κ B inhibitor is represented by subfamily I composed of NF- κ B1 and NF- κ B2 paralogous genes. Their structure differs from that of other ankyrin proteins such as the human erythrocyte ankyrin in that they contain six intact ankyrin repeats, one short repeat and an acidic region (Frachiolla, et al., 1993; Héron, et al., 1995). (reviewed in : Miyamoto and Verma, 1995; Siebenlist, et al., 1994). NF- κ B1 and NF- κ B2 have been shown to interact preferentially with their corresponding N-terminal part p50 and p52, but also to inhibit cRel and RelA. They retain Rel/NF- κ B proteins in the cytoplasm and are able to inhibit their DNA-binding activity *in vitro* (Naumann et al., 1993a; Naumann et al., 1993b; Scheinman et al., 1993).

I κ B α molecules belong to the first group of the large subfamily II and specifically interact with RelA and cRel (reviewed in : Miyamoto and Verma, 1995). I κ B α molecules present six ankyrin repeats and an acidic domain (Hatada *et al.*, 1993; Hatada *et al.*, 1992; Jaffray, *et al.*, 1995). Two different functions have been assigned to I κ B α : cytoplasmic retention of Rel/NF- κ B members which is shared by the other I κ B inhibitors and termination of Rel/NF- κ B activation by I κ B α -specific DNA-binding inhibition in the nucleus (Arenzana-Seisdedos *et al.*, 1995; Beg *et al.*, 1995; Klement *et al.*, 1996; Zabel and Bauerle, 1990). Cactus is a *Drosophila* homologue of the I κ B α ancestor. Nevertheless, it slightly diverges from I κ B α since the acidic domain conserved in all species does not seem to be necessary in Cactus for interaction with Dorsal (Kidd, 1992).

The second group of subfamily II is defined by I κ B β whose structure and regulation are very closed to I κ B α : six ankyrin repeats, acidic domain, phosphorylation dependent degradation, ability to disrupt DNA-binding *in vitro* and high affinity for RelA and cRel (DiDonato *et al.*, 1996; Thompson *et al.*, 1995; Zabel and Bauerle, 1990). However, I κ B β is not up-regulated after Rel/NF- κ B induction and does not terminate Rel/NF- κ B activity in the nucleus but is rather specialized in the regulation of the Rel/NF- κ B persistent response upon activation (Thompson, *et al.*, 1995). In addition, a new function for I κ B β as a chaperone for Rel/NF- κ B factors has been recently proposed (Suyang *et al.*, 1996).

The last group is represented by Bcl-3 which presents six complete ankyrin repeats and an incomplete seventh one that has been proposed to replace the lacking acidic domain. Unlike other short I κ B proteins Bcl-3 exclusively interacts with p50 and p52 homodimers, which could be due to the specific region I of six amino acids located in the RHD of p50 and p52 (Tatei and Levine, 1995). In contrast to previous results, our study does not show any direct clustering between Bcl-3 and NF- κ B subfamilies (Ito *et al.*, 1995). This discrepancy could be due to the recent cloning of new genes that increase the sample of sequences to compare. Bcl-3 is very different from the other I κ B proteins since it appears predominantly located in the nucleus of various cell lines (reviewed in (Miyamoto and Verma, 1995))

and its most surprising function is the ability to activate transcription through κ B sites via ternary complexes with p50 or p52 homodimers (Bours *et al.*, 1993; Fujita *et al.*, 1993).

A Rel/NF- κ B/I κ B superfamily.

Using the tree as an evolutionary framework, we decided to reconstruct the evolution of the different structural domains of the Rel/NF- κ B family members. Given that members of the family such as NF- κ B or Relish contain two main domains, the RHD and ankyrin repeats, two models of evolution of these domains can be considered depending on the structure of the ancestor (Fig. 4A, I and II). Model I proposes an ancestor gene which displays the RHD-ankyrin repeat structure. In such a model the RHD-ankyrin repeat structure is plesiomorphic. Two independent events of loss of the ankyrin domain are thus necessary to give rise to the NF-AT family first and later to the Rel subfamily, whereas both subfamilies II and III members (respectively NF- κ B genes and Relish), conserved the ancestral structure. In that model the loss of ankyrin repeats is a symplesiomorphy of Rel and NF-AT genes. In model II, an ancestral RHD evolved to give rise to the NF-AT genes and acquired later on ankyrin repeats to give rise to the Rel/NF- κ B lineage. A later event of loss of the ankyrin domain led to Rel/NF- κ B subfamily I, while subfamilies II and III directly evolved from the RHD-ankyrin repeat structure. In this model the secondary loss of ankyrin repeats with the acquisition of transactivating domain is a synapomorphy of the Rel group. These two models are equally parsimonious since they require two events of insertion/deletion of large domains. The evolution of the ankyrin domain of NF- κ B1 and NF- κ B2 inside the I κ B family helps to define which one of the RHD-ankyrin or the RHD ancestor version is favored.

As for Rel/NF- κ B proteins, we studied how the I κ B family members may have acquired their different domains during evolution. Our results led us to propose a model of evolution for the I κ B proteins inside the ankyrin repeat protein family (Fig. 4B). Since ankyrin repeats have been described in Nematodes (Otsuka *et al.*, 1995) and even in yeast sequences (Fasta search, not shown), this motif appears more ancient than the RHD, since we could not identify RHD homologous sequences in these species (Fasta search, not shown). Thus the I κ B family members clearly originate from a classical ankyrin ancestor that has subsequently gained

the RHD domain. The most parsimonious scenario suggests that a unique acquisition event of the RHD gave rise to subfamilies I, II and III. As noted above, Relish diverged early and conserved this ancestral structure. A later event of loss of this RHD led to subfamily II of short I κ B proteins. This scenario is in favor of the monophyly of subfamily II. Duplication events and divergence led to the specialized I κ B α , I κ B β and Bcl-3 proteins.

Considering that NF- κ B1, NF- κ B2 and Relish are shared by the two families ; that the precursor protein (Rel/NF- κ B subfamilies I and III) and "ready to use" Rel proteins (Rel/NF- κ B subfamily I) have a common ancestor (see above) and that the long and short I κ B proteins have also a common ancestor, it is tempting to unify the Rel/NF- κ B and I κ B families into a large Rel/NF- κ B/I κ B superfamily. According to this hypothesis, all of these molecules have descended from a common ancestor (Fig. 4C). Thus, we can unify the models of evolution presented separately for the NF- κ B and I κ B families. In such a view, model I proposed above for the Rel/NF- κ B family evolution is favored. Thus, we define a common evolutionary pathway that begins with an ankyrin ancestral domain that diverged after duplication to evolve in various ankyrin proteins in one hand and acquired an ancestral RHD in the other hand. From the ancestral RHD-ankyrin repeat structure, the NF-AT lineage separated first by loss of the ankyrin domain. After duplication of the RHD-ankyrin repeat ancestor, the two subfamilies I and III of long ankyrin repeat proteins (Relish and NF- κ B) diverged while conserving the same complete structure. The existence of the Rel and short I κ B groups may thus be explained by a single event of scission of an ancestral gene exhibiting a RHD-ankyrin repeat structure. Only one such event of scission taking place before the arthropod separation is necessary to give rise to both the "ready to use" Rel factors and the short I κ B inhibitors. This model of evolution is particularly parsimonious since it requires only three events : one gain of an RHD very early on, one loss of an ankyrin repeat in the NF-AT lineage and the scission event. Furthermore it would explain why the long I κ B protein evolved to preferentially interact with p50 and p52 processed from their N-terminal part and the short I κ B to preferentially inhibit the "ready to use" Rel/NF- κ B proteins (see above discussion). Indeed, if we consider that the "ready to use" factors and the short I κ B inhibitors are descended from a unique ancestral RHD-ankyrin structure, both the ankyrin of NF- κ B precursors and short I κ Bs preserved the specificity to preferentially inhibit

"their N-terminal part" during evolution. A co-evolution model appears much more constraining and less parsimonious than the evolution model we propose in a unique Rel/NF- κ B/I κ B superfamily. In such a co-evolution model (as described for the insulin-NGF gene family and their receptor (Fryxell, 1995)), the ankyrin repeats of the short I κ Bs would have evolved independently and converged to acquire the characteristics that they share with the ankyrin repeats of the long I κ Bs. Moreover, they would have evolved to preferentially interact with certain Rel/NF- κ B subunits. In contrast, we consider that our model of evolution in a unique superfamily explains the highly sophisticated regulations existing between the Rel/NF- κ B transcription factors and their inhibitors and the high identities in the ankyrin domain of the long and short I κ Bs.

ACKNOWLEDGEMENT

We are grateful to Corinne Abbadie, Dominique Stébelin and Bernard Vandembunder for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from the Institut Pasteur de Lille, the Centre National de la Recherche Scientifique, the GREG and the Association pour la Recherche sur le Cancer. C.H. was supported by a fellowship from the Association pour la Recherche sur le Cancer.

REFERENCE

- Arenzana-Seisdedos F, Thompson J, Rodríguez MS, Bachelier F, Thomas D and Hay RT (1995) *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 2689-2696.
- Atchley WR and Fitch WM (1995) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **92**, 10217-10221.
- Baeruerle PA and Baltimore D (1996) *Cell*, **87**, 13-20.
- Baeruerle PA and Henkel T (1994) *Annu. Rev. Immunol.*, **12**, 141-179.
- Beg AA, Sha WC, Bronson RT and Baltimore D (1995) *Genes & Dev.*, **9**, 2736-2746.
- Birkmeier CS, White RA, Peters LL, Hall EJ, Lux SE and Barker JE (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 9533-9540.
- Bours V, Burd PR, Brown K, Villalobos J, Park S, Ryseck RP, Bravo R, Kelly K and Siebenlist U (1992) *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 685-695.
- Bours V, Franzoso G, Azarenko V, Park S, Kanno T, Brown K and Siebenlist U (1993) *Cell*, **72**, 729-739.
- Brownell E, Mittereder N and Rice NR (1989) *Oncogene*, **4**, 935-942.
- Capobianco AJ, Chang D, Mosialos G and Gilmore TD (1992) *J. Virol.*, **66**, 3758-3757.
- Capobianco AJ, Simmons DL and Gilmore TD (1990) *Oncogene*, **5**, 257-255.
- Chytil M and Verdine GL (1996) *Current Opinion in Structural Biology*, **6**.
- Davis N, Ghosh S, Simmons DL, Tempst P, Lion HC, Baltimore D and Bose HJ (1991) *Science*, **253**, 1268-1271.
- De Martin R, Vanhove B, Cheng Q, Hofer E, Csizmadia V, Winkler H and Bach FH (1993) *EMBO J.*, **12**, 2773-2779.
- DiDonato J, Mercurio F, Rosette C, Wu-Li J, Suyang H, Ghosh S and Karin M (1996) *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 1295-1304.
- Dobrzanski P, Ryseck R-F and Bravo R (1993) *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 1572-1582.
- Dubreuil RR and Yu J (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 10285-10289.
- Dushay MS, Asling B and Hultmark D (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 10343-10347.
- Finco TS and Baldwin J. A.S. (1995) *Immunity*, **3**, 263-272.
- Frachiolla NS, Lombard L, Salina M, Migliazza A, Baldini L, Berti E, Cro L, Polli E, Maiolo AT and Neri A (1993) *Oncogene*, **8**, 2839-2845.
- Fryxell KJ (1996) *TIG*, **19**, 364-369.
- Fujita T, Nolan PP, Lion H-C, Scott ML and Baltimore D (1993) *Genes & Development*, **7**, 1354-1363.
- Geisler R, Bergmann A, Hirumi Y and Nusslein-Volhard C (1992) *Cell*, **71**, 613-621.
- Ghosh G, Van Duyne GD, Ghosh S and Sigler FB (1995) *Nature*, **373**, 303-310.
- Ghosh S, Gifford JM, Riviere LR, Tempst P, Nolan GP and Baltimore D (1990) *Cell*, **62**, 1019-1029.
- Gilmore TD, Koedood M, Piffat KA and White DF (1996) *Oncogene*, **13**, 1367-1378.
- Grumet RJ and Gerondakis S (1989) *Oncogene Research*, **4**, 1-8.

- Haskill S, Beg AA, Tompkins SM, Morris JS, Yurochko AD, Sampson-Johannes A, Mondal K, Ralph P and Jr. BAS (1991) *Cell*, 65, 1281-1289.
- Hatada EN, Naumann M and Scheidareit C (1993) *EMBO J.*, 12, 2781-2783.
- Hatada EN, Nieters A, Wilczyn FG, Naumann M, Meyer R, Nucifora G, McKeithan TW and Scheidareit C (1992) *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 2489-249393.
- Héron E, Deloukas P and Van Loon APCM (1995) *Genomics*, 30, 493-505.
- Higgins DG and Sharp PM (1988) *Gene*, 73, 237-244.
- Hillis DM and Huelsenbeck JP (1992) *J. Heredity*, 83, 189-195.
- Hoey F, Sun YL, Williamson T and Xu X (1995) *Immunity*, 2, 461-472.
- Holland FWH and Garcia-Fernandez J (1996) *Dev. Biol.*, 173, 382-395.
- Huguet C, Enrietto P, Vandenbunder B and Abbadie C (1994) *Cell Death and Differentiation*.
- Ikeeda T, Honjo K, Hirota Y and Omodera T (1993) *Gene*, 133, 237-242.
- Ip YT, Reach M, Engstrom Y, Radalayil L, Cai H, Gonzales-Crespo S, Tatei K and Levine M (1993) *Cell*, 75, 753-763.
- Ito CY, Adey N, Bantch VL and Baldwin Jr AS (1995) *Genomics*, 29, 490-495.
- Ito CY, Kazantsev AG and Baldwin Jr AS (1994) *Nucleic Acids Research*, 22, 3787-3792.
- Jaffray E, Wood KM and Hay RT (1995) *Mol. Cell. Biol.*, 15, 2166-2172.
- Kabrun N, Bumstead N, Hayman MJ and Enrietto PJ (1990) *Mol. Cell. Biol.*, 10, 4788-94.
- Kao KR and Hopwood ND (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 88, 2697-2701.
- Kidd S (1992) *Cell*, 71, 623-635.
- Kieran M, Blank V, Logeat F, Vandekerckhove J, Lottspeich F, Le BD, Urban MB, Kourilsky P, Saewerle PA and Israel A (1990) *Cell*, 62, 1007-1018.
- Klement JF, Rice NJ, car EB, Abbondanzo SJ, Powers GD, Bhatt H, Chan C-H, Rosen CA and Stewart CL (1996) *Mol. Cell. Biol.*, 16, 2341-2349.
- Kopp EB and Ghosh S (1995) *Advances in Immunology*, 58, 1-27.
- Kumar S, Tamura K and Nei M (1993) *MEGA: molecular evolutionary genetics analysis, version 1.01*. The Pennsylvania State University, University Park, PA 16802.
- Lambert S, Yu H, Prochal JT, Lawler J, Ruff P, Speicher D, Cheung MC, Fan YW and Palek J (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 1730-1734.
- Laudet V, Henni C, Coll J, Catzeflis F and Stehelin D (1992) *EMBO J.*, 11, 1003-1013.
- Laudet V, Niel C, Duterque-Cognillaud M, Leprince D and Stehelin D (1993) *Biochem. and Biophys. Res. Com.*, 190, 8-14.
- Masuda ES, Naito Y, Tokumitsu H, Campbell D, Saito F, Hannan C, Arai K and Arai N (1995) *Mol. Cell. Biol.*, 15, 2697-2706.
- McCaffrey PG, Luo C, Karpola TK, Jain J, Badalian TM, Ho AM, Rugean E, Lane NS, Lambert JM, Curran T, Verdine GL, Rao A and Hogan PG (1993) *Science*, 262, 750-754.

- Miyamoto S and Verma IM (1995) *Adv. Cancer Res.*, **66**, 255-292.
- Müller CW, Rey FA and Harrison SC (1996) *Nature Structural Biology*, **3**, 224-227.
- Müller CW, Rey FA, Sodeoka M, Verdine GL and Harrison SC (1995) *Nature*, **373**, 311-317.
- Naumann M, Nieters A, Hatada EN and Scheidereit C (1993a) *Oncogene*, 2275-2281.
- Naumann M, Wulczyn FG and Scheidereit (1993b) *EMBO J.*, **12**, 213-222.
- Nolan GP, Ghosh S, Liou HC, Tempst P and Baltimore D (1991) *Cell*, **64**, 961-969.
- Northrop JP, Ho SN, Chen L, Thomas DJ, Timmerman LA, Nolan GP, Admon A and Crabtree GR (1994) *Nature*, **369**, 497-502.
- Ohno H, Takino G and McKeithan TW (1990) *Cell*, **60**, 991-997.
- Otsuka AJ, France R, Yang B, Shim K, Tang L, Zhang Y, Boontrakulpoontawee P, Jeyaprakash A, Hedgecock E, Wheaton VI and Sobery A (1995) *J.Cell.Biol.*, 1081-1092.
- Philippe H (1993) *Nucleic Acids Res.*, **21**, 5264-5272.
- Ruben SM, Dillon RJ, Schreck R, Henkel T, Chen CH, Maher M, Baeverle PA and Rosen CA (1991) *Science*, **251**, 1490-1493.
- Ruben SM, Klement JF, Coleman TA, Maher M, Chen CH and Rosen CA (1992a) *Genes & Development*, **6**, 745-760.
- Ruben SM, Narayanan R, Klement JF, Chen CH and Rosen CA (1992b) *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 444-54.
- Ryseck RP, Bull P, Takaniya M, Bours V, Siebenlist U, Dobrzanski P and Bravo R (1992) *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 674-684.
- Schaiman RI, Bag AA and Baldwin Jr AS (1993) *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 6089-6101.
- Siebenlist U, Franzoso G and Brown K (1994) *Annu. Rev. Cell Biol.*, 405-55.
- Sif S and Gilmore TD (1993) *J. Virol.*, **67**, 7612-7617.
- Steward R (1987) *Science*, **238**, 692-694.
- Suyang H, Phillips R, Douglas I and Ghosh S (1996) *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 5444-5449.
- Suzuki K, Yamamoto T and Inoue J (1995) *Nucleic Acids Research*, **23**, 4664-4669.
- Swofford DL (1991) *Phylogenetical analysis using parsimony, Version 3.1 Computer program distributed by the Illinois Natural History Survey, Champaign, Illinois.*
- Tannabill D and Wardle FC (1995) *Int. J. Dev. Biol.*, **39**, 549-558.
- Tatei K and Levine M (1995) *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 3627-3634.
- Tewari M, Dobrzanski P, Kohn KL, Crewsman DE, Hsu JC, Bravo R and Taub R (1992) *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 2898-2908.
- Thanos D and Maniatis T (1995) *Cell*, **80**, 529-532.
- Thompson JE, Phillips RJ, Erdjument-Bronage H, Tempst P and Ghosh S (1995) *Cell*, **80**, 573-582.
- Verma IM, Stevenson JK, Schwarz EM, Van Antwerp D and Miyamoto S (1995) *Genes & Development*, **9**, 2723-2735.
- Wasserman SA (1993) *Molecular Biology of the Cell*, **4**, 767-771.
- Wilhansen KC, Eggleston K and Temin HM (1984) *J. Virol.*, **52**, 172-182.
- Wolfe SA, Zhou P, Dötsch V, Chen L, You A, Ho SE, Crabtree GR, Wagner G and Verdine GL (1997) *Nature*, **385**, 172-176.
- Zabel U and Baeverle PA (1990) *Cell*, **61**, 255-265.

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1: Rooted phylogenetic trees of Rel/NF- κ B transcription factors (A) and I κ B inhibitory proteins (B). (A and B left panel): Distance trees constructed by the Neighbor-Joining method (MUST), 1000 bootstrap replicates were performed on each set (expressed in % on the branch nodes). (A and B right panel): Parsimony trees constructed using the parsimony method (PAUP), 100 bootstrap replicates were performed. Subfamilies are indicated by brackets. The most internal branches in the trees allow to define the subfamilies.

FIGURE 2: Schematic representation of the topology and branching order of the subfamilies within the Rel/NF- κ B (A) and I κ B (B) families. Major structural and functional characteristic features of the different subfamilies are summarized in sketchings: Black boxes for ankyrin repeats; White box for Rel Homology Domain (RHD); S for serine and P for proline boxes; TA for transactivating domain; LZip for leucine zipper-like structure.

FIGURE 3: Evolutionary rate of the Rel Homology Domain and the ankyrin repeats of Rel/NF- κ B and I κ B proteins. Evolutionary rates are expressed in Poincaré units (10^{-9} mutations/site/year). The subfamilies are indicated by brackets.

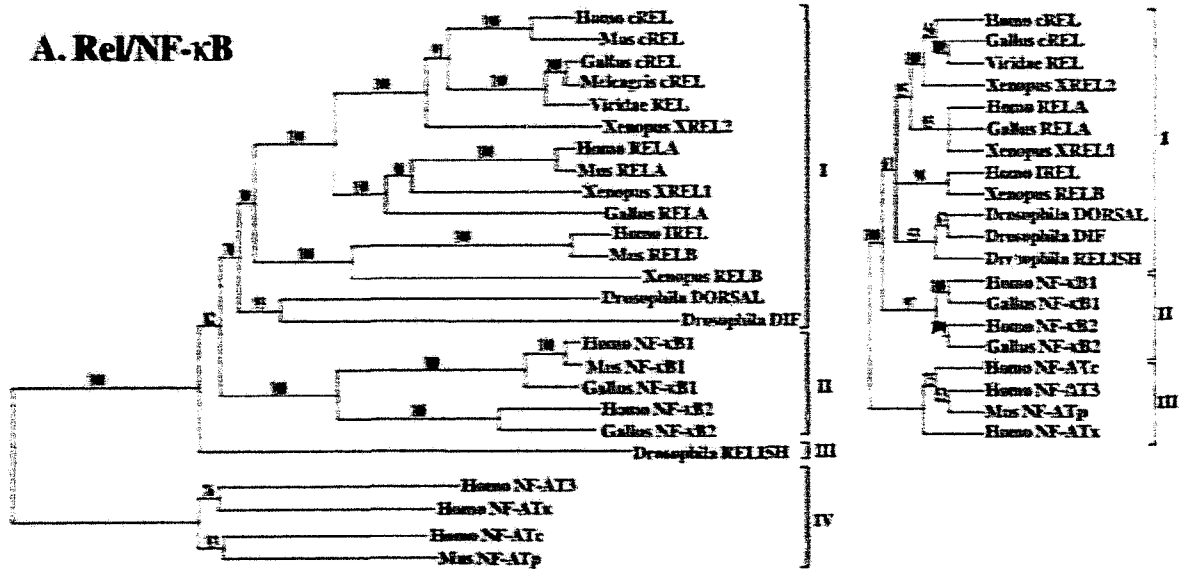
FIGURE 4: Models of evolution: (A) The transcription factors of the Rel/NF- κ B family: (I) RHD-ankyrin ancestral structure; (II) RHD ancestral structure. (B) The inhibitory proteins of the I κ B family. (C) Scenario of evolution of the Rel/NF- κ B and I κ B proteins from a common ancestor.

Gene species	Databank Accession	References
Rel/NF-κB Family		
Homo cRel	HSRNAREL / X75042	(Brownell et al., 1989)
Mus cRel	MMCRELM / X15842	(Grumont and Gerondakis, 1989)
Gallus cRel	GSP6SREL / X52193	(Capobianco et al., 1990)
Meleagris cRel	TKYREL09 / K02455	(Wilhemsen et al., 1984)
Viridae Rel	ACRREL / K00555 / X02759	(Wilhemsen, et al., 1984)
Xenopus Xrel2	XLREL2POR / Z49252	(Tannahill and Wardle, 1995)
Homo RelA	HUMP65NFKB / M62399	(Ruben et al., 1991)
Mus RelA	MUSNFKP65 / M61909	(Nolan et al., 1991)
Xenopus Xrel1	XFLREL / M60785	(Kao and Hopwood, 1991)
Gallus RelA	CHKNFKB2 / D13721	(Ikeda et al., 1993)
Homo Irel	HUMIRELA / M83221	(Ruben et al., 1992a)
Mus RelB	MUSRELB / M83380	(Ryseck, et al., 1992)
Xenopus RelB	XLRELB / D63332	(Suzuki, et al., 1995)
Drosophila Dorsal	DRODORSAL / M23702	(Steward, 1987)
Drosophila Dif	DRODIF / L29015	(Ip et al., 1993)
Homo NF- κ B1	HUMNFKB34 / M55643 / M37492	(Kieran et al., 1990)
Mus NF- κ B1	MUSTFDBS / M57999 / M37732	(Ghosh et al., 1990)
Gallus NF- κ B1	CHKP105A / M86930	(Capobianco et al., 1992)
Homo NF- κ B2	S76638	(Bours et al., 1992)
Gallus NF- κ B2	U00111	(Sif and Gilmore, 1993)
Drosophila Relish	U62005	(Dushay, et al., 1996)
NF-AT Family		
Homo NF-AT3	HUMNFAT3A / L41066	(Hoey et al., 1995)
Homo NF-AT4	HUMHFAT4A / L41067	(Hoey, et al., 1995)
Homo NF-ATx	HSU14510 / U14510	(Masuda et al., 1995)
Homo NF-ATc	HSU08015 / U08015	(Northrop et al., 1994)
Mus NF-ATp	MMU02079 / U02079	(McCaffrey et al., 1993)
IκB Family		
Homo NF- κ B1	HUMNFKB34 / M55643 / M37492	(Kieran, et al., 1990)
Mus NF- κ B1	MUSTFDBS / M57999 / M37732	(Ghosh, et al., 1990)
Gallus NF- κ B1	CHKP105A / M86930	(Capobianco, et al., 1992)
Homo NF- κ B2	S76638	(Bours, et al., 1992)
Gallus NF- κ B2	U00111	(Sif and Gilmore, 1993)
Drosophila Relish	U62005	(Dushay, et al., 1996)
Homo I κ B α	HUMMAD3A / M69043	(Haskill et al., 1991)
Sus I κ B α	SDECI6A / Z21968	(De Martin et al., 1993)
Rattus I κ B α	RRRLIF1 / X63594	(Tewari et al., 1992)
Gallus I κ B α	CHKPP40	(Davis et al., 1991)
Drosophila Cactus	DROCACTUS / L04964	(Geisler et al., 1992)
Mus I κ B β	MMU19799 / U19799	(Thompson, et al., 1995)
Homo Bcl-3	HUMBCL3AA / M31732	(Ohno et al., 1990)
Ankyrin Family		
Homo Ankyrin	HUMANK / M28880	(Lambert et al., 1990)
Mus Ankyrin1	MMANK1AA / X69063	(Birkenmeier et al., 1993)
Drosophila Ankyrin	DROANKY / L35601	(Dubreuil and Yu, 1994)

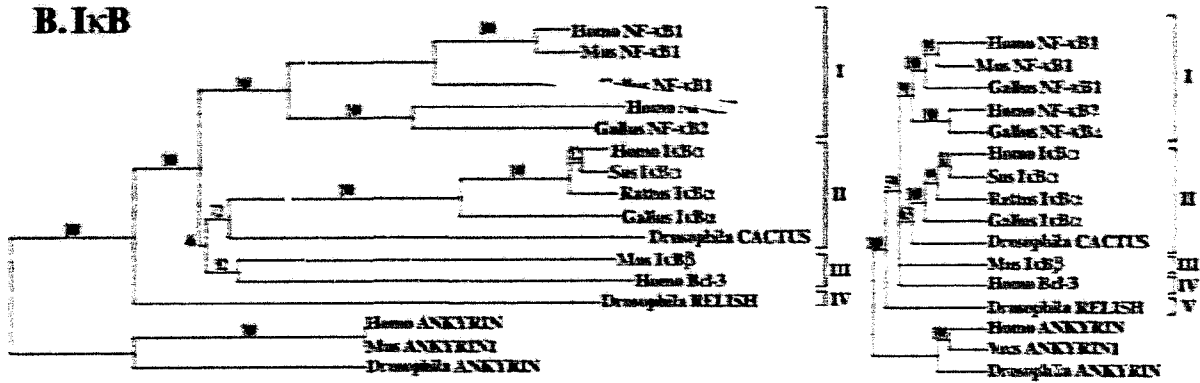
Table 1: Sequences used in this study. For each sequences, the Genbank code and the accession number, when different, were given as well as the reference. The sequences are given in the order of the distance trees (figure 1 left panel).

FIGURE 1: Rooted phylogenetic trees of Rel/NF- κ B transcription factors (A) and I κ B inhibitory proteins (B) (A and B left panel): Distance trees constructed by the Neighbor-Joining method (MUST), 1000 bootstrap replicates were performed on each set (expressed in % on the branch nodes). (A and B right panel): Parsimony trees constructed using the parsimony method (PAUP), 100 bootstrap replicates were performed. Subfamilies are indicated by brackets. The most internal branches in the trees allow to define the subfamilies.

A. Rel/NF- κ B



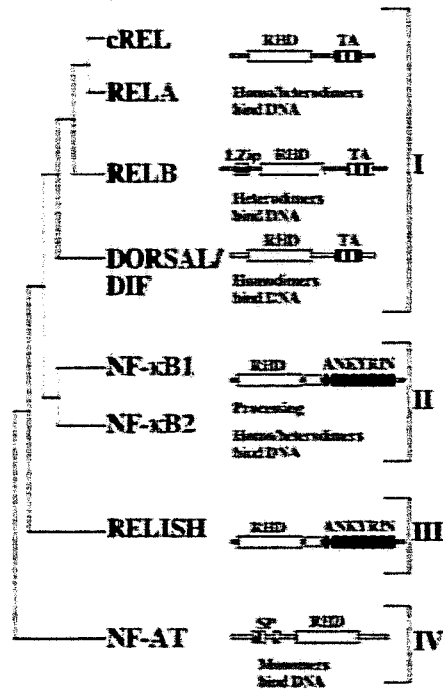
B. I κ B



BUGNET et al., Figure 1

FIGURE 2: Schematic representation of the topology and branching order of the subfamilies within the Rel/NF- κ B (A) and I κ B (B) families. Major structural and functional characteristic features of the different subfamilies are summarized in sketchings: Black boxes for ankyrin repeats; White box for Rel Homology Domain (RHD); S for serine and P for proline boxes; TA for transactivating domain; LZip for leucine zipper-like structure.

A. Rel/NF- κ B



B. I κ B

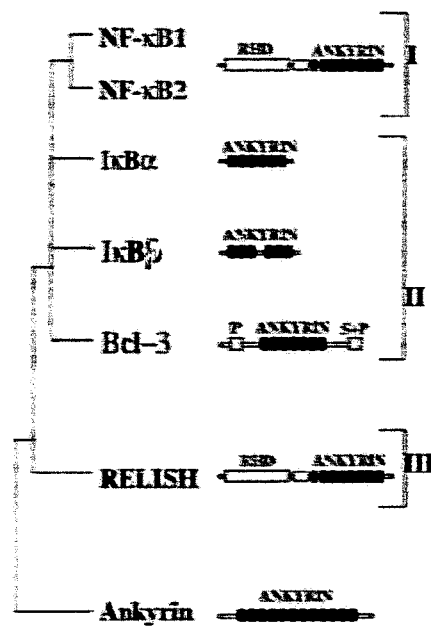
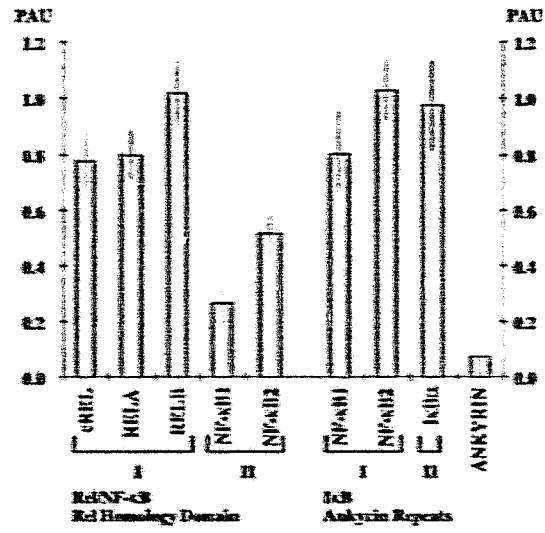


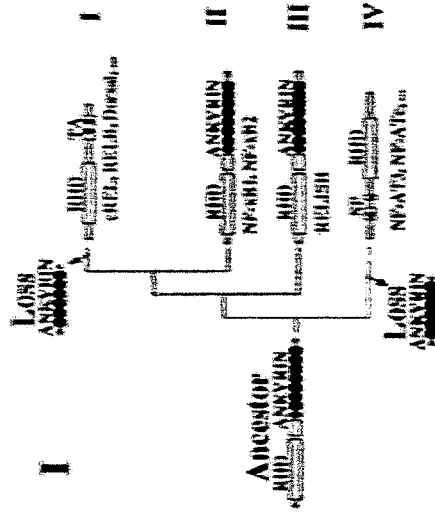
FIGURE 3: Evolutionary rate of the Rel Homology Domain and the ankyrin repeats of Rel/NF- κ B and I κ B proteins. Evolutionary rates are expressed in Pauling units (10^{-9} mutations/site/year). The subfamilies are indicated by brackets.



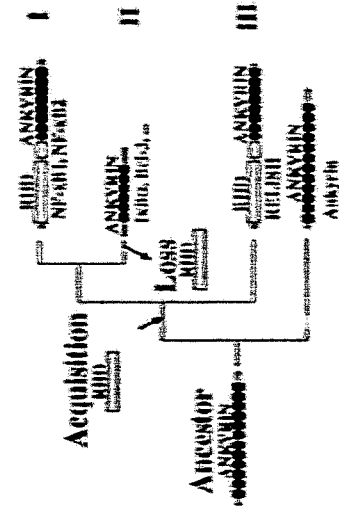
HUGUET et al, Figure 3

FIGURE 4: Models of evolution: (A) The transcription factors of the Rel/NF- κ B family: (I) RHD-ankyrin ancestral structure; (II) RHD ancestral structure. (B) The inhibitory proteins of the I κ B family. (C) Scenario of evolution of the Rel/NF- κ B and I κ B proteins from a common ancestor.

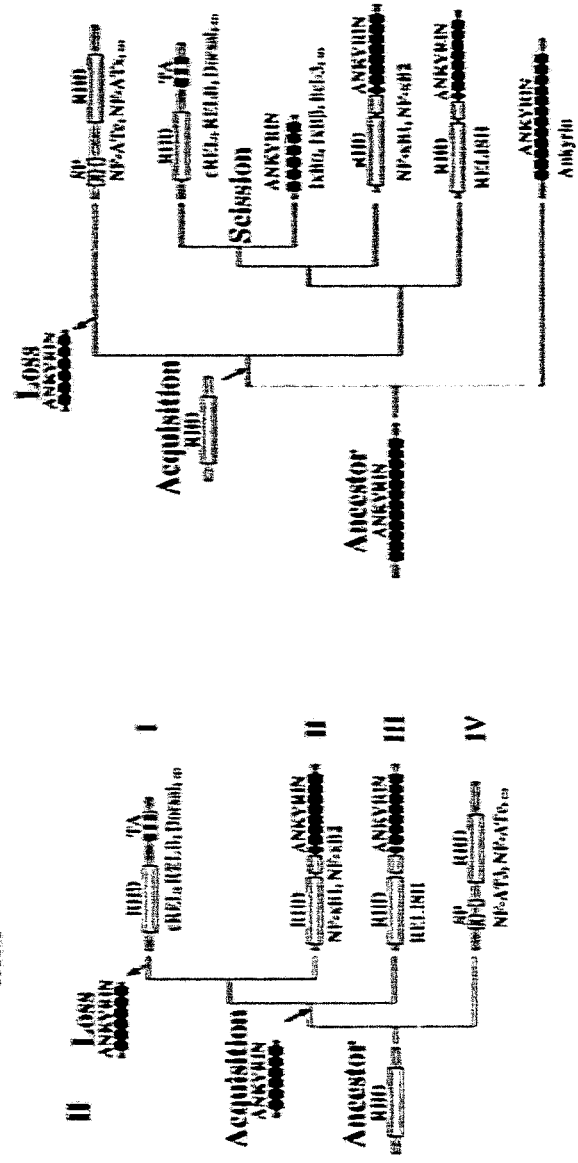
A. Rel/NF-κB Family



B. IκB Family



C. REL/NF-κB/IκB superfamily



1.4. Discussion

Dans l'étude qui vient d'être présentée, on a pu définir une organisation en sous-familles constituées de groupes de protéines pour les deux familles Rel/NF- κ B et I κ B. Cette organisation reflète parfaitement les propriétés structurales et fonctionnelles des différentes protéines. Mais revenons tout d'abord sur quelques cas particuliers de cette étude.

1.4.1 Les cas particuliers

Par cette étude nous confirmons des résultats déjà présentés dans la littérature. Les protéines qui forment un groupe représentent des espèces issues de gènes homologues, *Homo* I-Rel est l'homologue de *Mus* RelB et *Xenopus* RelB (Ruben et al., 1992; Suzuki et al., 1995), de même *Xenopus* Xrel1 est l'homologue des protéines RelA et non pas c-Rel comme il avait été suggéré lors de sa caractérisation (Kao and Hopwood, 1991).

Nous sommes par contre en désaccord avec une étude qui décrit *Xenopus* Xrel2 comme n'étant probablement pas l'homologue de *Mus* et *Gallus* c-Rel sur la base de leur divergence dans leur partie C-terminale (Tannahill and Wardle, 1995). D'une part, ce n'est pas un cas isolé dans la famille Rel/NF- κ B, car presque tous ses membres sont divergents dans leur partie C-terminale. D'autre part, les caractéristiques des membres de cette famille, hormis de moduler la transcription, sont de fonctionner en dimère, de reconnaître les différentes versions des sites κ B spécifiques et d'être spécifiquement inhibés par les protéines I κ B. Toutes ces propriétés sont abritées dans le RHD, c'est pourquoi nous sommes enclin à penser que les variations même subtiles dans ce domaine confèrent à chacun des membres Rel/NF- κ B sa spécificité. Par conséquent, une forte identité dans le domaine RHD démontre clairement que ces protéines sont issues de gènes homologues. Puisque les deux méthodes utilisées dans cette étude phylogénétique groupent Xrel2 avec les protéines c-Rel avec de fortes valeurs de bootstrap, nous les considérons comme des protéines homologues.

En règle générale, les protéines homologues à l'intérieur d'un groupe sont agencées dans l'ordre de divergence des espèces : l'homme et la souris sont les plus proches, puis

viennent les oiseaux et le xénope. Dans la famille Rel/NF- κ B, *Gallus RelA* est plus éloigné que *Xenopus RelA* de *Homo RelA*. Les identités dans le RHD étant fortes et cet agencement retrouvé par les deux méthodes de reconstruction, il reflète une accélération de l'évolution de l'espèce *Gallus RelA*, comme en témoigne la vitesse d'évolution de *Gallus RelA* plus élevée par exemple que celle de *Gallus c-Rel*, plutôt qu'il ne définit *Gallus RelA* comme fondateur d'un nouveau groupe paralogue.

Enfin, abordons le cas de Relish qui représente la seule espèce à ne pas être classée de la même manière en parcimonie et en distance. En méthode de parcimonie, Relish est groupée avec les autres protéines de drosophile, cependant la valeur de bootstrap de ce branchement n'est que de 53%. L'arbre de distance montre que Relish est également distant de tous les membres Rel/NF- κ B avec un branchement soutenu à 82%. Ce dernier résultat est en accord avec une étude phylogénétique des séquences du RHD réalisée avec une autre méthode de reconstruction et publiée lors de la caractérisation de Relish (Dushay et al., 1996). Notre étude montre en plus que, quelque soit le domaine que l'on interroge, RHD ou ankyrines, Relish semble avoir divergé avant toutes les autres protéines. Nous favorisons donc l'arbre de distance et la position de Relish comme définissant une sous-famille différente.

1.4.2. La famille Rel/NF- κ B

Parmi les protéines Rel/NF- κ B de la sous-famille I, les plus proches sont c-*Rel* et *RelA* qui présentent une structure de base commune RHD-domaine de transactivation acide et lient l'ADN en homo- ou hétérodimères. Ensuite vient le groupe *RelB* qui présente en plus de cette structure de base un domaine transactivateur du type glissière à leucine en amont du RHD. De plus il ne lie l'ADN qu'en hétérodimère avec p50 ou p52 (Ruben et al., 1992; Ryseck et al., 1992; Dobrzanski et al., 1993; Suzuki et al., 1995). Le troisième groupe est composé de *Dorsal* et *Dif* avec la même structure de base mais qui lient l'ADN en homodimères seulement *in vivo*. Le groupe *Dorsal/Dif* est composé de gènes issus d'une duplication spécifique de la lignée des arthropodes. La boucle de régulation de *Dorsal* et *Dif* par *Cactus* est homologue à celle des protéines Rel/NF- κ B des vertébrés (Miyamoto and Verma, 1995; Suzuki et al., 1995) et la

spécificité d'interaction avec Cactus induite par la région I du RHD (Tatei and Levine, 1995). Dorsal est plus impliqué dans le développement (Steward, 1987) et Dif dans la défense immunitaire (Ip et al., 1993), alors que chez les vertébrés tous les facteurs participent aux différentes fonctions et régulent entre autre la réponse immunitaire (cf introduction 5). Comme chez les arthropodes les protéines fonctionnent en homodimères seulement, il semble que la capacité d'hétérodimérisation soit due à une divergence des protéines de vertébrés, RelB ayant divergé au point de ne plus pouvoir homodimériser et être capable de ne former des hétérodimères qu'avec p50 et p52. Cette propriété aurait permis d'étendre les capacités des quelques facteurs de transcription Rel/NF- κ B à la régulation de nombreux gènes cibles dans un nombre également très important de types cellulaires. Nos résultats suggèrent également que la spécificité de chacun des groupes dans la sous-famille I a été acquise après duplication d'un ancêtre commun et modulée dans chaque espèce.

La sous-famille II rassemble les précurseurs NF- κ B1 et NF- κ B2 qui chacun définissent un groupe. La communauté de structure et de régulation de ces protéines est évidente (cf. introduction 2.1.), de plus les gènes *nfkb1* et *nfkb2* présentent une organisation très proche, en terme de position des introns et des exons (Frachinella et al., 1993; Héron et al., 1995). Cependant, chacune de ces protéines présente des spécificités distinctes qui expliquent l'avantage sélectif de maintenir les deux copies d'un gène après duplication. Leurs particularités, par exemple leurs affinités différentes pour les sites κ B (Neri et al., 1991), ont été acquises par divergence après la duplication dans la lignée des vertébrés.

Relish, qui définit la sous-famille III, présente la même structure que NF- κ B1 et NF- κ B2 mais semble avoir divergé avant toutes les autres protéines y compris Dorsal et Dif, définissant ainsi une nouvelle sous-famille.

A défaut de tout autre groupe de référence, les facteurs NF-AT ont été choisis pour constituer le groupe externe, bien qu'ils puissent être considérés comme membres distants de la famille Rel/NF- κ B. Bien qu'ils ne partagent pas les fonctions de dimérisation, liaison aux sites κ B et inhibition par les I κ B, ce sont également des facteurs de transcription qui restent cytoplasmiques en attendant une stimulation cellulaire qui va provoquer leur déphosphorylation et leur migration dans le noyau où ils régulent des gènes de cytokines comme l'IL-2 (Jain et al.,

1995; Chytil and Verdine, 1996). Plus récemment, l'analyse par cristallographie aux rayons X de NF-ATc a démontré qu'il adoptait le même repliement que le RHD de p50 en liaison à l'ADN (Wolfe et al., 1997). Les quatre gènes NF-AT sont également issus d'une duplication probablement dans la lignée des vertébrés mais d'une version ancestrale qui a divergé très tôt de celle des autres Rel/NF- κ B. Il serait intéressant de rechercher des gènes homologues de ces protéines chez les arthropodes pour les comparer à Dorsal et Dif.

1.4.3. La famille I κ B

Comme pour la famille Rel/NF- κ B, notre définition des groupes et sous-familles reflète bien les particularités structurales et fonctionnelles de leurs membres. L'analyse des arbres de distance et parcimonie et des votes de résolution démontre clairement que les trois sous-familles partagent des motifs ankyrines I κ B spécifiques et sont aussi distantes les unes que les autres du groupe de référence des ankyrines érythroïdes. Les caractéristiques prédominantes de ces protéines I κ B sont d'inhiber les facteurs Rel/NF- κ B et de subir des régulations communes impliquant des phosphorylations, l'ubiquitination et la dégradation par le protéasome (cf. introduction 2.2; 3; 4.1).

Relish représente à nouveau un membre ayant divergé plus tôt que tous les autres. Notre étude montre que les motifs ankyrine et le RHD fournissent la même information, à savoir la divergence de Relish avant les protéines NF- κ B1 et NF- κ B2. Le rôle d'inhibiteur I κ B pour Relish est probable car nos résultats montrent qu'il possède des motifs ankyrine de type I κ B.

Les protéines NF- κ B1 et NF- κ B2 font partie de la sous-famille I et sont issues de gènes paralogues. Rappelons qu'elles présentent toutes deux la même organisation en domaines protéiques et les mêmes spécificités d'interaction avec p50 et p52 (cf. introduction. 1.; 2.). Les structures génomiques de *nf κ b1* et *nf κ b2* sont très proches mais elles sont également proches des gènes *iba* et *bc1-3* pour la partie des motifs ankyrine (Ito et al., 1995), ce qui suggère encore plus fortement l'existence d'un gène ancestral commun pour ces protéines.

Les I κ B courtes enfin sont représentées dans une large sous-famille II. Son premier groupe est constitué des I κ B α qui présentent six motifs ankyrine suivis d'une région acide

PEST et interagissent préférentiellement avec c-Rel et RelA. Ces protéines, en plus de la fonction de rétention cytoplasmique de toutes les I κ B, présentent la propriété de mettre fin à l'activité transcriptionnelle des facteurs Rel/NF- κ B et de les ramener dans le cytoplasme. Cactus est l'homologue de drosophile d'I κ B α . Elle diffère cependant des autres I κ B α car elle n'utilise pas son domaine acide pour interagir avec Dorsal (Kidd, 1992).

Le deuxième groupe est représenté par I κ B β dont la structure et la régulation sont proches de celle d'I κ B α avec six motifs ankyrine et une séquence acide et qui permet également l'interaction préférentielle avec c-Rel et RelA. Cependant I κ B β ne semble pas subir la boucle de régulation et présente une fonction spécifique d'allongement de la durée de l'activité transcriptionnelle des facteurs Rel/NF- κ B à l'inverse d'I κ B α , ce qui la aussi justifie le maintien de protéines très semblables issues de la duplication d'un gène ancestral commun.

Le dernier groupe est constitué de Bcl-3 qui possède également six motifs ankyrine mais aussi un septième incomplet qui pourrait remplacer la séquence acide absente dans cette protéine et nécessaire à une bonne interaction avec les protéines Rel/NF- κ B liées à l'ADN. Mais comme nous l'avons vu Bcl-3 représente vraiment un cas particulier car elle possède également des capacités de transactivateur et en fait n'inhibe pas les facteurs Rel/NF- κ B. Au cours de l'évolution, le maintien des propriétés des motifs ankyrine I κ B lui ont permis de préserver une bonne interaction avec les protéines p50 et p52 libres ou liées à l'ADN. Bcl-3 interagit spécifiquement avec p50 et p52 et en cela ressemblerait plutôt à NF- κ B1 et NF- κ B2. Une autre analyse phylogénétique en méthode de distance classe d'ailleurs Bcl-3 dans une sous-famille indépendante plus proche de NF- κ B1 et NF- κ B2 que d'I κ B α (Ito et al., 1995). Cependant dans notre étude, les deux méthodes utilisées définissent Bcl-3 plutôt comme plus distante de NF- κ B1 et NF- κ B2, et appartenant à la grande sous-famille II des I κ B courtes. Ces différences peuvent provenir soit de la méthode utilisée pour reconstruire les arbres à partir des matrices de distance, soit de la différence de taille de l'échantillon analysé, en effet notre étude analyse un plus grand nombre de séquences pour chaque type de protéine.

1.4.4. La superfamille Rel/NF- κ B/I κ B

En se basant sur la topologie des arbres obtenus pour chaque famille, nous pouvons proposer différents modèles d'évolution pour les domaines contenus dans les protéines Rel/NF- κ B. Les précurseurs contenant à la fois le RHD et les ankyrines, deux modèles s'offrent à nous.

Le premier modèle propose une structure ancestrale plésiomorphique de type RHD-motifs ankyrine. Dans ce cas deux événements indépendants de perte du domaine ankyrine surviennent, l'un très tôt pour donner les NF-AT et l'autre plus tard pour donner la sous-famille I des Rel/NF- κ B courtes, il s'agit d'un phénomène de symplesiomorphie de ces protéines, c'est à dire qu'elles ont conservé en commun le caractère ancestral RHD mais ont évolué sur des branches différentes. Les NF- κ B longues et Relish conservent quant à elles la structure ancestrale. Relish diverge avant la duplication des NF- κ B et avant la perte des motifs ankyrine de la sous-famille I.

Le second modèle part d'un RHD ancestral qui se duplique et évolue d'un côté pour donner les NF-AT et de l'autre acquière un domaine à motifs ankyrine pour former la version ancestrale des Rel/NF- κ B RHD-motifs ankyrine. De cette version divergent très tôt Relish pour la sous-famille III puis les NF- κ B pour la sous-famille II tout en conservant la structure RHD-motifs ankyrine. Les Rel/NF- κ B courtes évoluent quant à elles vers la sous-famille I à partir de la version RHD-motifs ankyrine en perdant ces motifs et en gagnant un domaine de transactivation à la place. Il s'agit d'un phénomène de synapomorphie des Rel/NF- κ B courts par rapport aux NF- κ B longues, c'est à dire qu'elles conservent comme caractère commun le RHD ancestral.

Ces deux modèles sont également parsimonieux, car ils mettent en jeu, tous les deux, des événements d'insertion/délétion de larges domaines. L'évolution des NF- κ B au sein des I κ B nous aidera à définir lequel de ces modèles est le plus favorable.

Toutefois sur la base des arbres obtenus, on peut proposer un modèle d'évolution des protéines I κ B au sein des protéines à motifs ankyrine. Des domaines ankyrine existant aussi

bien chez les nématodes (Fujita et al., 1993) que chez les levures (résultats de recherche Fasta, non présenté) alors que nous n'avons pas pu découvrir d'homologue du RHD dans ces espèces (résultats de recherche Fasta, non présenté), il semble que le motif le plus ancestral soit les ankyrines. Les différentes I κ B divergent donc des motifs ankyrine ancestraux et ont acquis le RHD plus tard au cours de l'évolution. Cette version fusionnée ancestrale se duplique et donne naissance à Relish qui diverge très tôt en conservant la structure ancestrale et à une version ancestrale des NF- κ B. Cette dernière se duplique à nouveau pour donner les NF- κ B sous-famille I qui conservent la structure ancestrale et à une I κ B courte ancestrale qui perd le RHD. Ce modèle est bien en faveur d'une large sous-famille II monophylique englobant I κ B α , I κ B β et Bcl-3, c'est à dire que ces protéines se ressemblent toutes plus entre-elles qu'elles ne ressemblent à une protéine à motifs ankyrine d'une autre sous-famille.

A présent considérant que i) Relish et les NF- κ B créent un lien véritable entre les deux familles; ii) Les NF- κ B et les Rel/NF- κ B courtes ont un ancêtre commun; iii) Les NF- κ B et I κ B courtes ont un ancêtre commun; il est tentant de réunir les familles Rel/NF- κ B et I κ B en une seule et de définir un ancêtre unique. Dans cette hypothèse d'ancêtre unique, il nous faut réunir les modèles d'évolution des deux familles ce qui nous amène à favoriser le modèle I d'évolution des Rel/NF- κ B à partir d'un ancêtre RHD-motifs ankyrine.

Nous définissons ainsi comme ancêtre commun, un domaine à motifs ankyrine qui se duplique pour donner naissance d'un côté aux protéines à motifs ankyrine non-I κ B et de l'autre côté à une version qui va acquérir un RHD ancestral et former le RHD-motifs ankyrine primitif. Cette version primitive, en se dupliquant, donne d'un côté une version qui perd très tôt les motifs ankyrine et conduit aux protéines NF-AT et de l'autre une version qui conserve sa structure ancestrale RHD-motifs ankyrine. Cette dernière, en se dupliquant, donne la sous-famille Relish qui diverge tôt et une version ancestrale, qui se duplique encore, pour donner la sous-famille NF- κ B et une version qui en un unique événement de scission crée la famille des courtes Rel/NF- κ B et la famille des courtes I κ B.

Le modèle proposé est particulièrement parsimonieux car trois événements sont nécessaires pour obtenir toutes les espèces de protéines : un premier événement d'acquisition

d'un RHD, une perte des motifs ankyrine chez les NF-AT et une scission. Il explique les préférences d'interactions des IκB courtes avec les Rel/NF-κB courtes qui figurent leur partie N-terminale ancestrale, comme NF-κB1 et NF-κB2 préfèrent lier p50 et p52, leur partie N-terminale mature. Un modèle d'évolution convergente ou encore de co-évolution des familles est beaucoup moins parcimonieux car il applique des contraintes d'évolution fortes sur les motifs ankyrine, d'une part pour acquérir les caractéristiques IκB et d'autre part pour interagir préférentiellement avec certains facteurs Rel/NF-κB. En comparaison, notre modèle d'évolution au sein d'une même famille Rel/NF-κB/IκB expliquerait les interactions sophistiquées et les régulations complexes des facteurs Rel/NF-κB et IκB ainsi que les fortes identités dans les domaines ankyrine des NF-κB et des IκB courtes.

2. c-Rel : un facteur de transcription multifonctionnel

L'article de revue qui est présenté ici faisait le point en 1994 des connaissances acquises sur les fonctions physiologiques de c-Rel et en particulier de la protéine c-Rel aviaire en comparaison avec son homologue viral v-Rel.

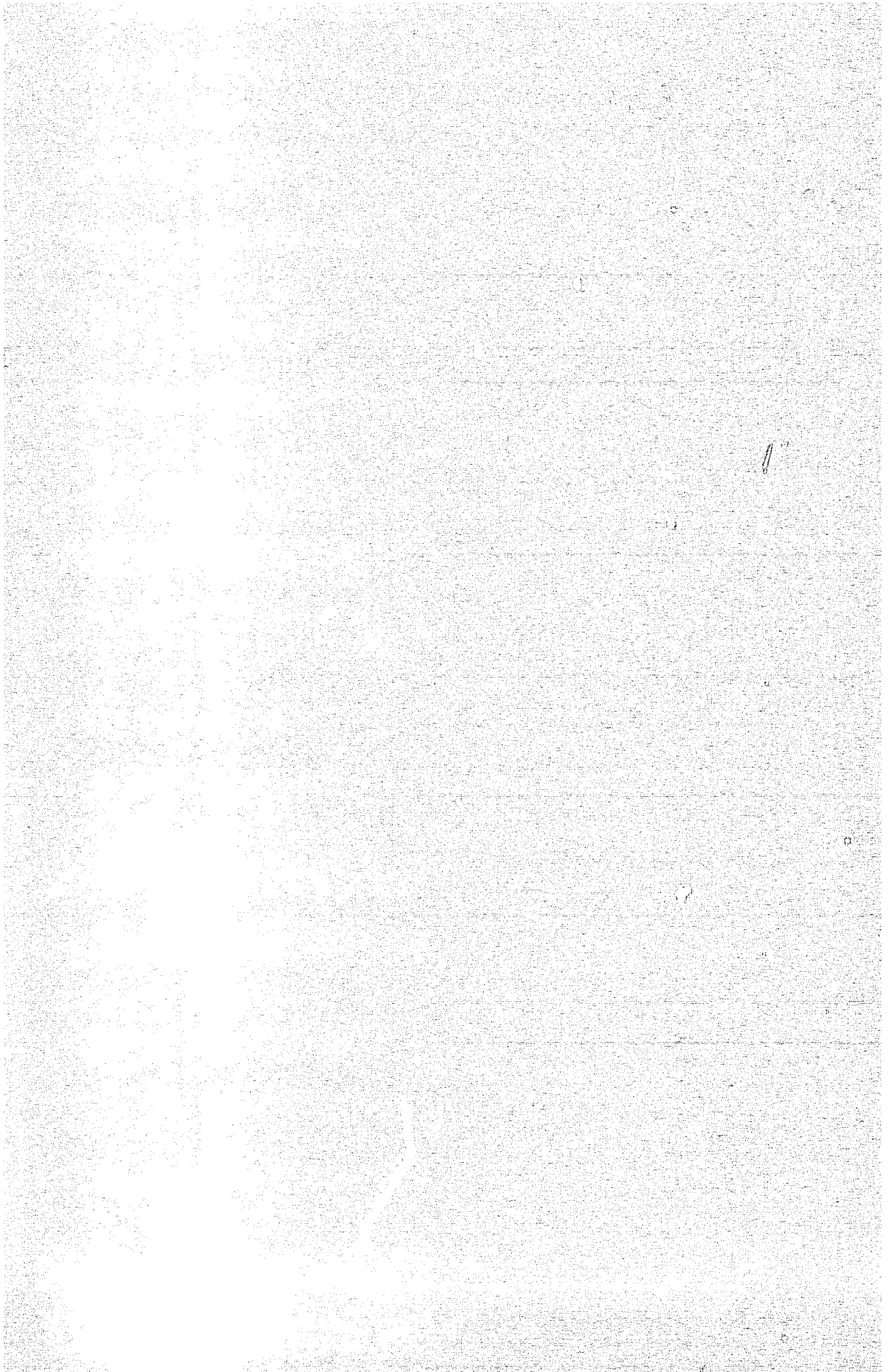
2.1. Résumé de la revue

Le gène *c-rel* est exprimé essentiellement dans des tissus et des lignées cellulaires lymphoïdes et myéloïdes chez la souris et le poulet. Chez l'homme, des altérations de *c-rel* sont liées à des phénomènes de cancérisation de lignées lymphoïdes. REV-T, le rétrovirus qui contient v-Rel, cible des cellules lymphoïdes et myéloïdes matures ou immatures et provoque leur transformation. Lorsque la protéine c-Rel aviaire est surexprimée à l'aide de vecteurs rétroviraux, elle induit la transformation de fibroblastes embryonnaires, moins efficacement cependant que v-Rel. Par contre, la protéine c-Rel aviaire surexprimée de la même manière induit l'apoptose de cellules de moelle osseuse quand v-Rel les transforme. *In vivo*, les ARN messagers de c-Rel sont surexprimés dans des cellules apoptotiques de différentes origines embryonnaires au cours du développement précoce de l'embryon de poulet. En comparaison, v-Rel est capable de protéger des lymphocytes B qu'il transforme de l'apoptose induite par radiation ou par traitement à la dexaméthasone.

L'effet transformant de v-Rel peut donc être expliqué de deux manières : i) v-Rel qui ne possède pas de domaine transactivateur puissant lie les mêmes gènes cibles que c-Rel mais en bloque la transcription; ii) v-Rel qui est quand même capable d'activer la transcription lie les mêmes gènes cibles que c-Rel et les active en dehors de toute régulation car v-Rel est une forme mutée de c-Rel présentant notamment des mutations ponctuelles dans le RHD.

Les gènes cibles identifiés pour c-Rel et v-Rel sont des gènes du MHC de classe I et II, le récepteur à l'IL-2, la laminine et la protéine de choc thermique HSP47. v-Rel induit également l'expression de la protéine hMG14 dans des cellules de moelle osseuse transformées.

ARTICLE 2



C-Rel: a multifunctional transcription factor ?

Christelle Huguet,¹ Paula Enrietto,² Bernard Vandembunder¹ and Corinne Abbadie¹

¹ Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité de Recherche Associée 1163, Institut Pasteur de Lille, 1 rue Calmette, 59019 Lille cedex, France

² Department of Microbiology, State University of New York at Stony Brook, Stony Brook, NY 11794, USA

Received 24.6.94, accepted 17.7.94

Edited by G. McInn

Introduction

The behaviour of a cell with regard to division, differentiation and death seems to be regulated by common molecular events. For example, the *c-myc* oncogene, which had previously been demonstrated to induce cell proliferation, has recently been shown to cause cell death by apoptosis. When *c-myc* is overexpressed in Rat-1 fibroblasts cultured in high serum, cells proliferate, whereas, in reduced serum conditions, cells undergo apoptosis (Evan *et al.*, 1992). A dual function in apoptosis and differentiation has been suggested for the tumour suppressor gene *p53*. Introduction of wild-type *p53* into murine myeloid leukaemic cells that lack *p53* results in rapid cell death in a manner characteristic of apoptosis. This effect is counteracted by interleukin-6 (Yonish-Rouach *et al.*, 1991). Moreover, down-regulation of wild-type *p53* activity negatively interferes with apoptosis induced by IL-3 withdrawal in IL-3-dependent hematopoietic cells (Gottlieb *et al.*, 1994). Alternatively, in pre-B cells, wild-type *p53* induces cell differentiation (Shaulsky *et al.*, 1991).

In vivo experiments have also suggested that cells might shift from a proliferation to a differentiation or a death program. For example, during limb bud development, some cells of the interdigital mesenchyme proliferate next to others which die by apoptosis, leading to a progressive individualization of the digits. When a small fragment of the ectoderm overlying the presumptive interdigital mesenchyme is removed by microsurgery, apoptosis in the underlying mesenchyme is dramatically diminished and cells differentiate into ectopic cartilage (Hurtle and Ganan, 1986). This experiment indicates that interdigital mesenchymal cells are capable of proliferating as well as differentiating or dying. Their behaviour is probably under the control of external stimuli such as cytokines, cell-cell or cell-matrix contacts.

In this paper, we will review the physiological and molecular functions of the transcription factor c-Rel and show that it can induce proliferation, differentiation and cell death, depending on the extra- and intracellular environments.

Keywords: c-rel, oncogene, transcription factor, programmed cell death, transformation

The family of Rel/NF- κ B transcription factors

The *c-rel* protooncogene was isolated in 1983 as the cellular homologue of the viral oncogene found in the genome of the avian retrovirus REV-T (Chen *et al.*, 1983). Amongst target cells of the REV-T retrovirus are immature B cells, hence the name *rel* signifying REV lymphoid (Lewis *et al.*, 1981). The protein encoded by *v-rel*, *p59^{rel}*, and its chicken cellular homologue, *p68^{chick-rel}* were shown to be highly homologous in an N-terminal domain subsequently found in other transcription factors, such as the *Drosophila* developmental morphogen Dorsal (Steward, 1987) and all components of the ubiquitous transcription factor NF- κ B, the *p105*, *p100* (I κ B) and *p65* (Ghosh *et al.*, 1990; Kieran *et al.*, 1990; Neri *et al.*, 1991; Nolan *et al.*, 1991; Schmid *et al.*, 1991). Together with RelB, these proteins form the so-called Rel/NF- κ B family; all members (listed in Table 1) share a common N-terminal domain of about 300 amino acids termed the Rel homology domain (RHD). This domain contains sequences necessary for DNA binding to κ B sites, dimerization, nuclear localization and binding to the I κ B family of inhibitory proteins (listed in Table 2). The carboxy-terminal regions of the Rel/NF- κ B proteins are totally divergent; in chicken, mouse and human *c-Rel*, this region contains the major transactivating domain (reviewed in Gilmore, 1992) (Figure 1).

Upon stimulation, the NF- κ B transcription factor may be activated at a transcriptional or post-translational level. Indeed, in the majority of cells, the canonical NF- κ B heterodimer *p50/p65* is constitutively expressed in an inactive form which is retained in the cytoplasm by virtue of its association with I κ B, an ankyrin-repeat protein. Stimulation activates a biochemical cascade which results in the phosphorylation and degradation of I κ B. The transcription factor NF- κ B, thus released, may enter the nucleus and activate transcription through cis-acting κ B sites (reviewed in Blank *et al.*, 1992 and Liou and Baltimore, 1993). A homologous mechanism is involved in the regulation of chicken *c-Rel* function (Stams and Bose, 1992). Localized predominantly in the cytoplasm, *p68^{rel}* is associated in a high molecular weight complex with additional proteins of 40, 115 and 124 kDa (Morrison *et al.*, 1989; Davis *et al.*, 1990; Kochal *et al.*, 1991). The 40 kDa protein is phosphorylated and belongs to the I κ B family (Davis *et al.*, 1991; Kerr *et al.*, 1991). The 124 and 115 kDa proteins were shown to be homologous to the human proteins *p105* and *p100*, respectively, both of which are precursors to *p50* and *p50B* NF- κ B (Capobianco *et al.*, 1992; Sif and Gilmore, 1993). In their unprocessed form, these proteins possess ankyrin-repeats and, thereby, are able to bind to *c-Rel* and retain it in the cytoplasm, just as *pp40* does. After removal of their C-termini by proteolytic maturation, these proteins become *bona fide* components of NF- κ B, with DNA binding activity (Fan and Maniatis, 1991; Mercurio *et al.*, 1993).

- Kidd S (1992) Characterization of the thymic *c-myc* locus and analysis of interactions between *C-myc* and *D-myc* proteins. *Cell* 71:629-635
- Keran M, Bark V, Lugasi F, Verdelhovske J, Lengsch F, Le BD, Urban MB, Kurlitz P, Bazerre PA and Israel A (1990) The DNA binding subunit of NF- κ B is identical to factor KBF1 and homologous to the *rel* oncogene product. *Cell* 62:107-1016
- Kochel T, Mutsaers JF and Rice NR (1991) The κ -Rel and c-Rel proteins exist in high molecular weight complexes in avian and murine cells. *Oncogene* 6:515-525
- Kotaka J, Schaeuble JD, Bergmann W and Bose HRU (1994) Transformation of avian fibroblasts overexpressing the c-rel proto-oncogene and a variant of c-rel lacking 40 C-terminal amino acids. *J Virol* 68:2973-2983
- Kumar S, Ratsan AS and Selman C (1992) The RAR α Pro α motif conserved in all Rel-like proteins is essential for the DNA-binding activity and vector regulation of the κ -Rel oncogene. *Mol Cell Biol* 12:3294-3105
- Lewis RB, McDiave J, Rang B, Neezel DM, Gentry FF, Hieker JD, Kesterman MA and Bose HR (1991) A non-antibiotransformers virus identification of the heterologous target cell for transformation. *Cell* 65:421-431
- Leu HC and Baltimore D (1993) Regulation of the NF- κ B Rel transcription factor and its inhibitor system. *Oncogen* in cell biology 5:471-487
- Lu D, Thompson JD, Gushk GK, Rice NR, Meyer MS and Virts JJ (1991) Alterations at the *rel* locus in human lymphomas. *Oncogene* 6:1225-1231
- Merkon S, Murphy VV, Dale-Forsen R and Orngren RSK (1993) Overexpression of genes encoding the transcription factors c-Rel, NF- κ B, and NF- κ Bp25 and p12 by hyperimmune μ sea hybridomas. *Oncogene* 7:191-193
- McDaniel FC, Kumar S, Ratsan AS and Selman C (1992) Transcriptional activity of Rel family proteins. *Oncogene* 7:163-170
- Merrino F, DiDomen JA, Russett C and Klein W (1992) p125 and p58 precursor proteins play an active role in NF- κ B-mediated signal transduction. *Genes and development* 7:75-718
- More EE and Bose HU (1992) Transformation of avian fibroblast cells by retroviruses. *Methods Enzymol* 195:73-90
- More EE and Bose HR (1992) Expression of the c-rel and c-cyproto-oncogenes in avian tissues. *Oncogene* 4:845-852
- Murphy S, Buchheit G, Berg H and Everett PJ (1991) Expression of κ -rel in a Epstein-Barr virus transformed and transgenic chicken transformation. *Oncogene* 5:1637-1655
- Murphy S, Korman M, Mason S, Hayman MJ and Everett PJ (1992) κ -Rel and cellular Rel associate with cellular proteins in transformed and normal cells. *Oncogene* 4:571-583
- Murphy S, Szymanski H, Korman M, Kuznetsov T, Diamond S and Verma IM (1992) A lymphoid cell-specific nuclear factor containing κ -Rel-like proteins preferentially associates with retinoblastoma-13-related motifs whose activities are expressed in lymphoid cells. *Mol Cell Biol* 12:1735-1745
- Naraino FE, Thomas SL and Longo G (1991) Isolation of sequences strongly homologous to the 3'-end of the *c-myc* gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:5267-5269
- Neri A, Cheng DT, Landmark L, Saxe M, Conahan P, Mader R, Orngren RSK and Dale-Forsen R (1991) B cell lymphoma-associated chromosomal translocation involves candidate oncogene *prf1* homologous to NF- κ B p50. *Cell* 67:1173-1177
- Nolan GP and Baltimore D (1992) The regulatory region and activator Rel proteins. *Oncogen* in genetics and development 2:211-220
- Nolan GP, Gross S, Liu HC, Tengs P and Baltimore D (1991) DNA binding and κ B activation of the cloned p55 subunit of NF- κ B: a Rel-related polypeptide. *Cell* 64:931-939
- Olsen H, Takano S and Mochizuki T (1992) The candidate proto-oncogene *myb-5* is related to genes regulated in cell lineage determination and cell cycle control. *Cell* 69:591-597
- Olsen JD (1991) Histopathologic and hereditary changes in recurrent stages of ducts related with Tumor. *Am J Vet Res* 28:1507-1507
- Orngren RSK and Selman C (1991) κ -Rel is a nuclear member of the Rel family of transcriptional activating proteins. *J Virol* 65:3123-3130
- Rosen SM, Olson PJ, Schenk R, Herold T, Chen CH, Mether M, Bazerre PA and Rosen CA (1991) Isolation of a related human cDNA that potentially encodes the 65-kD subunit of NF- κ B. *Science* 251:1430-1433
- Rosen SM, Mander JF, Colbran RJ, Mether M, Chen CH and Rosen CA (1992) κ -Rel: a novel Rel-related protein that exhibits NF- κ B transcriptional activity. *Genes Dev* 6:745-750
- Rysack FF, Bull P, Takemura M, Bours V, Scharfetter U, Ohtsuka S-P and Bose HR (1992) RelB, a new Rel family transcription activator that can interact with p50 NF- κ B. *Mol Cell Biol* 12:574-584
- Selzer S and Glazer TD (1993) Transformation by κ -Rel oncogene requires sequences carboxy-terminal to the Rel homology domain. *Oncogene* 8:2245-2252
- Schindl RM, Perkins MD, Dornick GS, Andrews PD and Nabel GJ (1991) Cloning of an NF- κ B subunit which stimulates HIV transcription in synergy with p55. *Nature* 352:733-735
- Shoen M, Larose RN and Charbonin DM (1994) Avian lymphomas: 11 A virus of unusual latency and pathogenicity. *Avian Dis* 38:335-347
- Shawley G, Gatzinger A, Patel A and Riker W (1992) Inhibition of mid-type p53 in pre-B cell differentiation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:5222-5227
- Siz S and Glazer TD (1993) NF- κ Bp105 is one of the high-molecular-weight proteins associated with the κ -Rel transcription in transformed chicken spleen cells. *J Virol* 67:7610-7617
- Snyder RM, Roe NR, Hietson HL, Bose HRU and Klein W (1992) Nucleotide sequence of κ -rel, the oncogene of retinoblastoma virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:5226-5233
- Sprent AP (1991) Clonal expansion of primary genes in B-lymphoid stem cells: the variable proto-oncogene *c-myc*. *Cancer* 62:822-834
- Szymanski H and Bose HU (1992) Interacts with p53⁺ containing protein complexes following the stimulation of NF- κ B transcriptional lymphoid cells without. *Wokry* 122:755-777
- Tsai M, Ohtsuka S-P, Miao M, Ohtsuka DE, Hsu JG, Shiao B and Tsai H (1992) Rapid induction in regenerating liver of RelB-1 (p105) that exhibits NF- κ B, RelB-251, and c-Rel-p50) and p53, a novel κ B site-binding complex. *Mol Cell Biol* 12:2265-2273
- Thelen GM, Ziegel FF and MUI (1992) Biological studies with the *ras* gene (Strain T) that induces retinoblastomas in turkey, chicken and guinea pig. *Journal of the National Cancer Institute* 87:781-785
- Wahler MI, Stein B, Garich RA, Heitman JA, Kaufman RA, Scharfetter U, Herold T and Glazer TD (1992) The κ -rel oncogene targets to the mechanism of transcriptional activation, expression, and transformation. *J Virol* 66:5716-5723
- Watterson KL, Eggen J and Temin RM (1994) Nucleic acid sequences of the oncogene κ -rel in retinoblastomas virus strain T and its cellular homolog, the proto-oncogene *c-rel*. *J Virol* 68:1172-1182
- Wentworth E, Fershtsky D, Liden J, Sachs L, Kuroki A and Olsen M (1991) Multiple p53 induces apoptosis of epifol lymphoma cells that is inhibited by retinoblastoma-13. *Nature* 352:345-347
- Zandi D and Bazerre PA (1992) Purified human κ B can rapidly dissociate the complex of the NF- κ B transcription factor with its cognate DNA. *Cell* 61:255-265
- Zhang JY, Olson M, Ewald B, Bergmann W and Bose HR (1991) The κ -rel oncogene encodes retinoblastoma virus transforming and cellular lymphoid cells of the B cell lineage in vivo. *Wokry* 123:457-462

2.2. Evolution des connaissances sur la fonction physiologique de c-Rel

Peu après la publication de cette revue, paraissait une étude décrivant en détail l'expression du gène murin *c-rel* dans les organes hématopoïétiques au cours du développement. Dans l'embryon, les ARN messagers de *c-rel* sont détectés au niveau des foyers d'hématopoïèse, c'est à dire le foie foetal puis le thymus et la rate. A l'âge adulte cette distribution est conservée et s'étend aux centres germinatifs de la rate, aux ganglions lymphatiques et aux plaques de Peyer. La protéine c-Rel est exprimée dans les cellules épithéliales du thymus mais pas dans les thymocytes, dans les précurseurs érythroïdes du foie et dans les cellules B matures. Cette distribution de l'expression de *c-rel* renforce l'hypothèse d'une fonction de ce facteur de transcription dans le développement du système hématopoïétique. Cependant, déjà un fossé s'établit entre les fonctions putatives du gène *c-rel* aviaire qui s'exprime dans des cellules apoptotiques et le gène murin dont l'expression n'est en aucun cas corrélée à la survenue de l'apoptose au cours du développement de l'embryon de souris (Carrasco et al., 1994).

La description du phénotype des souris déficientes pour le gène *c-rel* a amené de nouveaux renseignements sur sa fonction. La fonction de c-Rel dans le système hématopoïétique est liée à la réponse immunitaire contrôlée par les cellules B et T matures et les macrophages mais pas au développement proprement dit du système immunitaire. Aucun défaut lié à une éventuelle modification du déroulement de l'apoptose n'est révélé dans les souris *c-Rel^{-/-}*. Des gènes cibles sont mis en évidence *in vivo* par ces expériences : l'IL-5, l'IL-3, l'IFN γ et le TNF α dans les cellules T et le GM-CSF, G-CSF, l'IL-6 et la NO synthétase dans les macrophages tissulaires (Köntgen et al., 1995; Geronziakis et al., 1996; Grigoriadis et al., 1996). Des études assez anciennes avaient déjà identifié l'IFN γ comme cible de c-Rel qui lie un site du type κB dans une région figurant un élément de réponse à l'IFN γ lui-même (Sica et al., 1992). La NO synthétase a également été désignée comme cible de c-Rel, grâce à l'analyse des complexes activant son promoteur dans des macrophages stimulés par le LPS (Xie et al., 1994). Le LPS induit aussi la liaison au promoteur du lysozyme aviaire de c-Rel et RelA dans des



macrophages. La surexpression de c-Rel et RelA produit le même effet, désignant le lysozyme comme gène cible putatif de c-Rel dans les macrophages de poulet (Phi Van, 1996).

Dans un autre contexte, l'analyse de l'expression des facteurs Rel/NF- κ B dans différentes populations de thymocytes fraîchement isolés montre que les thymocytes immatures doubles positifs expriment faiblement c-Rel qui est inductible dans ces cellules par le PMA ou l'ionomycine. Cette induction est bloquée par le FK506, une drogue immunosuppressive qui inhibe l'apparition des thymocytes simples positifs. Les thymocytes simples positifs matures expriment plus fortement c-Rel (Sen et al., 1995). Une autre équipe montre également que l'expression des ARN messagers c-Rel est augmentée dans les thymocytes doubles positifs en cours de maturation et dans les thymocytes simples positifs. D'autre part, une activation constitutive de complexes c-Rel/p50 et RelA/p50 accompagne le passage des thymocytes au stade simples positifs. Enfin, dans ces cellules, les complexes majoritairement activés en réponse au PMA contiennent c-Rel (Moore et al., 1995). Ces résultats impliquent c-Rel dans la maturation des thymocytes et l'associe plus particulièrement à la sélection positive.

Dans le même esprit, des expériences utilisant des précurseurs de lymphocytes B exprimant une forme dominante d'I κ B α , qui résiste à la dégradation et empêche à la fois l'activation de c-Rel et RelA, montrent que ceux-ci sont indispensables à l'expression et au réarrangement des gènes des chaînes κ des immunoglobulines (Scherer et al., 1996). Ces résultats indiquent que c-Rel et RelA peuvent présenter des fonctions redondantes qui sont compensées dans les souris déficientes pour l'un des facteurs par celui qui est toujours présent.

2.3. Evolution des connaissances sur le pouvoir transformant de v-Rel

v-Rel est une forme tronquée et mutée de la protéine c-Rel dont le gène a été transduit par le rétrovirus REV-T. En plus d'une délétion du domaine transactivateur, v-Rel présente plusieurs mutations ponctuelles dans le RHD.

De nouvelles cellules cibles de la transformation par v-Rel ont été décrites. Les cellules T de mammifère dans les souris transgéniques v-Rel (cf. introduction 5.2.1.5.), ainsi que des cellules précurseur de cellules dendritiques et de neutrophiles transformées par une protéine de

fusion v-Rel-récepteur aux œstrogènes (Boehmelt et al., 1995). Et nous allons voir dans le travail présenté ci-après que c-Rel est normalement exprimé dans des cellules précurseurs hématopoïétiques et dans des cellules dendritiques dans le thymus de poulet.

Une étude procédant par la rétroinjection des différentes mutations et délétions de v-Rel une à une dans une protéine c-Rel aviaire et l'analyse du pouvoir transformant de ces mutants exprimés chez de jeunes poussins à l'aide de vecteurs rétroviraux révèle l'importance relative des différents domaines dans le pouvoir oncogène de v-Rel (Hrdlickova et al., 1994). En effet, les mutations ponctuelles dans le RHD, domaine de liaison à l'ADN ou diminution, sont suffisantes pour rendre c-Rel oncogène, cependant l'association d'une délétion C-terminale augmente l'effet transformant. Les mutations dans le RHD modifieraient la liaison à l'ADN et l'interaction avec d'autres protéines comme I κ B α . Un autre aspect intéressant est que les mutants de délétion de l'extrémité C-terminale sont constamment nucléaires et induisent la retranscription d'une c-Rel sauvage. Ces mutants auraient un rôle de chaperon pour le transport nucléaire qui conduirait à l'activation des facteurs Rel/NF- κ B en absence de stimulation. Un dernier volet de cette étude montre que l'infestation de jeunes poussins avec un rétrovirus exprimant le gène *c-rel* sauvage conduit au développement de tumeurs de la rate. Les lignées tumorales isolées et analysées expriment toutes des marqueurs de cellules T et montrent une surexpression des gènes MHC classe I et II et IL-2R. De plus, chacune de ces lignées présente au moins une forme mutante de la protéine c-Rel avec une délétion en C-terminal, confirmant l'importance d'une délétion des séquences C-terminales dans le pouvoir transformant (Nehyba, 1994). De la même manière, la surexpression de c-Rel provoque le développement de *Thy1* positives embryonnaires de poulet mais moins efficacement qu'un mutant de délétion de la partie C-terminale de c-Rel ou que v-Rel (Krylova et al., 1994). Enfin, un mutant de la protéine v-Rel qui présente une séquence à la place d'une alanine à la position 40, proche du domaine de liaison à l'ADN dans le RHD, interagissait mieux avec l'ADN et transforme plus efficacement les cellules B (Romero and Hungarries, 1995).

Ces résultats nous montrent que le pouvoir transformant de v-Rel est lié à sa capacité à

lier l'ADN à modifier la transcription de gènes cibles de c-Rel et peut-être aussi à interagir avec

d'autres facteurs Rel/NF- κ B. Les exemples suivant illustrent l'importance de l'induction de l'expression de gènes de manière ectopique dans le pouvoir transformant de v-Rel.

v-Rel est capable d'activer directement la transcription du proto-oncogène *c-jun* (Fujii et al., 1996) ou de la protéine HMG14 qui favorise le démarrage de la transcription en interagissant avec la chromatine mais aussi la phase d'élongation via le complexe de transcription (Walker and Enrietto, 1996).

GM-GRASP, une molécule d'adhésion de la famille des immunoglobulines, est exprimée de façon ectopique par des cellules B transformées par v-Rel. La surexpression de c-Rel ou v-Rel dans des cellules lymphoïdes ou des fibroblastes embryonnaires induit aussi l'expression de GM-GRASP. Un traitement à l'aide d'anticorps dirigés contre GM-GRASP bloque la prolifération des cellules transformées par v-Rel (Zhang et al., 1995).

Une protéine membranaire glycosylée de 75 kD est exprimée dans des lignées myéloïdes et lymphoïdes transformées par v-Rel ainsi que dans des tissus aviaires myéloïdes et lymphoïdes infectés par REV-T. La surexpression de c-Rel à l'aide de vecteurs rétroviraux induit l'expression de cette p75 dans des lignées de cellules B matures. Cette expression ectopique de p75 dans les lignées lymphoïdes et myéloïdes pourrait être liée au pouvoir transformant de v-Rel (Zhang and Humphries, 1996).

3. Expression du proto-oncogène aviaire c-Rel *in vivo*

3.1. Introduction

L'introduction générale et la revue plus particulièrement consacrée à c-Rel, nous ont permis de définir son organisation en domaines fonctionnels, ses interactions avec les inhibiteurs I κ B, la boucle d'autorégulation à laquelle elle participe et ses régulations par phosphorylation, ainsi que de présenter ses fonctions et gènes cibles connus dans les différentes espèces. Ce qui suit a pour but de redéfinir rapidement le cadre dans lequel notre travail s'inscrit.

Des lymphomes humains sont liés à des réarrangements du gène *c-rel*. Le facteur de transcription c-Rel est exprimé dans les organes lymphoïdes et impliqué dans la réponse immunitaire chez la souris. La protéine murine c-Rel semble également jouer un rôle dans la sélection positive des cellules T au cours de leur maturation et le réarrangement des chaînes κ des immunoglobulines au cours de la maturation des cellules B.

Chez le poulet, des analyses par Northern blot révèlent que *c-rel* est également exprimé dans les organes hématopoïétiques, le thymus, la rate, la bourse de Fabricius et la moelle osseuse (Moore and Bose, 1989). Le pouvoir oncogénique de la protéine c-Rel aviaire a également été évoqué en comparaison avec celui de son homologue viral v-Rel dans les cellules lymphoïdes entre autres. Ces résultats suggèrent que la protéine c-Rel aviaire pourrait être impliquée elle aussi dans l'hématopoïèse, au niveau du développement des organes et des cellules lymphoïdes et/ou dans la réponse immunitaire. Une caractéristique supplémentaire et particulière à la protéine c-Rel aviaire est qu'elle peut inhiber l'apoptose de cellules de moelle osseuse. De plus, au cours du développement de l'embryon de poulet les ARN messagers *c-rel* sont fortement exprimés dans des cellules apoptotiques du mésenchyme interdigital, du système nerveux central mais aussi de tissus qui deviendront des foyers d'hématopoïèse comme la rate embryonnaire (Abbadie et al., 1993).

Si une fonction de la protéine c-Rel murine dans la réponse immunitaire *in vivo* est clairement établie, la signification de l'expression du gène *c-rel* dans les organes hématopoïétiques n'est pas définie. L'ensemble de ces résultats nous a conduit à étudier en détail l'expression du proto-oncogène *c-rel* dans le système hématopoïétique de poulet et en particulier au cours du développement embryonnaire du thymus. Cet organe définit comme modèle d'étude présente le double avantage d'abriter les différents stades de maturation des cellules T d'une part et des phénomènes d'apoptose liés à la sélection négative et positive de ces cellules d'autre part. Nous savons que les facteurs de transcription de la famille Rel/NF- κ B sont régulés au niveau de leur localisation subcellulaire par des interactions avec les protéines I κ B. I κ B α ayant un rôle prédominant dans l'inhibition de c-Rel et RelA. Le gène *ikba* aviaire est connu et la protéine aviaire I κ B α interagit avec c-Rel dans de nombreux types cellulaires; elle est également soumise à la boucle de régulation. Nous avons donc choisi d'étudier en parallèle l'expression de *c-rel* et de son inhibiteur *ikba* par hybridation *in situ* et de déterminer la localisation subcellulaire de la protéine c-Rel par immunohistochimie afin d'en déduire son statut d'activation dans les cellules où elle est exprimée.

Les résultats de cette étude sont présentés dans deux articles que nous analyserons séparément.

3.2 Expression du facteur de transcription c-Rel au cours du développement embryonnaire du thymus

3.2.1 Résumé de l'article

Dans ce travail, nous étudions plus particulièrement l'expression de c-Rel dans la lignée T et le stroma thymique au cours du développement embryonnaire du thymus.

Nos résultats montrent que les thymocytes en grande majorité n'expriment pas la protéine c-Rel. Par contre, les cellules précurseurs de lymphocytes qui colonisent le thymus expriment c-Rel peu après leur entrée dans l'organe et avant de commencer leur différenciation. Différentes lignées de cellules présentatrices d'antigènes expriment également la protéine c-Rel, il s'agit de cellules épithéliales, de cellules dendritiques et de macrophages.

L'étude de la distribution subcellulaire de c-Rel montre que la protéine est essentiellement cytoplasmique dans les cellules présentatrices d'antigènes mais qu'elle est à la fois cytoplasmique et nucléaire dans les cellules précurseurs de lymphocytes. La localisation cytoplasmique de c-Rel dans les cellules présentatrices d'antigènes est corrélée à une forte expression d'I κ B α , alors que sa répartition nucléaire et cytoplasmique dans les cellules précurseurs de lymphocytes est associée à une expression beaucoup plus faible d'I κ B α . La localisation partiellement nucléaire de c-Rel dans les précurseurs de lymphocytes suggère une activation constitutive dans ces cellules.

ARTICLE 3

The Avian Transcription Factor c-Rel is expressed in Lymphocyte Precursor Cells and Antigen-Presenting Cells during thymus development

Hognet C¹, F. Bouali¹, P.J.² Ecrietto, D. Stehelin¹, B. Vandenbunder¹ and C. Abbadie^{1*}

¹Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, URA1160, Institut de Biologie de Lille, 1 rue Calmette, 59019 Lille cedex, France.

²Department of Microbiology, State University of New York at Stony Brook, Stony Brook, New York 11794

*Corresponding author

phone : (33) 3 20 87 10 90

fax : (33) 3 20 87 10 19

e-mail : Corinne.Abbadie@unil-lille.fr

This manuscript contains 25 pages and 9 figures

ABSTRACT

Transcription factors of the Rel/NF- κ B family are widely involved in the immune system. In this study, we investigate the *in vivo* expression of the avian protein c-Rel in the T-cell lineage during the thymus development. The majority of thymocytes does not express the c-Rel protein. However, lymphocyte precursor cells that colonise the thymus express the c-Rel protein shortly after their homing in the organ and before they begin to differentiate. c-Rel is also detected in different subsets of antigen-presenting cells such as epithelial cells, dendritic cells and macrophages. *In vitro* studies have shown that Rel/NF- κ B proteins are sequestered in an inactive form in the cytoplasm by interaction with the I κ B α inhibitory protein. By immunocytochemistry, we show that *in vivo* c-Rel is localised in the cytoplasm of antigen-presenting cells but in both the cytoplasm and nucleus of lymphocyte precursor cells. The cytoplasmic localisation of c-Rel in antigen-presenting cells correlates with a high expression of I κ B α , whereas the nuclear localisation of c-Rel in lymphocyte precursor cells correlates with a much lower expression of I κ B α . These results suggest that c-Rel might be constitutively activated in lymphocyte precursor cells.

KEYWORDS

Rel/NF- κ B, Thymus, Lymphocyte precursor cells, Antigen-presenting cells, Avian development

INTRODUCTION

The proto-oncogene *c-rel* encodes a transcription factor of the Rel/NF- κ B family. The members of this family share a highly conserved 300 amino acid N-terminal domain, the Rel Homology Domain (RHD), involved in DNA binding, dimerization, nuclear localisation and interaction with inhibitory proteins of the I κ B family. Rel/NF- κ B proteins associate as homo- or heterodimers and bind a specific DNA sequence, the κ B motif, in the promoter of their target genes. Inside the Rel/NF- κ B family, two subfamilies of proteins can be defined based on the function of their C-terminal domains. The first one includes c-Rel, RelA, RelB, Dorsal and Dif which contain a transactivating domain in their C-terminus. The second family is composed of the precursor proteins NF- κ B1 and NF- κ B2 which contain I κ B-like ankyrin repeats in their C-terminus. NF- κ B1 and NF- κ B2 undergo a proteolytical processing that eliminates their ankyrin motifs and generates the proteins p50 and p52 respectively. These mature p50 and p52 are able to homo- or heterodimerize with other members of the Rel/NF- κ B family, thus becoming active transcription factors (reviewed in (Miyamoto and Verma, 1995) and (Verma et al., 1995)).

In most cell types, Rel/NF- κ B dimers are found in an inactive form sequestered in the cytoplasm by an ankyrin repeat protein of the I κ B family. The I κ B family is composed of I κ B α , I κ B β and Bcl3 as well as NF- κ B1 and NF- κ B2 precursors in their unprocessed form. The activation of the Rel/NF- κ B proteins is regulated by a post-translational mechanism which includes the phosphorylation of the I κ B inhibitor and its subsequent degradation, thus liberating the Rel/NF- κ B dimer which can translocate into the nucleus (reviewed in (Verma et al., 1995) and (Miyamoto and Verma, 1995)). The inhibitor degradation occurs within minutes after stimulation making the Rel/NF- κ B transcription factors very efficient when rapid responses are needed. The immune system takes advantage of this property and extensively uses the Rel/NF- κ B proteins for regulating cytokine, growth factor, acute phase protein and immunoreceptor gene expression (for review see (Baumle and Henkel, 1994) and (Kepp and Ghosh, 1995)). The Rel/NF- κ B proteins are also involved in pathogenesis of the immune system. In human, alterations at the *rel* locus have been found in follicular and diffuse large cell lymphomas (Lu et al., 1991) and amplifications of the *c-rel* gene have been detected in primary mediastinal thymic

B-cell lymphoma (Joos et al., 1996) and in extra-nodal diffuse large cell lymphoma (Houldsworth et al., 1996). The expression of c-Rel has been widely described in the hematopoietic organs during mouse development. In the fetal liver, the c-Rel protein expression is restricted to hematopoietic precursor cells of the erythroid and B-cell lineage. In the spleen, c-Rel expression is also found in B-cells. In the embryonic thymus, c-Rel is essentially detected in medullary epithelial cells and in some B-cells whereas thymocytes do not express any c-Rel protein. In the T-cell lineage, only mature helper and cytotoxic T-cells of the lymph nodes express c-Rel (Carrasco et al., 1994). A better understanding of the mouse c-Rel functions in hematopoiesis and immune system was obtained with the establishment of null mice (Köntgen et al., 1995). In these mice no developmental defect in any hematopoietic lineage could be evidenced, indicating that c-Rel is not essential for embryonic hematopoiesis. However, c-rel deficient mice displayed defects in humoral immunity and unresponsiveness of mature B- and T-cells to most mitogenic stimuli. In the avian embryo, such exhaustive studies have not yet been performed. Nevertheless previous *in vitro* analysis suggested a potential involvement of some Rel/NF- κ B members in avian hematopoiesis (reviewed in Hagnat et al., 1994). Northern-blot analysis revealed that c-rel is predominantly expressed in chick hematopoietic organs such as the bursa of Fabricius, the thymus, the spleen and the bone-marrow (Moore and Bose, 1989). Moreover, the avian retrovirus Rev-T, bearing the v-Rel oncogene, causes fatal lymphomatosis in chicken (Severian et al., 1964) and (Olson, 1967). The *in vivo* preferential target cells for Rev-T are immature and mature lymphoid cells expressing B- and T-cell determinants as well as myeloid cells (Lewis et al., 1981), (Zhang et al., 1991) and (Barth et al., 1990). *In vitro* studies also showed that the majority of v-Rel transformed hematopoietic cells bore lymphoid markers (Morrison et al., 1991). More recently, a v-RelER fusion protein has been shown to transform an early progenitor of dendritic and neutrophil cells (Boehmelt et al., 1995).

Altogether, these results prompted us to further investigate the relationships between c-Rel and hematopoiesis in chicken. We focused our study on the embryonic thymus which constitutes the primary site of T-cell development. Since the activity of the avian c-Rel is tightly dependent on interactions with the I κ B α inhibitor (Morrison et al., 1989), (Davis et al., 1990), (Kerr et al.,

1991), (Kochel et al., 1991), (Schatzle et al., 1995) and (Hrdlickova et al., 1995), we studied in parallel the expression of both genes and searched for the nucleocytoplasmic localisation of the c-Rel protein, which gives evidence about its activation.

RESULTS

High expression of *c-rel* in the thymus correlates with the differentiation of the medulla

The analysis of *c-rel* expression was performed at three stages representative of the avian thymus development: (i) at E9.5, the thymus is an epithelio-mesenchymal rudiment filled up with very immature precursor cells; (ii) at E15, small medullary areas are separating from the cortex, figuring the maturation of the thymic stroma; (iii) at E19, the avian thymic structure is almost completed with well defined cortical lobules and large medullary areas. The cortex is essentially composed of double positive CD4⁺CD8⁺ immature thymocytes enclosed in an epithelial meshwork whereas the medulla is mainly composed of single positive mature thymocytes among antigen-presenting cells and epithelial cells. *In situ* hybridization experiments performed at E9.5 show that *c-rel* mRNAs are homogeneously expressed throughout the thymic organ (fig 1A and B). At E15, *c-rel* expression becomes heterogeneous with higher levels in the developing medulla than in the cortex (fig 1C and D). At E19, this heterogeneous distribution of *c-rel* mRNAs is even more accentuated (fig 1E and F). At both E15 and E19 stages, high magnifications show that inside the medulla the areas of highest expression correspond to cells with large cytoplasm and nucleus that could be clusters of dendritic or epithelial cells and macrophages, according to their morphology and localization. In contrast, cortical and medullary thymocytes, recognizable by a small round nucleus and a low cytoplasmic volume, express lower levels of *c-rel* mRNAs (fig 2A, B, C and D). Thus, during the thymus development the high expression of *c-rel* correlates with the establishment of mature medullary areas while the expression in developing thymocytes is continuous and low levels.

The c-Rel protein is expressed in endothelial, epithelial and antigen-presenting cells of the thymus

To investigate the *c-rel* expression at the protein level, western-blot experiments were performed with an immuno-purified anti-c-Rel antibody on hematopoietic organs at different developmental stages. One major band at 68 kD, corresponding to the avian c-Rel protein

molecular mass (Simek and Rice, 1988), is detected in the thymus at E15 and E19, although less intensely than in the spleen and the bursa of Fabricius (fig 3). Immunocytochemistry experiments were performed with this same anti-c-Rel antibody on serial thymus sections to identify the c-Rel-expressing cells. At E15 and E19, consistent with its mRNA distribution, the c-Rel protein is predominantly expressed inside the medulla in large clusters of cells (fig 4A and B). Some isolated cells scattered in the cortex also express c-Rel. Cortical as well as medullary thymocytes, identified with anti-CD3, -CD4 and -CD8 antibodies (data not shown), do not express any detectable amounts of c-Rel. At least four different types of cells were found to express c-Rel. The most easily identifiable are endothelial cells bordering the thymic vessels (fig 5A). Epithelial cells of different morphology and localization, identified with an anti-cytokeratin antibody (data not shown), also express c-Rel : some line the cortical lobules (fig 5B) and others form large clusters inside the central medulla (fig 5C). Other medullary clusters, containing 2 to 3 large cells with large vacuoles, also express c-Rel. In these cells, the protein is clearly localised in the cytoplasm (fig 5D). These cells displayed the violet color characteristic of myeloid cells when stained by the panoptic method of Pappenheim (data not shown). According to their morphology, localization and staining properties, they could be dendritic cells. At the corticomedullary junction, inside the medulla and scattered inside the cortex, isolated large round cells also express c-Rel in their cytoplasm (fig 5E). These cells possess a characteristic eccentric nucleus which is clearly negative. We assume that these cells are macrophages because of their morphology, pink staining by the Pappenheim method (data not shown) and because some of them, probably the most mature, display a non-specific esterase activity detectable *in situ* characteristic of the monocytic lineage (Duncan and McArthur, 1978) (data not shown). The c-rel expression in dendritic cells and macrophages was further characterized in primary cell culture. These cells were isolated from E19 thymuses by fractionation on a bovine serum albumin gradient and cultured on the basis of their glass-adherence properties (Oliver and Le Douarin, 1984). In culture, dendritic cells appear as long bipolar cells with the nucleus at one pole and large vacuoles. The c-Rel protein is clearly observed in the cytoplasm while there is no detectable protein in the nucleus (fig 5F). Macrophages appear as large round cells with an eccentric nucleus. In these cells c-Rel is also restricted to the cytoplasm (fig 5G).

Lymphocyte precursor cells express the c-Rel protein both in their cytoplasm and nucleus

In the cortex at E19, a few round cells, larger than most of the cortical thymocytes, also express c-Rel. They are usually located in the marginal cortex and often observable in only one lobule (fig 6A). Unlike the majority of cortical thymocytes, numerous cells of the marginal cortex do not express any of the CD3, CD4 or CD8 cell surface markers (data not shown) indicating that they are very immature (Dieterlen-Lièvre, 1994). Moreover, the Pappenheim coloration reveals that the large round cells of the marginal cortex are stained in dark blue compared to more mature thymocytes which appear pale blue (fig 6C). This dark blue staining indicates that they are highly basophilic, a characteristic of lymphocyte precursor cells (LPCs). Therefore, to further identify these cells, we investigated the expression of c-Rel during the first wave of thymus colonization by LPCs.

The thymus rudiment is colonized by three consecutive waves of LPCs : from E6.5 to E8, from E12 to E14 and from E18 to hatching. The first wave of LPCs gives rise to the myeloid and lymphoid cells of the thymus; they are renewed in the successive waves of colonization. Between the three colonization periods, the thymus is refractory to the entry of precursor cells (Coltray et al., 1987). To estimate the number and localization of LPCs in thymus sections, we used the panoptic Pappenheim coloration. At E8.5, just after the first wave of colonization, round dark blue cells are detected (fig 7A). Comparison with sections treated with the anti-c-Rel antibody indicates that no cells express c-Rel at this stage (fig 7B). At E9.5, the thymus is filled up with dark blue stained LPCs, the majority of these cells express high levels of c-Rel (fig 7C and D). At E11, nearly no large round cells stained in dark blue are detected, the majority of round cells are small and stained in pale blue indicating that they are already differentiated thymocytes (fig 7E). These cells do not express c-Rel (fig 7F). Thus, c-Rel is expressed in LPCs during a limited period between the homing and the beginning of the differentiation. Observation at high magnification of sections at E9.5 and E19 reveals that c-Rel is localized in both the cytoplasm and nucleus of LPCs (fig 6B and 7D).

Nuclear or cytoplasmic localisation of c-Rel correlates respectively with low and high levels of *ikba* gene expression

Since the nucleocytoplasmic localisation of c-Rel in antigen-presenting cells and lymphocyte precursor cells differs, we investigated the expression of *ikba*, the gene which encodes I κ B α , in these cells at E9.5 and E19.

At E19, the *ikba* gene shows high levels of expression in the medulla, whereas weaker signals are found in the cortex (fig 8A and B). Within the medulla, intense signals are detected in clusters of large cells with large nucleus as well as in thymocytes (fig 8C and D). *ikba* expression is also detected in round isolated macrophages located at the cortico-medullary junction and in the interlobular spaces (data not shown). The expression in macrophages and dendritic cells was confirmed by *in situ* hybridization on primary cell culture (fig 8E). Additionally, *ikba* is highly expressed in endothelial cells (fig 8F and G) and in epithelial cell lining the cortex (fig 8H and I). At E9.5, the *ikba* expression is heterogeneous. It is highly expressed in a few isolated cells, probably corresponding to the first differentiating antigen-presenting cells, while it is expressed at low levels in the majority of lymphocyte precursor cells (fig 9A and B). In summary, *ikba* expression is high in all of the stromal cells where c-Rel protein is cytoplasmic. In contrast, low levels of *ikba* are detected in LPCs where c-Rel is detected in both the cytoplasm and nucleus.

DISCUSSION

Previous studies have shown that the mouse proto-oncogene *c-rel* is involved in mature T-cell activation and in T-cell education via an indirect role in thymic epithelial cells (Carrasco et al., 1994), (Königsen et al., 1995). In this study, we investigated the expression of the avian proto-oncogene *c-rel* and its I κ B α inhibitor during the T-cell development occurring in the chick embryonic thymus.

c-Rel is expressed in the nucleus of proliferating lymphocyte precursor cells

Immunocytochemistry experiments pointed out the expression of *c-Rel* in a specific subset of T-cells, the lymphocyte precursor cells (LPCs), where it had never been detected so far. Colonization of the avian thymus by LPCs has been widely studied through the construction of quail-chick chimeras (Le Douarin and Jotereau, 1975), (Coltrey et al., 1987). The thymus rudiment is seeded by three waves of LPCs from E6.5 to E8, from E12 to E14 and from E18 onwards. Between these three periods, the thymus is refractory to hematopoietic cell entry. LPCs of the second wave stay dormant during about three days before starting proliferation (Jotereau and Le Douarin, 1982). Differentiation of LPCs gives birth to three T-cell sublineages. The first fully differentiated cells appear at E12; they express the TCR1/CD3 complex. Cells expressing the TCR2/CD3 complex appear at E14-15. The TCR3/CD3 cells constitute the last T-cells to differentiate from E17 (reviewed in (Dieterlen-Lièvre, 1994). At E8.5, after the end of the first wave of colonization, LPCs in the thymus rudiment do not express *c-Rel*. At E9.5, the number of LPCs in the thymus has greatly increased. Most of them express *c-Rel*. This expression is no longer detected at E11 when differentiation of the first T-cell sublineage begins. Thus, the expression of *c-Rel* in LPCs seems to occur during their proliferation and to be induced at E9.5. *c-Rel*-expressing LPCs were also observed at E19. At this stage, temporal correlations are more difficult to establish since the duration of the third wave of colonization is not well defined. It is worth to notice that, in LPCs, *c-Rel* is expressed both in the cytoplasm and nucleus. Therefore, *c-Rel* might be constitutively activated in proliferating LPCs and may that way sustain their proliferation. A constitutive activation of *c-*

Rel has already been described in a mature mouse B-cell line and was explained by a high and continuous degradation of I κ B α in the absence of external signals (Miyamoto et al., 1994). Here, we show that avian LPCs express low levels of I κ B α , suggesting that the constitutive nuclear localization of c-Rel might be due to a low expression of the inhibitor. This hypothesis requires to be further investigated by a study of I κ B α expression at the protein level. The involvement of c-Rel in proliferation has already been suggested by *in vitro* experiments showing that overexpression of c-Rel in chicken embryo fibroblasts led to morphological transformation, life span extension and proliferation (Abbadie et al., 1993), (Kralova et al., 1994). The constitutive nuclear localization of c-Rel in LPCs documented in this work represents the first *in vivo* argument in favour of a participation of this transcription factor in proliferation of very immature progenitor of T-cells.

c-Rel is expressed in the cytoplasm of thymic antigen-presenting cells

In avian thymuses from E15 to E19, c-Rel is expressed in epithelial cells, dendritic cells and macrophages. Avian thymic epithelial cells, dendritic cells and macrophages share common surface antigens and particularly MHC molecules (Peck et al., 1982), (Guillemot et al., 1984), (Boyd et al., 1992); they constitute the three main types of antigen-presenting cells (APCs) of the thymus. These cells govern positive and negative selection of T-cells in the thymus, via interactions between their MHC and the T-Cell Receptor (TCR) (reviewed in (van Boehmer, 1994) and (Nossal, 1994)). *In vitro* studies have shown that avian MHC class I and II genes are induced when c-Rel or v-Rel are overexpressed (Hrdlickova et al., 1994). Therefore, a potential function of c-Rel in APCs could be to regulate the expression of MHC genes. However, in macrophages, besides genes involved in T-cell maturation, c-Rel could regulate genes involved in basic anti-microbial functions, since in HD11 cells, a chicken myelomonocytic cell line, RelA and c-Rel are able to activate the transcription of the lysozyme gene (Phi Van, 1996). *In vitro* experiments have demonstrated that in chicken I κ B α is able to inactivate c-Rel by sequestering it in the cytoplasm (Davis et al., 1990), (Kerr et al., 1991). In accordance with these studies, our *in situ* hybridization analysis revealed that *in vivo*, high expression of *I κ B α* is detected in all of

the stromal cells that express the c-Rel protein in the cytoplasm, i.e. in endothelial cells, epithelial cells, dendritic cells and macrophages.

The expression pattern of c-Rel is more widespread in chick than in mouse APCs, where c-Rel appears restricted to medullary epithelial cells. Moreover, in mouse, the expression of c-Rel in progenitor cells is restricted to the erythroid and B-cell lineages (Carrasco et al., 1994). Our results on *ikba* are also different from those obtained in mouse. In the mouse thymus, *ikba* expression is higher in the cortex than in the medulla (Weith et al., 1994).

In conclusion, both avian and murine c-Rel proteins might be indirectly involved in T-cell maturation via their expression in antigen-presenting cells, but this expression seems restricted to epithelial cells in mouse while it also extends to dendritic cells and macrophages in chicken. In contrast, the sole avian c-Rel protein might be also involved in early lymphopoiesis via its expression in proliferating lymphocyte precursor cells.

MATERIAL AND METHODS

1. Animals

Fertilized White Leghorn chicken eggs were incubated at 39°C in a humidified chamber. The age of embryos is indicated as E1, E2, ..., E1 corresponding to 24h of incubation.

2. Histological sections

Chick embryo thymuses at different developmental stages were dissected in PBS and fixed at 4°C for 18 hours in 4% paraformaldehyde in PBS (Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 0.1 M pH7.4), then dehydrated in ethanol and toluene, embedded in paraffin and processed for 5-6 μm histological sections.

3. Isolation and primary culture of macrophages and dendritic cells

The protocol was adapted from (Oliver and Le Douarin, 1984). E19 thymuses were dissected, minced with scissors and crushed through a fine nylon gauze, which retains connective tissue and epithelial cells. The collected cell suspension was rinsed in culture medium (RPMI 1640, 10% FCS, 1000 IU.ml⁻¹ penicillin, 1000 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ streptomycin) and resuspended in 10% BSA (Sigma) in RPMI 1640 buffered with HEPES pH7.3. A discontinuous gradient of 22%, 27% and 29% BSA in RPMI 1640 pH7.3 was prepared in 5 ml polyallomer tube and the cell suspension was layered on top of the gradient. After centrifugation at 35,000 g for 30 min, the fraction located above the 22% layer was collected. Cells enriched in macrophages and dendritic cells were rinsed in culture medium (see section 1) and plated on glass coverslips for 4 hours at 37°C in 5% CO₂ humidified incubator. Contaminating thymocytes were eliminated by hard pipetting. Adherent cells were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS overnight at 4°C and processed for *in situ* hybridization or immunocytochemistry.

4. *In situ* hybridization

a) *Synthesis of ³⁵S RNA probes*

The chicken full length *c-rel* c-DNA was cloned in Bluescript SK (Stratagene), (Abbadie et al., 1993). A 0.9 kb EcoRI fragment from the chicken *ikba* cDNA, kindly provided by H. Bose, was cloned in Bluescript SK phagemid (Stratagene). ³⁵S RNA probes were transcribed from 2 µg of linearized plasmids by 20 U of either T7, T3 or SP6 RNA polymerase for sense and antisense probes in a 20 µl reaction mixture containing 200 µCi ³⁵S-CTP (1300 Ci/mole), 200 µM UTP, ATP and GTP for 1 h at 39°C. To facilitate their penetration into cells, probes were submitted to a limited alkaline hydrolysis generating fragments of approximately 150 bases as recommended by (Cox et al., 1984).

b) *In situ* hybridization

In situ hybridization was adapted from the method of (Cox et al., 1984), as described by (Quéva et al., 1992). Briefly, after being deparaffinized and rehydrated, sections were incubated in 0.1 M glycine, 0.2 M Tris-HCl pH7.4 for 10 min at 20°C, treated with 1 µg.ml⁻¹ proteinase K (Boehringer Mannheim) for 15 min at 37°C, post-fixed in 4% paraformaldehyde, washed in PBS, acetylated 10 min with 0.25% acetic anhydride in 0.1M triethanolamine, washed in 2X SSC (0.3 M NaCl, 30 mM sodium citrate) and dehydrated in ethanol. ³⁵S RNA probes were denatured at 80°C and diluted in the hybridization buffer at a concentration of 50 µg. µl⁻¹. Hybridization was performed at 60°C for 18 h. After a wash in 4X SSC at 20°C, slides were treated with 10 µg.ml⁻¹ of RNase A (type III A, Sigma) for 30 min at 37°C, subsequently washed in 0.1X SSC at 60°C, dehydrated by ethanol and dipped in nuclear track emulsion (Kodak NTB2). The sections were exposed at 4°C for 2 weeks. After developing, sections were stained with a DNA intercalating fluorescent dye (Hoechst 33258), mounted and observed under dark-field and UV illumination. Both antisense and sense probes were used and the sense probes never gave any signal.

5. Immunocytochemistry and Western-blot

a) Antibodies

A rabbit immunopurified anti-c-Rel serum (SBI46) raised against the 15 carboxy terminal amino acids specific of the chicken c-Rel protein (Abbadie et al., 1993) was used both in western-blot and immunocytochemistry experiments. A normal rabbit immunoglobulin fraction (Dako) was used as negative control. A rabbit polyclonal anti-keratine serum (Dako) was used in immunocytochemistry to identify epithelial cells. Mouse monoclonal anti-chicken-CD3, -CD4 and -CD8 antibodies (Southern Biotechnology Associates, Inc) were used in immunocytochemistry to identify the different types of thymocytes.

b) Immunocytochemistry

After being deparaffinized and rehydrated, sections were incubated in 0.5 mg.ml⁻¹ Saponine (Sigma) in PBS for 30 min; then endogenous peroxidase activity was quenched by incubation in 80% methanol, 20% PBS, 0.6% H₂O₂ for 30 min followed by 30 min saturation in 5% dry defatted milk in PBS. Sections were incubated with the primary antibody overnight at 4°C. After three washes in PBS, the EXTRA-3 kit (Sigma Immunochemicals) and the AEC substrate system (Dako) were used to detect the primary antibody. Sections were counterstained with hematoxylin (Sigma) and mounted in Glycergel (Dako).

c) Western-blot of hematopoietic organs

Hematopoietic organs at various developmental stages were dissected in PBS, transferred into a solution containing 0.06 M Tris-HCl pH6.8, 5% β-mercaptoethanol, 2% SDS, 10% glycerol, 0.002% bromophenol blue, homogenized in a Dounce, sonicated and centrifuged at 10,000 g. In order to measure protein concentration in each sample, 20 µl aliquots were separated on a 10% SDS-PAGE; proteins were then stained with Coomassie-blue and the gel scanned lane by lane. Equicharged 10% SDS-PAGE were run and transferred onto nitrocellulose sheets. Blots were first incubated 30 min with 5% dry defatted milk in PBS, then 2 h at room temperature with SBI46. After three washes in PBS, the sheets were

incubated with horseradish-peroxidase-conjugated swine anti-rabbit immunoglobulin (Dako) for 2h at room temperature. After washing, the peroxidase activity was revealed by incubation in diaminobenzidine (30 mg in 100 ml 0.05 M tris-HCl pH7.4, 0.01% H₂O₂).

6. Panoptic coloration of Pappenheim

This protocol of hematological coloration is described in (Gabe, 1968). Briefly, after being deparaffinized and rehydrated, sections were stained 3 min in May-Grünwald, 3 min in May-Grünwald/Sørensen buffer (Na₂HPO₄-KH₂PO₄ 0.1 M pH6.8) V/V, washed in Sørensen buffer, stained in Giemsa/Sørensen buffer 1V/5V for 15 min, washed in Sørensen buffer, differentiated in acetic acid 0.15%, washed in Sørensen buffer and dehydrated in 2 washes of acetone and 1 wash of toluene. Sections were then mounted in Eukitt (O. Kindler GmbH & Co, Germany).

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Eric Maire and Virginie Matot for their technical help and advices. We thank Jean Coll, Pierre-Antoine Desfossez, Véronique Fafeur, Corine Glineur and Fabrice Soncin for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from the Institut Pasteur de Lille, the Centre National de la Recherche Scientifique and the Association pour la Recherche sur le Cancer. C.H. was supported by a training grant from the Association pour la Recherche sur le Cancer.

REFERENCES

Abbadie, C., Kabrun, N., Bouali, F., Smardova, J., Stéhelin, D., Vandebunder, B., and Enrietto, P. (1993). High levels of *c-rel* expression are associated with programmed cell death in the developing avian embryo and in bone marrow cells *in vitro*. *Cell* 75, 899-912.

Barth, C. F., Ewert, D. L., Olson, W. C., and Humphries, E. H. (1990). Reticuloendotheliosis virus REV-T (REV-A)-induced neoplasia : development of tumors within the T-lymphoid and myeloid lineages. *J. Virol.* 64, 6054-6062.

Bauerle, P. A., and Henkel, T. (1994). Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 141-179.

Boehmelt, G., Madruga, J., Dörfler, P., Briegel, K., Schwarz, H., Bauerle, P. A., and Zenke, M. (1995). Dendritic cell progenitor is transformed by a conditional *v-Rel* estrogen Receptor fusion protein *v-RelER*. *Cell* 80, 341-352.

Boyd, R. L., Wilson, T. J., Bean, A. G., and Ward, H. A. (1992). Phenotypic characterization of chicken thymic stromal elements. *Developmental immunology* 2, 51-66.

Carrasco, D., Weih, F., and Bravo, R. (1994). Developmental expression of the mouse *c-rel* proto-oncogene in hematopoietic organs. *Development* 120, 2991-3004.

Coltray, M., Jotereau, F. V., and Le Douarin, N. M. (1987). Evidence for a cyclic renewal of lymphocyte precursor cells in the embryonic chick thymus. *Cell differentiation* 22, 71-82.

Cox, K. J., DeLeon, D. V., Angerer, L. M., and Angerer, R. C. (1984). Detection of mRNAs in sea urchin embryos by *in situ* hybridization using asymmetric RNA probes. *Dev. Biol.* 101, 485-502.

Davis, J. N., Bargmann, W., and Bose, H. J. (1990). Identification of protein complexes containing the *c-rel* proto-oncogene product in avian hematopoietic cells. *Oncogene* 5, 1109-15.

Dieterlen-Lièvre (1994). Hemopoiesis during avian Ontogeny. *Poultry Science Rev.* 5, 273-305.

Duncan, R. L., and McArthur, W. P. (1978). Partial characterisation and the distribution of chicken mononuclear cells bearing the Fc receptor. *The Journal of Immunology* *120*, 1014-1020.

Gabe, M. (1968). *Techniques histologiques* (Paris: Masson et Cie).

Guillemot, F. P., Oliver, P. D., Peault, B. M., and Le Douarin, N. (1984). Cells expressing Ia antigens in the avian thymus. *J. Exp. Med.* *160*, 1803-1819.

Houldsworth, J., Mathew, S., Rao, P. H., Dyomina, K., Louie, C. D., Parsa, N., Offit, K., and Chaganti, R. S. K. (1996). *REL* proto-oncogene is frequently amplified in extranodal diffuse large cell lymphoma. *Blood* *87*, 25-29.

Hrdlickova, R., Nehyba, J., and Humphries, E. H. (1994). *v-rel* induces expression of three avian immunoregulatory surface receptors more efficiently than *c-rel*. *J. Virol.* *68*, 308-319.

Hrdlickova, R., Nehyba, J., Roy, A., Humphries, E. H., and Bose, H. R. Jr (1995). The relocalization of *v-rel* from the nucleus to the cytoplasm coincides with induction of expression of *Ikba* and *nfkb1* and stabilization of *IxB- α* . *J. Virol.* *69*, 403-413.

Huguet, C., Enrietto, P., Vandembuer, B., and Abbadie, C. (1994). *C-Rel* : a multifunctional transcription factor ? *Cell Death and Differentiation*.

Joos, S., Otano-Joos, M. I., Ziegler, S., Br uderlein, S., du Manoir, S., Bentz, M., M ller, P., and Lichter, P. (1996). Primary mediastinal (thymic) B-cell lymphoma is characterized by gains of chromosomal material including 9p and amplification of the *REL* gene. *Blood* *87*, 1571-1578.

Jotereau, F. V., and Le Douarin, N. M. (1982). Demonstration of a cyclic renewal of the lymphocyte precursor cells in the quail thymus during embryonic and perinatal life. *The Journal of Immunologie* *129*, 1869-1877.

Kerr, L. D., Inoue, J., Davis, N., Link, E., Baentche, P. A., Bose, H. J., and Verma, I. M. (1991). The *rel*-associated pp40 protein prevents DNA binding of Rel and NF-kappa B: relationship with I kappa B beta and regulation by phosphorylation. *Genes Dev* *5*, 1464-76.

Kochel, T., Mushinski, J. F., and Rice, N. R. (1991). The *v-Rel* and *c-Rel* proteins exist in high molecular weight complexes in avian and murine cells. *Oncogene* 6, 615-26.

Köntgen, F., Grumont, R. J., Strasser, A., Metcalf, D., Li, R., Tarlinton, D., and Gerondakis, S. (1995). Mice lacking the *c-rel* proto-oncogene exhibit defects in lymphocyte proliferation, humoral immunity, and interleukin-2 expression. *Genes and Development* 9, 1965-1977.

Kopp, E. B., and Ghosh, S. (1995). NF- κ B and Rel proteins in innate immunity. *Advances in Immunology* 58, 1-27.

Kralova, J., Schatzle, J. D., Bargmann, W., and Bose, H. R. J. (1994). Transformation of avian fibroblasts overexpressing the *c-rel* proto-oncogene and a variant of *c-rel* lacking 40 C-terminal amino acids. *J. Virol.* 68, 2073-2083.

Le Douarin, N. M., and Jotereau, F. V. (1975). Tracing of cells of the avian thymus through embryonic life in interspecific chimeras. *J. of Experimental Medicine* 142, 17-40.

Lewis, R. B., McClure, J., Rup, B., Niesel, D. W., Garry, R. F., Hoelzer, J. D., Nazerian, F. a., and Bose, H. R. (1981). Avian reticuloendotheliosis virus: identification of the hematopoietic target cell for transformation. *Cell* 25, 421-431.

Lu, D., Thompson, J. D., Gorski, G. K., Rice, N. R., Mayer, M. G., and Yunis, J. J. (1991). Alterations at the *rel* locus in human lymphoma. *Oncogene* 6, 1235-41.

Miyamoto, S., Chiao, P. J., and Verma, I. V. (1994). Enhanced I κ B α degradation is responsible for constitutive NF- κ B activity in mature murine B-cell lines. *Molecular and Cellular Biology* 14, 3276-3282.

Miyamoto, S., and Verma, I. M. (1995). Rel/NF- κ B/I κ B story. *Adv. Cancer Res.* 66, 255-292.

Moore, B. E., and Bose, H. R. (1989). Expression of the *c-rel* and *c-myc* proto-oncogenes in avian tissues. *Oncogene* 4, 845-857.

Morrison, L. E., Boehmelt, G., Beug, H., and Enrietto, P. J. (1991). Expression of *v-rel* in a replication competent virus: transformation and biochemical characterization. *Oncogene* 6, 1657-66.

Morrison, L. E., Kabrun, N., Mudri, S., Hayman, M. J., and Enrietto, P. J. (1989). Viral *rel* and cellular *rel* associate with cellular proteins in transformed and normal cells. *Oncogene* 4, 677-683.

Nossal, G. J. V. (1994). Negative selection of lymphocytes. *Cell* 76, 229-239.

Oliver, P., and Le Douarin, N. M. (1974). Avian thymic accessory cells. *The Journal of immunology* 132, 1748-1755.

Olson, L. D. (1967). Histopathologic and hematologic changes in moribund stages of chicks infected with T-virus. *Am. J. Vet. Res.* 28, 1501-1507.

Peck, R., Murthy, K. K., and Vainio, O. (1982). Expression of B-2 (Ia-like) antigens on macrophages from chicken lymphoid organs. *The Journal of Immunology* 129, 4-5.

Phu Van, L. (1996). Transcriptional activation of the chicken lysozyme gene by NF- κ Bp65 (RelA) and c-Rel, but not by NF- κ Bp50. *Biochem J.* 313, 39-44.

Quéva, C., Ness, S. A., Graf, T., Vandenbunder, B., and Stéhelin, D. (1992). Expression patterns of *c-myc* and of *v-myc* induced myeloid-1 (*mim-1*) gene during the development of the chick embryo. *Development* 114, 125-133.

Schatzle, J. D., Kralova, J., and Bose, H. R. (1995). Avian I κ B α is transcriptionally induced by c-Rel and v-Rel with different kinetics. *Journal of Virology* 69, 5383-5390.

Sevoian, M., Larena, R. N., and Chamberlain, D. M. (1964). Avian lymphomatosis. VI. A virus of unusual potency and pathogenicity. *Avian Dis.* 8, 336-347.

Simsek, S., and Rice, N. R. (1988). Detection and characterization of the protein encoded by the chicken *c-rel* protooncogene. *Oncogene Res* 2, 103-19.

Verma, I. M., Stevenson, J. K., Schwarz, E. M., Van Antwerp, D., and Miyamoto, S. (1995). Rel/NF- κ B/I κ B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes & Development* 9, 2713-2735.

von Boehmer, H. (1994). Positive selection of lymphocytes. *Cell* 76, 219-228.

Weih, F., Carrasco, D., and Bravo, R. (1994). Constitutive and inducible Rel/NF- κ B activities in mouse thymus and spleen. *Oncogene* 9, 3289-3297.

Zhang, J. Y., Olson, W., Ewert, D., Bargmann, W., and Bose, H. I. (1991). The v-rel oncogene of avian reticuloendotheliosis virus transforms immature and mature lymphoid cells of the B cell lineage in vitro. *Virology* 183, 457-66.

LEGENDS

Figure 1: *In situ* hybridization analysis of *c-rel* expression pattern in E9.5, E15 and E19 thymuses. In order to visualize the nuclei, sections were counterstained with the DNA intercalant Hoechst 33258 which fluoresces in blue under UV illumination. Sections were observed under UV illumination alone (A, C, E) or UV and dark field illumination (B, D, F). (A and B) At E9.5, *c-rel* is homogeneously expressed. (C and D) At E15, *c-rel* expression becomes heterogeneous with higher expression in the medulla (M) than in the cortex (Cx). (E and F) At E19, the heterogeneous expression of *c-rel* is even more obvious with the highest levels in the medulla. X100.

Figure 2: Higher magnification of *c-rel* expression in the medulla of E15 and E19 thymuses. (A and C) Hoechst staining, (B and D) *in situ* hybridization.

At both stages E15 and E19, the highest expressions are found inside the medulla in clusters of large cells with large nuclei appearing as dark areas (arrowheads). Cortical and medullary thymocytes express low levels of *c-rel* (arrows). X300.

Figure 3: Western-blot of protein extracts of E15 and E19 hematopoietic organs. The p68^{mol} protein is indicated by an arrow. The lower band seen in spleen extracts was shown to be a breakdown product (data not shown).

Figure 4: Immunocytochemical detection of c-Rel in E15 and E19 thymuses. Cells expressing c-Rel are stained in red in contrast to negative cells which appear in blue due to counterstaining. At both stages E15 (A) and E19 (B), c-Rel is predominantly expressed in cell clusters in the medullary areas (arrowheads). X200.

Figure 5: High magnification of the immunocytochemical detection of c-Rel in E19 thymus and in primary cell culture. (A) c-Rel is detected in endothelial cells (arrowhead). (B)

Epithelial cells lining the cortical lobules express c-Rel (arrow) whereas cortical thymocytes are clearly negative (arrowhead). (C) c-Rel is also detected in clusters of medullary epithelial cells (arrow); medullary thymocytes are negative (arrowhead). (D) Clusters of dendritic cells with vacuoles (V) express c-Rel in their cytoplasm (arrow). (E) Isolated macrophages with an eccentric nucleus also express c-Rel in their cytoplasm (arrowheads). (F and G) Detection of c-Rel in primary culture of dendritic cells and macrophages: (F) long bipolar dendritic cells with large vacuoles (V) and (G) macrophages with an eccentric nucleus express c-Rel in their cytoplasm. In both type of cells, the nuclei are clearly negative and appear stained in blue by the hematoxylin. X550.

Figure 6: Immunocytochemical detection of c-Rel in lymphocyte precursor cells (LPCs) in E19 thymus. (A). In the marginal cortex (brackets), some LPCs express c-Rel. (B) High magnification showing that c-Rel is localised in the nucleus and cytoplasm of these cells (arrowheads). (C) LPCs are stained in dark blue by the Pappenheim coloration (arrowheads) compared to small cortical thymocytes that are pale blue (arrows). X200 in (A) and X750 in (B) and (C).

Figure 7: Immunocytochemical detection of c-Rel in LPCs during the first wave of colonization. Pappenheim coloration (A, C, E) and immunocytochemistry (B, D, F). At E8.5: (A) a few large round LPCs are stained dark blue by the Pappenheim coloration (arrows); (B) c-Rel is not detected in these cells. At E9.5: (C) the thymus is filled up with dark blue stained LPCs; (D) the majority of these cells express c-Rel and the protein is detected in the cytoplasm (arrowhead) or both in the nucleus and cytoplasm (arrows). At E11, (E) the thymus mainly contains differentiating thymocytes that are small cells stained in pale blue; (F) they do not express c-Rel. X550.

Figure 8: *In situ* hybridization analysis of *ikba* expression in E19 thymus and primary cell culture. (A, C, F and H) Hoechst staining, (B, D, E, G and I) *in situ* hybridization. (A and B) At E19, *ikba* is highly expressed in the medulla (M). (C and D) Higher magnification of the

medulla shows *ikba* expression in clusters of large cells appearing as dark areas (arrows) and in medullary thymocytes (arrowheads). (E) *ikba* expression in primary culture of macrophages and dendritic cells. (F and G) *ikba* is also expressed in endothelial cells (arrow) and (H and I) in epithelial cells lining the cortical lobules (arrows). X200 in (A) and (B), X550 in (C), (D) and (E), X300 in (F), (G), (H) and (I).

Figure 9: *In situ* hybridization analysis of *ikba* expression in E9.5 thymus. (A) Hoechst staining and (B) *in situ* hybridization. At E9.5, *ikba* is heterogeneously expressed throughout the organ. LPCs, which represent the majority of cells, only express low levels of *ikba* (arrows). High expressing cells (arrowheads) can not be clearly identified. X200.

Figure 1: *In situ* hybridization analysis of *c-rel* expression pattern in E9.5, E15 and E19 thymuses. In order to visualize the nuclei, sections were counterstained with the DNA intercalant Hoechst 33258 which fluoresces in blue under UV illumination. Sections were observed under UV illumination alone (A, C, E) or UV and dark field illumination (B, D, F). (A and B) At E9.5, *c-rel* is homogeneously expressed. (C and D) At E15, *c-rel* expression becomes heterogeneous with higher expression in the medulla (M) than in the cortex (Cx). (E and F) At E19, the heterogeneous expression of *c-rel* is even more obvious with the highest levels in the medulla. X100.

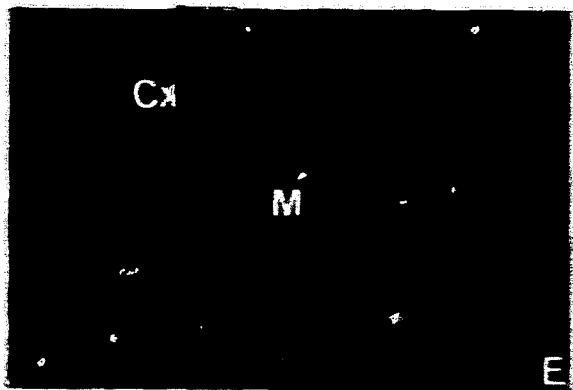
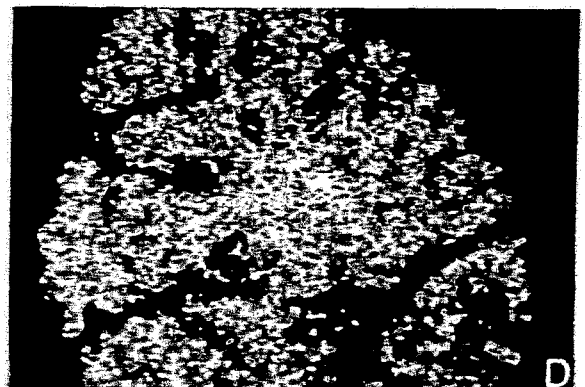
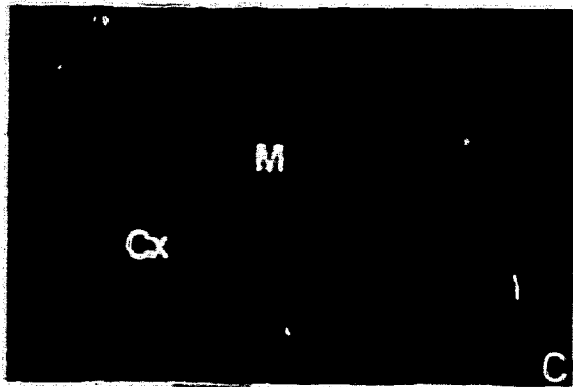
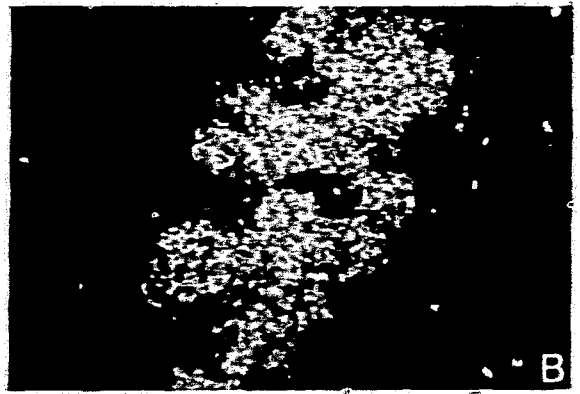
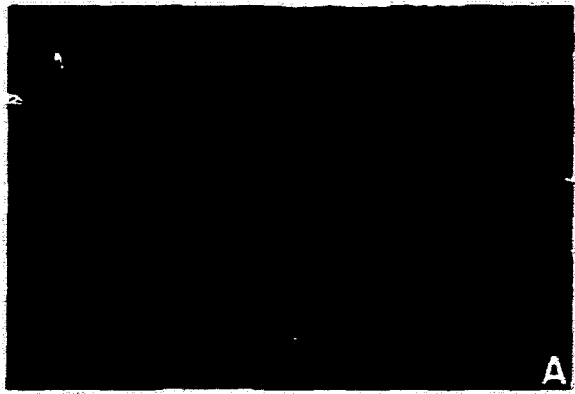


Figure 2: Higher magnification of *c-rel* expression in the medulla of E15 and E19 thymuses. (A and C) Hoechst staining, (B and D) *in situ* hybridization.

At both stages E15 and E19, the highest expressions are found inside the medulla in clusters of large cells with large nuclei appearing as dark areas (arrowheads). Cortical and medullary thymocytes express low levels of *c-rel* (arrows). X300.

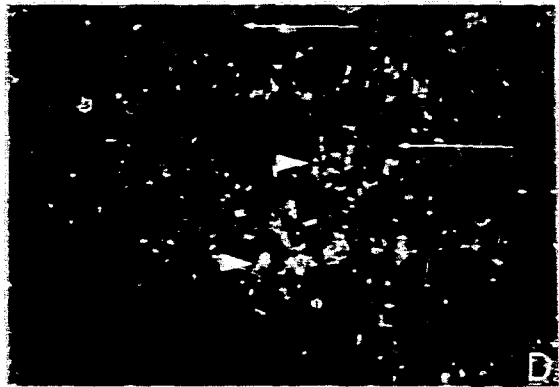
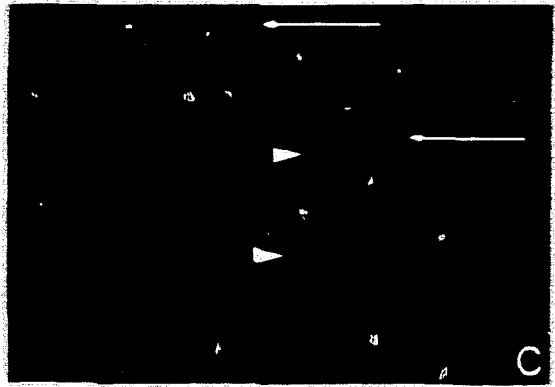
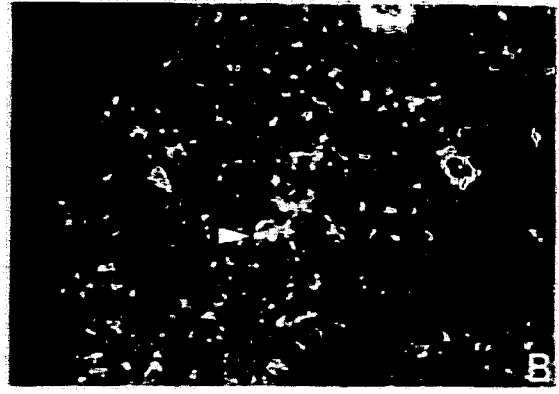
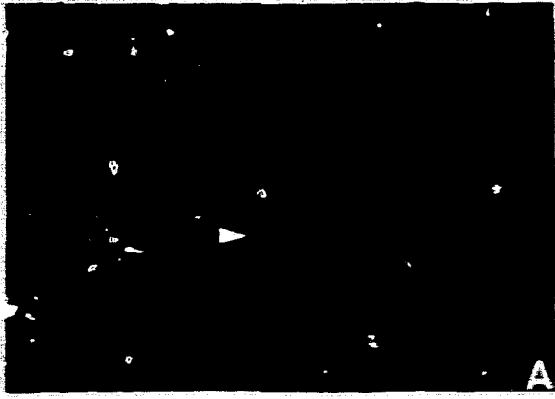


Figure 3: Western-blot of protein extracts of E15 and E19 hematopoietic organs. The μS^{H} protein is indicated by an arrow. The lower band seen in spleen extracts was shown to be a breakdown product (data not shown).

E 15

E 19

Bursa of Fabricius

Spleen

Thymus

Bursa of Fabricius

Spleen

Thymus

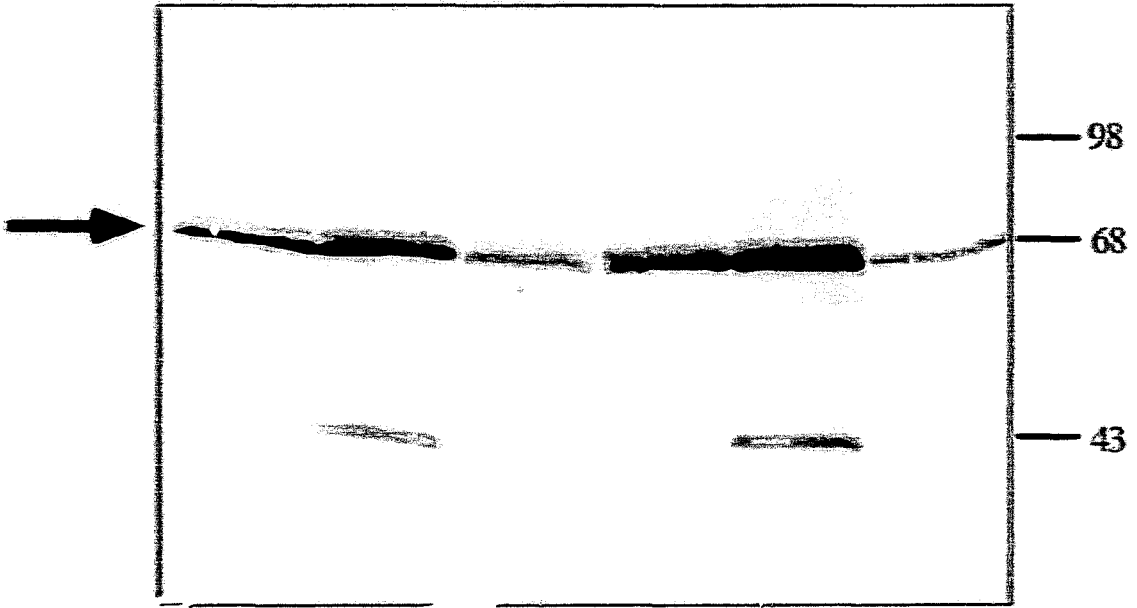


Figure 4: Immunocytochemical detection of c-Rel in E15 and E19 thymuses. Cells expressing c-Rel are stained in red in contrast to negative cells which appear in blue due to hematoxylin counterstaining. At both stages E15 (A) and E19 (B), c-Rel is predominantly expressed in cell clusters in the medullary areas (arrowheads). X200.

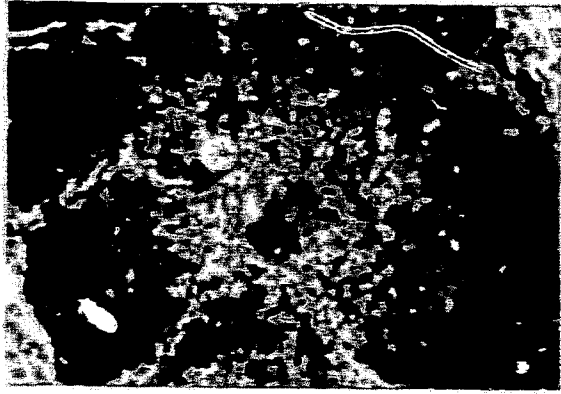


Figure 5: High magnification of the immunocytochemical detection of c-Rel in E19 thymus and in primary cell culture. (A) c-Rel is detected in endothelial cells (arrowhead). (B) Epithelial cells lining the cortical lobules express c-Rel (arrow) whereas cortical thymocytes are clearly negative (arrowhead). (C) c-Rel is also detected in clusters of medullary epithelial cells (arrow), medullary thymocytes are negative (arrowhead). (D) Clusters of dendritic cells with vacuoles (V) express c-Rel in their cytoplasm (arrow). (E) Isolated macrophages with an eccentric nucleus also express c-Rel in their cytoplasm (arrowheads). (F and G) Detection of c-Rel in primary culture of dendritic cells and macrophages: (F) long bipolar dendritic cells with large vacuoles (V) and (G) macrophages with an eccentric nucleus express c-Rel in their cytoplasm. In both type of cells, the nuclei are clearly negative and appear stained in blue by the hematoxylin X550

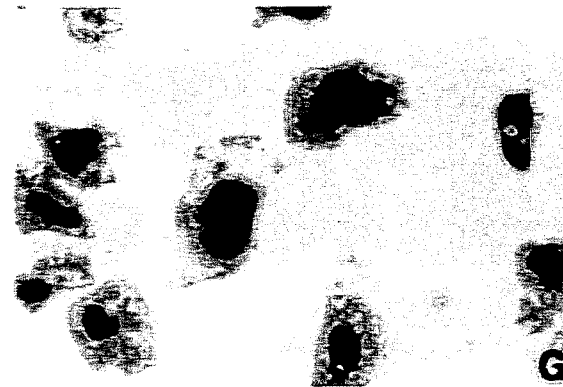
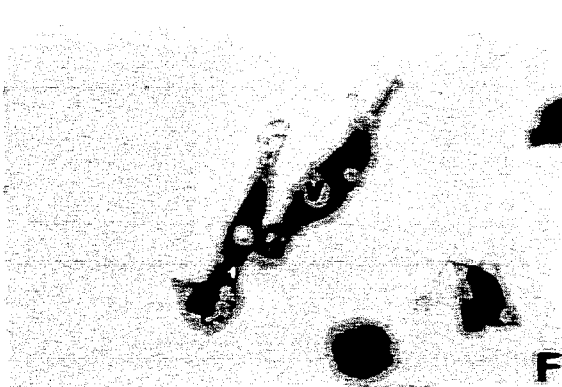
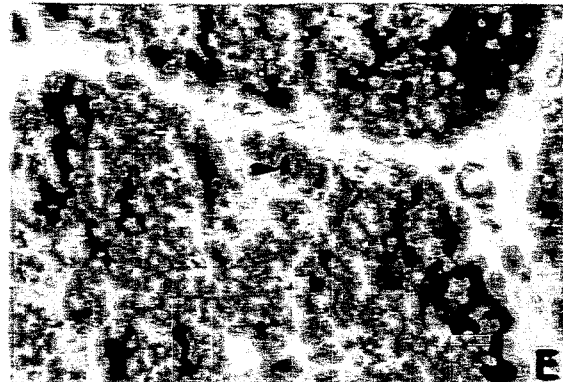
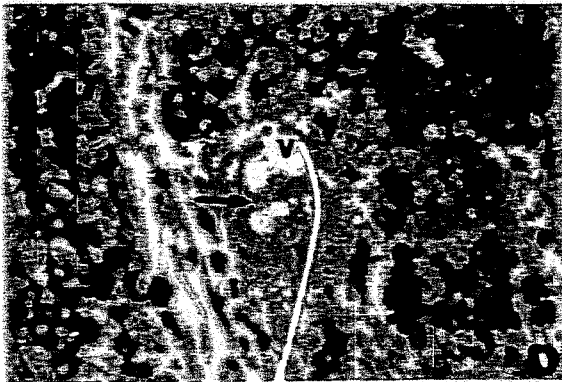
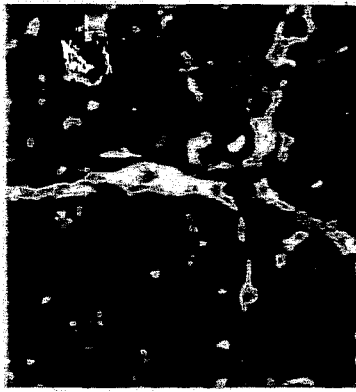


Figure 6: Immunocytochemical detection of c-Rel in lymphocyte precursor cells (LPCs) in E19 thymus. (A) In the marginal cortex (brackets), some LPCs express c-Rel. (B) High magnification showing that c-Rel is localised in the nucleus and cytoplasm of these cells (arrowheads). (C) LPCs are stained in dark blue by the Pappenheim coloration (arrowheads) compared to small cortical thymocytes that are pale blue (arrows). X200 in (A) and X750 in (B) and (C)

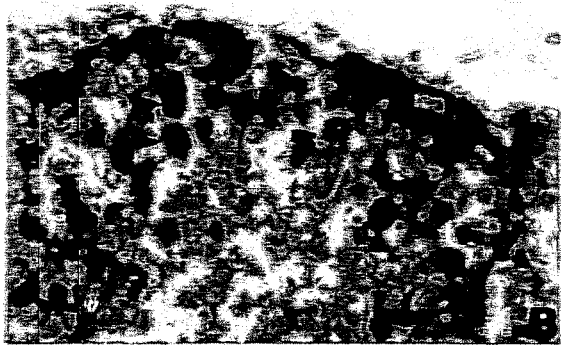


Figure 7: Immunocytochemical detection of c-Rel in LPCs during the first wave of colonization. Pappenheim coloration (A, C, E) and immunocytochemistry (B, D, F). At E8.5: (A) a few large round LPCs are stained dark blue by the Pappenheim coloration (arrows); (B) c-Rel is not detected in these cells. At E9.5: (C) the thymus is filled up with dark blue stained LPCs; (D) the majority of these cells express c-Rel and the protein is detected in the cytoplasm (arrowhead) or both in the nucleus and cytoplasm (arrows). At E11, (E) the thymus mainly contains differentiating thymocytes that are small cells stained in pale blue; (F) they do not express c-Rel. X550

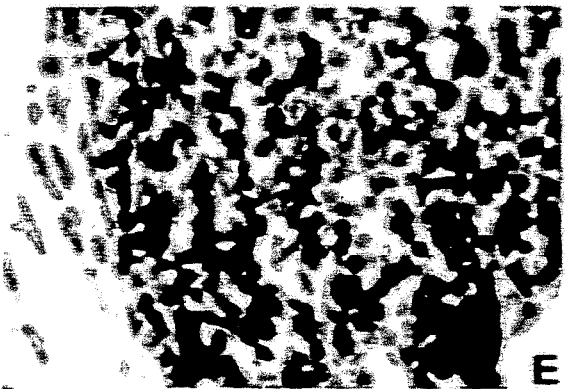
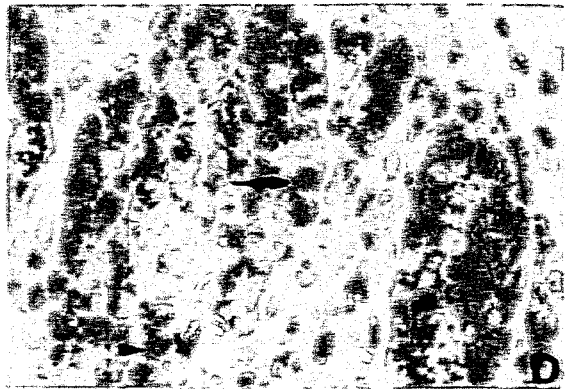
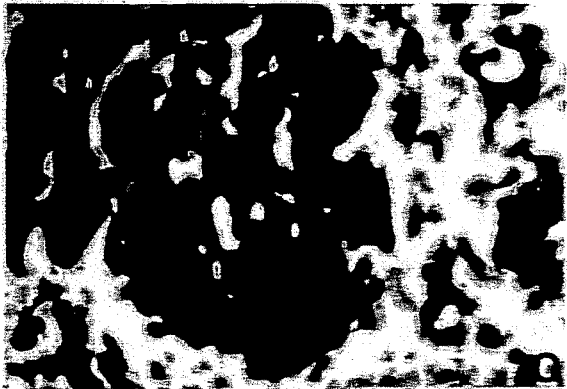


Figure 8: *In situ* hybridization analysis of *ikba* expression in E19 thymus and primary cell culture. (A, C, F and H) Hoechst staining, (B, D, E, G and I) *in situ* hybridization. (A and B) At E19, *ikba* is highly expressed in the medulla (M). (C and D) Higher magnification of the medulla shows *ikba* expression in clusters of large cells appearing as dark areas (arrows) and in medullary thymocytes (arrowheads). (E) *ikba* expression in primary culture of macrophages and dendritic cells. (F and G) *ikba* is also expressed in endothelial cells (arrow) and (H and I) in epithelial cells lining the cortical lobules (arrows). X200 in (A) and (B), X550 in (C), (D) and (E), X300 in (F), (G), (H) and (I)

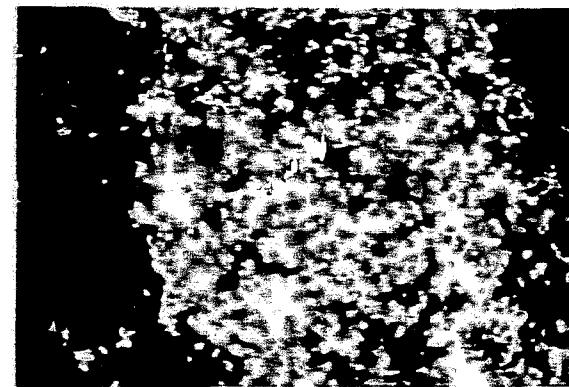
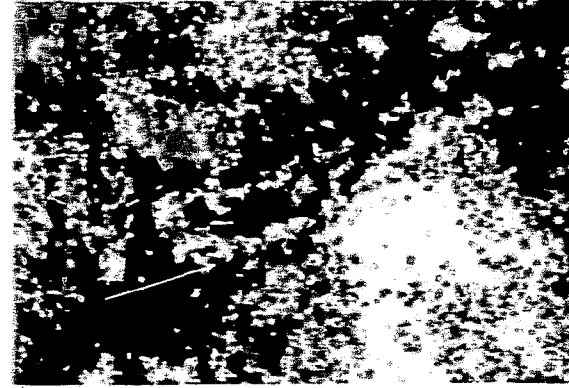
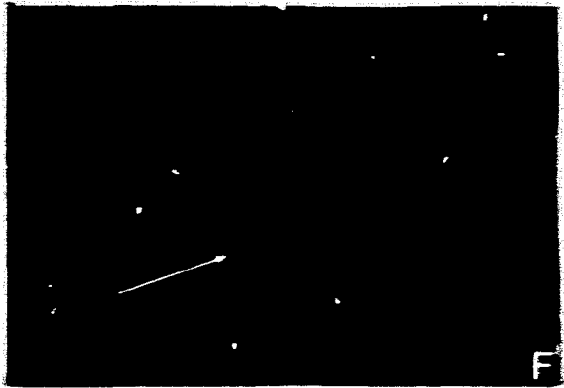
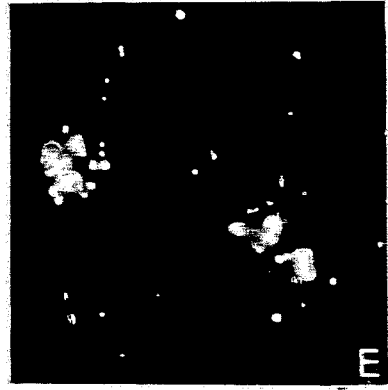
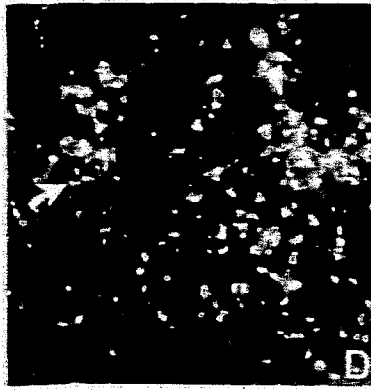
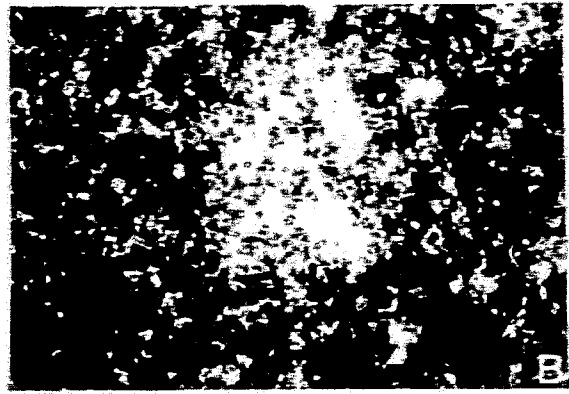
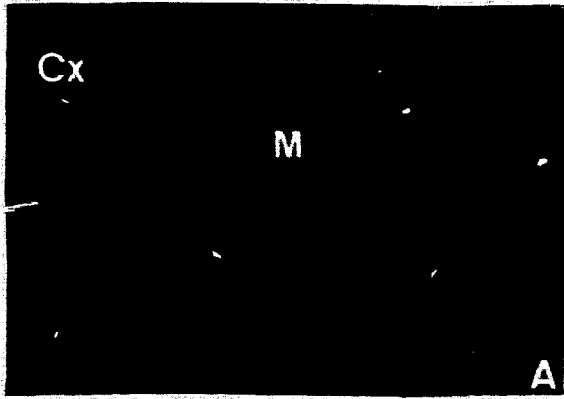
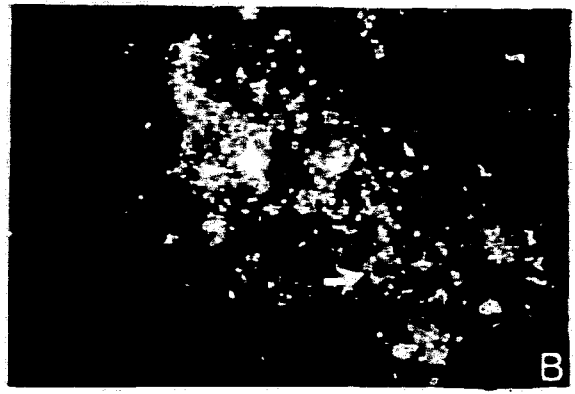
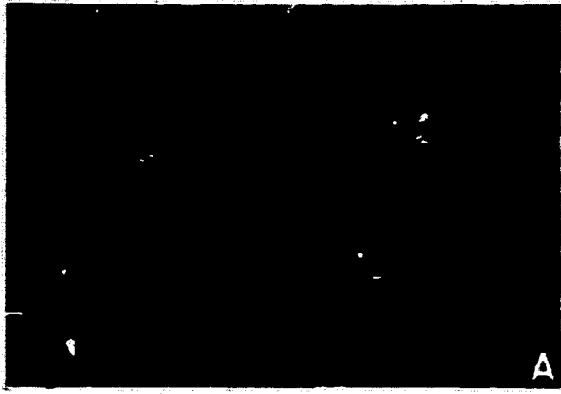


Figure 9: *In situ* hybridization analysis of *ikba* expression in E9.5 thymus. (A) Hoechst staining and (B) *in situ* hybridization. At E9.5, *ikba* is heterogeneously expressed throughout the organ. LPCs, which represent the majority of cells, only express low levels of *ikba* (arrows). High expressing cells (arrowheads) can not be clearly identified. X200.



3.2.2 Discussion

Notre étude révèle pour la protéine aviaire c-Rel deux sites d'expression liés, directement ou indirectement, à la maturation des cellules T.

3.2.2.1 c-Rel est exprimé dans le noyau des cellules précurseurs de lymphocytes

Les expériences d'immunohistochimie mettent en évidence une expression de la protéine c-Rel dans une sous-population particulière de thymocytes, les cellules précurseurs de lymphocytes (LPCs pour Lymphocyte Precursor Cell), en d'autres termes les cellules T les plus immatures de cet organe.

La colonisation du thymus par les LPCs a été décrite grâce à l'étude d'animaux chimères caille-poulet (Le Douarin and Jotereau, 1975; Coltey et al., 1987). Trois vagues successives de LPCs coloniseront le thymus : la première entre le jour 6.5 (E6.5) du développement et le jour 8 (E8), puis entre E12 et E14 et enfin à partir de E18 se déroule la dernière vague, qui sera suivie à l'âge adulte d'un renouvellement lent mais continu des LPCs. Entre ces périodes, le thymus est réfractaire à l'entrée des LPCs. Une fois arrivées dans le thymus, les LPCs restent dans une courte phase de dormance avant d'entrer en prolifération puis en différenciation (Jotereau and Le Douarin, 1982). La différenciation donnera naissance à trois lignées de cellules T. Les premiers lymphocytes complètement différenciés apparaissent à E12 et expriment le récepteur de surface TCR1/CD3. Les cellules exprimant le complexe TCR2/CD3 apparaissent à E14-15 et les lymphocytes TCR3/CD3 sont les derniers à se différencier à partir de E17 (pour revue Dietzen-Lièvre, 1994).

A E8.5, après la première vague de colonisation, les quelques LPCs du thymus n'expriment pas la protéine c-Rel. A E9.5, le nombre de LPCs dans le thymus s'est considérablement accru et la plupart de ces cellules expriment c-Rel. Cette expression de la protéine n'est plus détectée à E11 quand les cellules sont en phase de différenciation comme en témoigne la perte du caractère très immature révélée par la coloration hématologique de

Pappenheim. L'expression de c-Rel dans les LPCs semble donc correspondre à la phase de prolifération à E9.5. Des LPCs exprimant c-Rel sont également détectés dans le cortex thymique à E19. Cependant, lors de cette vague de colonisation, des corrélations temporelles entre l'expression de c-Rel et les phases de dormance, prolifération et différenciation sont plus difficile à établir car les limites et la durée de cette vague sont moins bien définies.

Une caractéristique importante de l'expression de la protéine c-Rel dans les LPCs est qu'elle est présente à la fois dans le noyau et le cytoplasme suggérant une activation constitutive. L'activation constitutive de c-Rel dans des cellules lymphoïdes a déjà été décrite dans des cellules B matures où une dégradation basale importante d'I κ B α est responsable du phénomène (Miyamoto et al., 1994). Nos résultats suggèrent plutôt que dans les LPCs l'expression transcriptionnelle faible d'I κ B α serait à l'origine de la localisation nucléaire constitutive de c-Rel. Il est clair que ces résultats devront être complétés d'une analyse de l'expression protéique d'I κ B α afin de préciser le mécanisme impliqué.

Une fonction de c-Rel dans la prolifération est suggérée par les différentes études montrant qu'elle induit la transformation de fibroblastes par un allongement de la durée de vie et une stimulation de la prolifération (Abbadie et al., 1995; Kralova et al., 1994).

L'expression nucléaire constitutive de c-Rel dans les LPCs représente le premier argument décrit en faveur d'une fonction *in vivo* de c-Rel dans la prolifération de précurseurs lymphoïdes très immatures.

3.2.2.2 c-Rel est exprimé dans le cytoplasme des cellules présentatrices d'antigènes

Dans le thymus aviaire de E15 à E19, on détecte une expression de c-Rel dans les cellules épithéliales, les cellules dendritiques et les macrophages. Ces trois types de cellules présentatrices d'antigènes (APCs pour Antigen Presenting Cells) présentent des antigènes de surface communs et en particulier des molécules du MHC (Peck et al., 1982; Guillemot et al., 1984; Boyd et al., 1992). Elles gouvernent la maturation des cellules T via des interactions entre le MHC et le TCR (pour revue Nossal, 1994; von Boehmer, 1994). Des études ont montré que

c-Rel peut induire l'expression des molécules du MHC de classe I et II dans les cellules lymphoïdes où elle est surexprimée (Hrdlickova et al., 1994). Le rôle de c-Rel dans les APCs *in vivo* pourrait donc être de réguler l'expression des gènes du MHC. De plus, spécifiquement dans les macrophages, c-Rel pourrait induire l'expression du lysozyme qui est impliqué dans des fonctions anti-bactériennes, car il représente un de ses gènes cible dans ces cellules (Phi Van, 1996).

Des expériences réalisées *in vitro* montrent qu'I κ B α est capable de séquestrer c-Rel dans le cytoplasme (Davis et al., 1991; Kerr et al., 1991). Nos résultats montrent qu'*in vivo* la localisation cytoplasmique de c-Rel dans les cellules présentatrices d'antigènes est toujours associée à une forte expression d'I κ B α , ce qui suggérerait que c-Rel est également séquestrée par I κ B α *in vivo*.

De ce travail, il ressort que l'expression de la protéine aviaire c-Rel dans le thymus est moins restreinte que celle de la protéine murine c-Rel qui est limitée aux cellules épithéliales médullaires. De plus, chez la souris aucune expression dans les LPCs n'a été décrite (Carrasco et al., 1994). Enfin, l'expression d'I κ B α dans le thymus est essentiellement corticale chez la souris alors qu'elle est médullaire chez le poulet (Weih et al., 1994).

En conclusion, les deux protéines c-Rel aviaire et murine seraient impliquées indirectement dans la maturation des cellules T par le biais des cellules présentatrices d'antigènes mais seule la protéine aviaire c-Rel présenterait une fonction dans la lymphopoïèse précoce au niveau des cellules précurseurs de lymphocytes en prolifération.

3.3 Expression du facteur de transcription c-Rel au cours de l'apoptose thymocytaire

3.3.1 Résumé de l'article

Dans cette étude nous nous intéressons plus particulièrement à l'expression du facteur de transcription c-Rel au cours de l'apoptose thymocytaire. *In vivo*, seuls quelques thymocytes corticaux expriment la protéine c-Rel. Leur nombre, leur répartition et leur morphologie les désignent comme correspondant aux thymocytes apoptotiques du cortex mis en évidence par une détection immunohistochimique de la dégradation de l'ADN *in situ* (TUNEL).

Quand l'apoptose est induite dans les thymocytes médullaires en culture organotypique, l'expression de la protéine c-Rel est elle aussi induite. Cette induction semble être post-transcriptionnelle car nous ne détectons aucune augmentation de la transcription du gène *c-rel*. De plus, nous mettons en évidence une activation de la protéine c-Rel qui migre dans le noyau des thymocytes médullaires lors de l'induction de l'apoptose. Cette activation est précédée d'une décroissance spécifique de l'expression du gène *itih2*.

Ces résultats suggèrent que c-Rel pourrait prendre part au déroulement de l'apoptose thymocytaire naturelle lors de la sélection des cellules T *in vivo* et lors de l'apoptose induite expérimentalement.

ARTICLE 4

The avian transcription factor c-Rel is induced and translocates into the nucleus of thymocytes undergoing apoptosis

Hugnet Christelle¹, Mattot Virginie¹, Bouali Fatima¹, Stähelin Dominique², Vandembonder Bernard¹ and Abbadie Corinne^{1*}

¹Régulation des processus invasifs, de l'angiogenèse et de l'apoptose, EPS60-CNRS/Institut Pasteur de Lille, Institut de Biologie de Lille, 1 rue du Professeur Calmette, BP 447, 59021 Lille, France.

²Mécanismes du développement et de la cancérisation, UMR319 CNRS/Institut Pasteur de Lille, Institut de Biologie de Lille, 1 rue du Professeur Calmette, BP447, 59021 Lille, France.

*Corresponding author, email: cabbadie@ofabiogen.fr, Fax: 33 3 20371019, Phone: 33 3 20371090

Running title : Expression of c-Rel and I κ B α during apoptosis of thymocytes.

Abbreviations : NF- κ B : Nuclear Factor- κ B

TUNEL : TdT-mediated dUTP Nick End Labelling

RHD : Rel Homology Domain

AEC : 3-amino-9-ethylcarbazole

This manuscript contains 23 pages and 6 figures

Abstract

This study investigates the involvement of the avian transcription factor c-Rel in thymocyte apoptosis occurring either *in vivo* or in organotypic culture. *In vivo*, only a few cortical thymocytes express the c-Rel protein. Their number, localization and morphology resemble that of apoptotic cells evidenced by TUNEL staining. In organotypic culture, the expression of c-Rel is induced in medullary thymocytes as apoptosis is triggered. This induction would be post-transcriptional since no increase in the *c-rel* gene expression is detected. Moreover, c-Rel translocates into the nucleus of medullary thymocytes during the time course of apoptosis. This translocation is preceded by a decrease in *ikba* expression, the gene which encodes the avian homologue of I κ B α . Altogether these results suggest that the proto-oncogene *c-rel* could take an active part in apoptosis of cortical thymocytes occurring *in vivo* during T-cell selection as well as in experimentally-induced apoptosis of medullary thymocytes.

Keywords

Rel/NF- κ B, Transcription Factor, Apoptosis, Avian Thymus

Introduction

Cell fate depends on informations addressed by the extracellular environment via the cell membrane and through various signaling cascades to the nucleus. In response, a wide array of genes are switched "on" and "off" leading to cell proliferation, differentiation or death. Switch of gene expression is driven by transcription factors which are usually classified in families, where individual members perform specific or similar tasks. Rel/NF- κ B transcription factors form one of these families; every member shares a highly conserved 300 amino acids N-terminal domain, the Rel Homology Domain (RHD), which contains sequences necessary for DNA binding, dimerization, nuclear localization and interaction with inhibitory proteins of the I κ B family. Rel/NF- κ B proteins associate as homo- or heterodimers and bind a specific DNA sequence, the κ B motif, in the promoter of their target genes. In most cell types, Rel/NF- κ B dimers are found in an inactive form sequestered in the cytoplasm by an ankyrin-repeat protein of the I κ B family. Upon stimulation, the I κ B inhibitor is phosphorylated and degraded, thus allowing the transcription factor to enter the nucleus. The Rel/NF- κ B family can be subdivided into two classes based on differences in the C-terminal part of the proteins. The first class includes c-Rel, RelA (p65) and RelB as well as the *Drosophila* proteins Dorsal and Dif. These proteins contain in their C-terminal part a transactivating domain. The second class consists of p50 and p52, two proteins devoid of transactivating domain and proteolytically generated from precursor proteins, p105 (or NF κ B1) and p100 (or NF κ B2) respectively. p50 or p52 do not generally activate transcription as homodimers, but they become potent transactivators when they heterodimerize with RelA or c-Rel. Interestingly, p105 and p100 precursors contain I κ B-like ankyrin-repeats at their C-terminus and behave as inhibitory proteins by complexing and retaining Rel/NF- κ B factors in the cytoplasm. These ankyrin-repeats are eliminated by proteolytic maturation (for reviews see Miyamoto and Verma, 1995 and Gilmore et al., 1996). Rel/NF- κ B transcription factors are ubiquitously expressed, activated by a great variety of stimuli and able to regulate the expression of genes as different as genes encoding immunoreceptors, cytokines or cell-adhesion molecules (for review see Banerle and Henkel, 1994). Altogether these data suggest that Rel/NF- κ B transcription factors could be involved in

numerous physiological processes. Investigation of Rel/NF- κ B physiological functions began with the study of the proto-oncogene *c-rel* which was the first Rel/NF- κ B gene cloned as the cellular homologue of the oncogene *v-rel* (for review see Huguet et al., 1994). Northern-blot analysis has revealed that the expression of *c-rel* is restricted to hematopoietic organs such as the bursa of Fabricius, thymus, spleen and bone-marrow (Moore and Bose, 1989). However, *in situ* hybridization experiments performed in young embryos from 3 to 9.5 days of development have indicated that *c-rel* is ubiquitously expressed at low levels while high levels of transcripts were detected in cells exhibiting an apoptotic morphology (Abbadie et al., 1993). These expression patterns suggested that *c-rel* may function in hematopoiesis and apoptosis. To evaluate the causal link between the expression of *c-rel* and the occurrence of apoptosis, the protein was overexpressed in two different types of primary cells. Chick embryo fibroblasts overexpressing c-Rel acquired a transformed phenotype and an extended life span in culture. In contrast, bone marrow cells overexpressing c-Rel failed to grow in culture and underwent programmed cell death (Abbadie et al., 1993). The *c-rel* functions in mammals were investigated more recently by the description of its expression pattern in embryonic and adult mice and by the establishment of *c-rel* mice. In contrast to chicken *c-rel*, mouse *c-rel* transcripts were detected late in the embryonic development and restricted to hematopoietic organs. This pattern was conserved in the post-natal period. The c-Rel protein was found in erythroid precursors of the fetal liver, in mature splenic B cells and in thymic epithelial cells (Carrasco et al., 1994). *c-rel*-deficient mice exhibited an impaired immunity attributable to defects in the activation of mature B and T-cells but surprisingly no developmental defect in the hematopoietic system. In addition, no change in the occurrence of apoptosis was noticed (Köntgen et al., 1995). Thus, whereas a clear *in vivo* function of mouse *c-rel* is now established in the specific immune response, the significance of *c-rel* expression during embryonic development of hematopoietic organs remains elusive. Moreover, discrepancies between mouse and chicken were evidenced concerning the expression and function of *c-rel* in apoptosis. This prompted us to further study the proto-oncogene *c-rel* in the avian system and to focus on its involvement in apoptosis. The thymus was chosen as model since T-cell maturation and selection include the

elimination of numerous non-functional thymocytes by apoptosis (for reviews see von Boehmer, 1994 and Nossal, 1994).

We describe here the expression of *c-rel* during normal thymocyte apoptosis occurring *in vivo* and after induction of massive apoptosis in thymus organ culture. Since the activity of Rel/NF- κ B proteins depends on interactions with I κ B proteins that determine their nuclear or cytoplasmic localization, we have described the subcellular distribution of the c-Rel protein during the process of apoptosis together with the expression of *ikba*, the gene encoding the avian homologue of I κ B α (Davis et al., 1991), (Kerr et al., 1991). Our results indicate that the c-Rel protein is expressed in thymocytes undergoing apoptosis through natural selection and moreover that c-Rel is induced and translocates into the nucleus of thymocytes during the time course of experimentally-induced apoptosis. This nuclear translocation of c-Rel is preceded by a decrease in *ikba* expression.

Results

c-Rel is expressed during thymocyte apoptosis occurring through natural selection.

To evaluate the involvement of *c-rel* in apoptosis of thymocytes, we have studied the expression of the c-Rel protein by immunocytochemistry with an immunopurified anti-cRel antibody during thymus development. Since no data was available about the occurrence of apoptosis in the avian thymus, we have first performed a study by TUNEL, a method which reveals apoptotic cells by detecting DNA strand breaks (Gavrieli et al., 1992). Experiments were done at four representative stages of the chick thymus development : at E9.5 when the thymic rudiment mainly contains thymocyte precursors; at E15 when cortical and medullary areas begin to separate indicating that thymocyte maturation is engaged and at E19 or P1 when the thymic structure is completed. At E9.5, almost no apoptotic cells are detected (data not shown). At E15, E19 and P1, apoptotic cells are mainly found in the cortex scattered among numerous healthy thymocytes whereas only a few apoptotic thymocytes are detected in the medulla (fig 1). The major difference between E15, E19 and P1 is the amount of apoptotic thymocytes which increases from E15 to P1. It should be noticed that only a low number of apoptotic thymocytes are detected *in situ* in spite of the high number of thymocytes that are eliminated through natural selection (Egerton et al., 1990). This apparent paradox can be explained considering that apoptosis is a rapid phenomenon and that dead cells are efficiently engulfed. In view of these results, we have focused our analysis of the expression of c-Rel in the cortex of thymuses from E15 to P1. The vast majority of cortical thymocytes do not express c-Rel. However, a few c-Rel-expressing thymocytes can be detected scattered all over the cortex. They are generally isolated among negative thymocytes but they can also form clusters (fig 2a-d). A few c-Rel-expressing thymocytes appear condensed or even fragmented. The cellular components are round and grouped by two to three or have an irregular and damaged morphology (fig 2f and g). TUNEL-positive cells also appear isolated or in clusters, condensed or fragmented in apoptotic bodies more or less damaged (fig 2a, b and c). From these morphological similarities between c-Rel-expressing cells and TUNEL-positive cells, we assumed that the cortical thymocytes that express c-Rel undergo apoptosis.

c-Rel translocates into the nucleus of medullary thymocytes undergoing experimentally-induced apoptosis.

The scarceness of apoptotic thymocytes observable in a thymus section makes their *in situ* study difficult. To bypass this limitation and to check whether c-Rel is activated when thymocytes undergo apoptosis, we have developed a protocol for the induction of massive apoptosis inside the thymus. Dissection and organotypic culture of E19 or P1 thymuses in complete RPMI medium, at 40 °C, with 10% CO₂ create a stress sufficient to induce thymocyte apoptosis. TUNEL staining revealed that apoptosis occurs first in the medulla after 2 hours in culture. The number of TUNEL-positive thymocytes increases in the course of the culture and at 4 hours the majority of medullary thymocytes are apoptotic (fig 3b, d, f and h). Interestingly, 4 hours in culture do not affect the level of apoptosis occurring in the cortex. However, when the culture is maintained over 24 hours, cortical thymocytes also undergo apoptosis (data not shown). Stromal cells remain unaffected by the culture until 5 hours (data not shown). According to these results, we have studied the expression of c-Rel in medullary thymocytes of thymuses maintained in organotypic culture up to 4 hours. Thymuses were fixed at different times of culture and serial sections were processed either for immunocytochemistry or TUNEL staining. Experiments were done both with E19 and P1 thymuses and gave identical results. In control thymuses, medullary thymocytes do not express c-Rel and are TUNEL-negative (fig 3a and b). Beside thymocytes, some medullary cells express c-Rel; they were previously identified as dendritic cells, epithelial cells and macrophages (Huguet et al., 1997). After 1 hour in culture, no change appears either in the expression of c-Rel or in the occurrence of apoptosis. After 2 hours in culture, c-Rel is faintly detected in numerous medullary thymocytes which still display a healthy morphology. The TUNEL staining reveals only a few positive cells, indicating that most thymocytes are still healthy but that apoptosis has already begun (fig 3c and d). After 3 hours in culture, a great number of medullary thymocytes are TUNEL-positive. Numerous thymocytes express c-Rel and among them some are highly stained (fig 3e and f). After 4 hours in culture, almost all medullary thymocytes are apoptotic; they are highly positive in

immunocytochemistry (fig 3g and h). These results indicate that, in thymocytes, c-Rel expression is induced when apoptosis is induced.

To evaluate the activation of c-Rel during the process of apoptosis, we have determined its subcellular localization by observing the sections at high magnification. From 2 to 4 hours in culture, the c-Rel protein is generally localized in the cytoplasm of thymocytes (fig 4a). However, at 3 and 4 hours in culture, several thymocytes display a staining of both the cytoplasm and the nucleus, with however a higher staining of the cytoplasm (fig 4b and e). c-Rel is also detected in condensed thymocytes and in apoptotic bodies with an homogenous distribution, suggesting a localization in both the condensed cytoplasm and nucleus (fig 4d). Therefore, c-Rel could be activated to translocate into the nucleus during apoptosis. To better address this point, we have performed western-blot analysis on nuclear and cytoplasmic extracts of thymus prepared at different times of culture. In control thymuses and until 2 hours in culture, the c-Rel protein is mainly found in the cytoplasmic fraction; very few amounts of protein are detected in nuclear extracts. At 3, 4 and 5 hours in culture, c-Rel amounts in the nuclear fraction are clearly higher than in control thymuses (fig 5) indicating that c-Rel has translocated into the nucleus from 3 hours of culture onwards. Taken together, immunocytochemistry and western-blot experiments show that c-Rel is induced and activated to translocate into the nucleus during thymocyte apoptosis.

The *I κ B α* gene expression decreases in thymocytes during apoptosis.

In order to investigate the mechanism of c-Rel induction and nuclear translocation during experimentally-induced apoptosis, we have examined the expression of the *c-rel* and *I κ B α* genes by *in situ* hybridization. *I κ B α* encodes the avian homologue of I κ B α which was shown to be able to sequester the avian c-Rel protein in the cytoplasm and to inhibit its binding to DNA (Diehl et al., 1993, Kerr et al., 1991, Davis et al., 1991). Experiments were done with E19 and P1 thymuses and gave similar results. Serial sections were used for immunocytochemistry, TUNEL staining and *in situ* hybridization experiments and thus any changes in either gene expression, protein expression or occurrence of apoptosis were directly correlable. In control thymuses, *c-rel* mRNAs are detected in both the cortex and the medulla (fig 6a and c) with a

higher level in medullary stromal cells (Huguet et al., 1997). In contrast, *ikba* is highly expressed in the medulla and more faintly in the cortex (fig 6e and g). Inside the medulla, stromal cells give the most intense signal but it has to be noticed that thymocytes also highly express *ikba* (Huguet et al., 1997). After 1 hour in culture, no change is observed in the expression of the *c-rel* and *ikba* genes. After 2 hours in culture, *c-rel* mRNA expression remains stable (fig 6b and d) although, as described above, the c-Rel protein expression is already induced. In contrast, *ikba* expression decreases in thymocytes whereas it remains unchanged in stromal cells (fig 6f and h). It has to be reminded that at this stage the c-Rel protein is mainly localized in the cytoplasm of thymocytes and that its nuclear translocation is evidenced especially from 3 hours in culture. Therefore, the decrease in *ikba* expression precedes and could account for the translocation of c-Rel into the nucleus of thymocytes undergoing apoptosis. After 3 and 4 hours in culture, *ikba* expression still decreases but *c-rel* expression decreases too (data not shown). According to the high number of apoptotic bodies in the medulla at 3 and 4 hours of culture, we estimated that decreases in gene expression are not due to specific mechanisms of regulation but rather to a too far engagement of the cells in the death process.

Discussion

Previous studies have shown that the mouse proto-oncogene *c-rel* is involved at two different levels in T-cell development : in mature T-cell activation and in T-cell education via an indirect role in thymic epithelial cells (Carrasco et al., 1994, Köntgen et al., 1995). No relationship between the expression of mouse *c-rel* and apoptosis could be evidenced in these experiments, thus contrasting with results obtained in the avian system where *c-rel* and its viral counterpart *v-rel* have been involved in apoptosis of hematopoietic cells as well as of cells of different origins during embryonic development (Neiman et al., 1991, White et al., 1995, White and Gilmore, 1996, Abbadié et al., 1993). In this study, we have investigated the involvement of the avian proto-oncogene *c-rel* in thymocyte apoptosis.

***c-Rel* is induced in apoptotic thymocytes.**

Considering the high amounts of *c-rel* mRNAs described in apoptotic cells in the avian embryo (Abbadié et al., 1993), we expected such an expression in the thymus cortex where a majority of thymocytes undergo apoptosis (Egerton et al., 1990). Surprisingly, only low levels of *c-rel* transcripts were detected in cortical thymocytes, slightly higher levels in medullary thymocytes and the highest levels were found in non-lymphoid cells (Huguet et al., 1997). Since apoptotic thymocytes are buried among numerous healthy cortical thymocytes, it was not possible to identify them in the *in situ* hybridization experiments and therefore to evaluate their level of *c-rel* expression. By contrast, we were able to show by immunocytochemistry that the *c-Rel* protein is only expressed in a few isolated cortical thymocytes that could be apoptotic since their number, localization and morphology resemble that of TUNEL-positive cells. This result suggesting that *c-Rel* could be induced during apoptosis, we have developed an assay to test whether *c-Rel* is induced when apoptosis is triggered experimentally. The organ culture protocol used for mouse thymus has been adapted to the very young E10 chick thymus (Davidson et al., 1992). When we applied this technique to fully developed E19 or P1 thymuses, medullary thymocytes underwent massive apoptosis within a few hours. This event may be induced by

hypoxia as well as lack of cytokines or hormones, all stresses known to induce apoptosis. However, in these conditions, the deepest cortical thymocytes did not undergo apoptosis, suggesting that medullary thymocytes are the most sensitive to stress-induced apoptosis. Our results show that the c-Rel protein became detectable, as soon as 2 hours in culture, in the cytoplasm of most medullary thymocytes. At this stage, these thymocytes still appeared healthy, although apoptosis has already begun as evidenced by the presence of a few TUNEL-positive cells. Most thymocytes progressed into fully apoptotic cells from 3 hours in culture and the expression of c-Rel became conspicuous. We therefore consider that after 2 hours in culture most thymocytes were committed to die. Thus, the c-Rel protein would be induced in medullary thymocytes committed to die upon apoptotic stimulation. This induction would occur by a post-transcriptional mechanism since no increase in *c-rel* mRNA expression was detected before or during apoptosis. In conclusion, our results suggest that c-Rel is involved in naturally-occurring apoptosis of cortical thymocytes as well as in stress-induced apoptosis of medullary thymocytes.

c-Rel translocates into the nucleus of thymocytes during apoptosis.

As shown above, during organotypic culture c-Rel was first detected in the cytoplasm of thymocytes committed to die. During the time course of apoptosis, the subcellular localization of c-Rel changes : from 3 hours in culture onwards, c-Rel can be found either in the cytoplasm or in both the cytoplasm and the nucleus of thymocytes still healthy in appearance or already condensed. This change in subcellular localization was confirmed by western-blot experiments. Therefore, c-Rel seems to translocate from the cytoplasm into the nucleus of thymocytes during apoptosis. Once in the nucleus, c-Rel might modulate the transcription of some target genes involved in the mechanism of apoptosis. However, the transcriptional activity of c-Rel during thymocyte apoptosis remains to be established and target genes have to be identified.

Mechanism triggering the c-Rel nuclear translocation.

In many cell types, Rel/NF- κ B proteins are expressed in an inactive form sequestered in the cytoplasm by an I κ B protein. The major pathway allowing the activation of Rel/NF- κ B proteins

involves the phosphorylation of I κ B α and its subsequent ubiquitination and degradation by the proteasome (review in Verma et al., 1995). Our results show that there is no detectable preexisting c-Rel proteins in medullary thymocytes before the apoptotic stimulation, indicating that the molecules which enter the nucleus are neo-synthesized. Moreover, we have previously shown that the *ikba* gene is highly expressed in medullary thymocytes of control thymuses (Huguet et al., 1997). Therefore, to investigate the mechanism of avian c-Rel nuclear translocation in apoptotic thymocytes, we examined *ikba* gene expression. From 2 hours in culture, i.e. before the beginning of the nuclear translocation of c-Rel, *ikba* expression decreases. Thus, the c-Rel protein would not be sequestered as its synthesis proceed and could be able to enter the nucleus. Although the *ikba* gene expression was shown to be upregulated by overexpressed c-Rel in avian fibroblasts (Schatzle et al., 1995), we did not observe such an upregulation in medullary thymocytes from 3 hours of culture. These results are the first example of an activation of c-Rel that would occur through a decrease in the transcriptional activity of *ikba*. However, whether this decrease is alone sufficient for a complete c-Rel activation or whether it occurs together with an active degradation of the I κ B α protein remains to be established.

Involvement of different Rel/NF- κ B members in apoptosis.

The involvement of the avian c-Rel protein in apoptosis was previously shown for a variety of non-lymphoid cells of the avian embryo as well as for bone marrow cells (Abbadie et al., 1993). Here, we present evidence for a role of c-Rel in the apoptosis of avian thymocytes occurring *in vivo* during selection as well as in stress-induced apoptosis of medullary thymocytes. Other Rel/NF- κ B members were shown to be able to induce or repress apoptosis. In a mouse T-cell hybridoma, overexpression of Bcl-2 blocked dexamethasone-induced apoptosis and led to a decrease in RelA/p50 heterodimers and an increase in p50/p50 homodimers by a post-transcriptional mechanism (Ivanov et al., 1995). Likewise, disruption of the mouse RelA gene induced severe hepatocyte apoptosis (Beg et al., 1995). Treatment with TNF- α of embryonic fibroblasts and macrophages derived from these RelA-deficient mice resulted in a dramatic decrease in viability, thus suggesting that RelA protects cells from

apoptosis (Beg and Baltimore, 1996). Similar conclusions were drawn from studies using human fibrosarcoma cells, human primary fibroblasts and human Jurkat T-cells overexpressing a super-repressor form of I κ B α . When treated by TNF- α , these cells were more susceptible to apoptosis than control cells (Wang et al., 1996, Van Antwerp et al., 1996). However, in human 293 kidney cells, overexpression of a dominant-negative RelA protein inhibited apoptosis suggesting that in that case RelA induces cell death (Grimm et al., 1996). Finally, one experiment done with HeLa cells has evidenced the ability of c-Rel to protect against TNF-induced apoptosis, even with a more efficiency than RelA (Lin et al., 1996). Taken together, these conflicting results illustrate the possibility that different Rel/NF- κ B members may be activated upon apoptotic stimulation resulting in stimulation or inhibition of apoptosis depending on cell type or species.

Material and methods

Animals

Fertilized white Leghorn chicken eggs were incubated at 39°C in a humidified air chamber. The age of embryos is indicated as E1, E2, ..., E1 corresponding to 24h of egg incubation and as P1 corresponding to 24h post-hatching.

Histological sections

E9.5, E15, E19 and P1 chick embryo thymuses were dissected in PBS and fixed at 4°C for 18 hours in 4% paraformaldehyde in PBS ($\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 0.1 M pH7.4), embedded in paraffin and processed for histological sections.

Thymus organ culture

E19 and P1 thymuses were rapidly dissected in culture medium (RPMI 1640, 10% FCS, 2% chicken serum, 1000 IU.ml⁻¹ penicillin, 1000 µg.ml⁻¹ streptomycin, 2 mM glutamine) on ice. Organs were set to float on top of millicell chambers in 6 well culture plates (Millipore) filled up with culture medium. The culture was carried out from 1 to 24 hours, at 40°C, in 10% CO₂, 95% humidity.

In situ hybridization

1) Synthesis of ³⁵S RNA probes

The chicken full length *c-rel* c-DNA was cloned in Bluescript SK⁻ (Stratagene) as described in (Abbadie et al., 1993). A 0.9 kb EcoRI fragment from the chicken *ikba* cDNA, kindly provided by H. Bose, was cloned in Bluescript SK⁻ phagemid (Stratagene). ³⁵S RNA probes were transcribed from 2 µg of linearized plasmids by 20 U of either T7, T3 or SP6 RNA polymerase for sense and antisense probes in a 20 µl reaction mixture containing 200 µCi ³⁵S-CTP (1300 Ci/mole), 200 µM UTP, ATP and GTP for 1 h at 39°C. To facilitate their penetration into cells, probes were submitted to a limited alkaline hydrolysis generating fragments of approximately 150 bases as recommended by Cox et al., 1984.

b) *In situ* hybridization

In situ hybridization was adapted from the method of Cox et al., 1984, as described by Quéva et al., 1992. Briefly, after being deparaffinized and rehydrated, sections were incubated in 0.1 M glycine, 0.2 M Tris-HCl pH7.4 for 10 min at 20°C, treated with 1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ proteinase K (Boehringer Mannheim) for 15 min at 37°C, post-fixed in 4% paraformaldehyde, washed in PBS, acetylated 10 min with 0.25% acetic anhydride in 0.1M triethanolamine, washed in 2X SSC (0.3 M NaCl, 30 mM sodium citrate) and dehydrated in ethanol. ^{35}S RNA probes were denatured at 80°C and diluted in the hybridization buffer at a concentration of 50 $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Hybridization was performed at 60°C for 18 h. After a wash in 4X SSC at 20°C, slides were treated with 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ of RNase A (type III A, Sigma) for 30 min at 37°C, subsequently washed in 0.1X SSC at 60°C, dehydrated by ethanol and dipped in nuclear track emulsion (Kodak NTB2). Slides were exposed at 4°C for 2 weeks. After developing, sections were stained with a DNA intercalating fluorescent dye (Hoechst 33258), mounted and observed under dark-field and UV illumination with a Zeiss microscope. Both antisense and sense probes were used and the sense probes never gave any signal.

Immunocytochemistry and Western-blot

a) Antibodies

A rabbit immuno-purified anti-c-Rel serum (SB146) raised against the 15 carboxy terminal amino acids specific of the chicken c-Rel protein (Abbadie et al., 1993) was used both in western-blot and immunocytochemistry experiments. Normal rabbit immunoglobulin fraction (Dako) was used as negative control.

b) Immunocytochemistry

After being deparaffinized and rehydrated, sections were incubated in 0.5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ saponine (Sigma) in PBS for 30 min; then endogenous peroxidase activity was quenched by incubation in 80% methanol, 20% PBS, 0.6% H_2O_2 for 30 min followed by 30 min saturation in 5% milk in PBS. Sections were incubated with the primary antibody overnight at 4°C. After three washes in PBS, the EXTRA-3 kit (Sigma Immunochemicals) and the AEC substrate system

(Dako) were used to detect the primary antibody. Sections were counterstained with hematoxylin (Sigma) and mounted in Glycergel (Dako).

c) Western-blot of cytoplasmic and nuclear extracts

To separate nuclear from cytoplasmic proteins, cultured thymuses were collected in a solution containing 0.015 M HEPES pH7.9, 0.014 M β -mercaptoethanol, 0.3 M Saccharose, 0.060 M KCl, 0.015 M NaCl, 0.15 mM spermine, 0.5 mM spermidine, 0.5 mM EGTA, 0.002 M EDTA. After suspension in a Dounce homogenizer on ice, 3% Nonidet P40 was added and samples incubated for 5 min on ice, then centrifuged 2 min at 10,000 g at 4°C. The supernatants containing cytoplasmic proteins were stored in aliquots at -80°C. The pellets of nuclei were resuspended in 9 volumes of NUN 1.IX buffer (1.1 M Urea, 0.33 M NaCl, 1.1% Nonidet P40, 0.27 M HEPES pH7.6), incubated for 15 min on ice, and centrifuged 15 min at 10,000 g at 4°C (Schibler et al., 1983, Lavery and Schibler, 1993). The supernatants containing nuclear proteins were stored in aliquots at -80°C. Protein concentration was measured by optic density at 260 nm. Equiloaded 10% SDS-polyacrylamide gels were run and blotted onto nitrocellulose sheets. Nitrocellulose sheets were saturated 1h with 5% milk in PBS and then incubated overnight at 4°C with SB146. After three washes in PBS, the sheets were incubated with an anti-rabbit antibody for 2 h at room temperature. After washing, the peroxidase activity was revealed by incubation with a chemiluminescent substrate (Enhanced Chemiluminescence system, Amersham).

TUNEL staining

The TUNEL protocol was adapted from the Apoptag kit instructions (APOPTAGTM PLUS, Oncor). Briefly, after being deparaffinized and rehydrated, sections were incubated in 0.1 M glycine, 0.2 M Tris buffer pH7.4 for 10 min at room temperature, then digested by 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ proteinase K in 0.05 M EDTA, 0.1 M Tris buffer pH8 for 15 min at 37°C and finally incubated in 80% methanol, 20% PBS, 0.6% H_2O_2 for 30 min to quench endogenous peroxidase activity. The following steps were carried out as described in the kit. Sections were finally counterstained with hematoxylin and mounted in Glycergel (Dako).

References

- Abbadie, C., Kabrun, N., Bouali, F., Smardova, J., Stéhelin, D., Vandembunder, B., and Errietto, P. (1993). High levels of *c-rel* expression are associated with programmed cell death in the developing avian embryo and in bone marrow cells *in vitro*. *Cell* 75, 899-912.
- Bauerle, P. A., and Henkel, T. (1994). Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 141-179.
- Beg, A. A., and Baltimore, D. (1996). An essential role for NF- κ B in preventing TNF- α -induced cell death. *Science* 274, 782-784.
- Beg, A. A., Sha, W. C., Bronson, R. T., Ghosh, S., and Baltimore, D. (1995). Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF- κ B. *Nature* 376, 167-170.
- Capobianco, A. J., Simmons, D. L., and Gilmore, T. D. (1990). Cloning and expression of a chicken *c-rel* cDNA: unlike p59^{v-rel}, p68^{c-rel} is a cytoplasmic protein in chicken embryo fibroblasts. *Oncogene* 5, 257-265.
- Carrasco, D., Weih, F., and Bravo, R. (1994). Developmental expression of the mouse *c-rel* proto-oncogene in hematopoietic organs. *Development* 120, 2991-3004.
- Cox, K. H., DeLeon, D. V., Angerer, L. M., and Angerer, R. C. (1984). Detection of mRNAs in sea urchin embryos by *in situ* hybridization using asymmetric RNA probes. *Dev. Biol.* 101, 485-502.
- Davidson, N. J., Chen, C. I. H., and Boyd, R. L. (1992). Kinetics of chicken embryonic thymocyte development *in ovo* and *in organ culture*. *Eur. J. Immunol.* 22, 1429-1435.
- Davis, N., Ghosh, S., Simmons, D. L., Tempst, P., Lion, H. C., Baltimore, D., and Bose, H. I. (1991). Rel-associated pp40: an inhibitor of the Rel family of transcription factors. *Science* 253, 1268-71.
- Diehl, J. A., Mac Kinsey, T. A., and Hannink, M. (1993). Differential pp40/I κ B- β inhibition of DNA binding by Rel proteins. *Mol. Cell Biol.* 13, 1769-1778.
- Egerton, M., Scollay, R., and Shortman, K. (1990). Kinetics of mature T-cell development in the thymus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 87, 2579-2582.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y., and Ben-Sasson, S. A. (1992). Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* 119, 493-501.
- Gilmore, T. D., Koedood, M., Piffat, K. A., and White, D. W. (1996). Rel/NF- κ B/I κ B proteins and cancer. *Oncogene* 13, 1367-1378.
- Grimm, S., Bauer, M. K. A., Bauerle, P. A., and Schmalze-Osthoff, K. (1996). Bcl-2 down-regulates the activity of transcription factor NF- κ B induced upon apoptosis. *J. Cell Biol.* 134, 13-23.
- Huguet, C., Bouali, F., Errietto, P. J., Stéhelin, D., Vandembunder, B., and Abbadie, C. (1997). The avian transcription factor c-Rel is expressed in lymphocyte precursor cells and antigen-presenting cells during thymus development. *Submitted*.

- Huguet, C., Enrietto, P. J., Vandenbunder, B., and Abbadie, C. (1994). c-Rel : a multifunctional transcription factor? *Cell Death and Differentiation* 1, 71-76.
- Ivanov, V. N., Deng, G., Podack, E. R., and Malek, T. R. (1995). Pleiotropic effects of Bcl-2 on transcription factors in T cells : potential role of NF- κ B p50-p50 for the anti-apoptotic function of Bcl-2. *International Immunology* 7, 1709-1720.
- Kerr, L. D., Inoue, J., Davis, N., Link, E., Baeverfö, P. A., Bose, H. J., and Verma, I. M. (1991). The rel-associated pp40 protein prevents DNA binding of Rel and NF-kappa B: relationship with I kappa B beta and regulation by phosphorylation. *Genes and Development* 5, 1464-75.
- Köntgen, F., Grumont, R. J., Strasser, A., Metcalf, D., Li, R., Tarlinton, D., and Gerondakis, S. (1995). Mice lacking the *c-rel* proto-oncogene exhibit defects in lymphocyte proliferation, humoral immunity, and interleukin-2 expression. *Genes and Development* 9, 1965-1977.
- Lavery, D. J., and Schibler, U. (1993). Circadian transcription of the cholesterol 7 α hydroxylase gene may involve the liver-enriched bZIP protein DBP. *Genes and Development* 7, 1871-1884.
- Liu, Z., Hsu, H., Goeddel, D. V., and Karin, M. (1996). Dissection of TNF receptor 1 effector functions : JNK activation is not linked to apoptosis while NF- κ B activation prevents cell death. *Cell* 87, 565-576.
- Miyamoto, S., and Verma, I. M. (1995). Rel/NF- κ B/I κ B story. *Adv. Cancer Res.* 66, 255-292.
- Moore, B. E., and Bose, H. R. (1989). Expression of the *c-rel* and *c-myc* proto-oncogenes in avian tissues. *Oncogene* 4, 845-852.
- Neiman, P. E., Thomas, S. J., and Loring, G. (1991). Induction of apoptosis during normal and neoplastic B-cell development in the bursa of Fabricius. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 88, 5857-61.
- Nossal, G. J. V. (1994). Negative selection of lymphocytes. *Cell* 76, 229-239.
- Quéva, C., Ness, S. A., Graf, T., Vandenbunder, B., and Stéhelin, D. (1992). Expression patterns of *c-myb* and of *v-myb* induced myeloid-1 (*mim-1*) gene during the development of the chick embryo. *Development* 114, 125-133.
- Schatzle, J. D., Kralova, J., and Bose, H. R. (1995). Avian I κ B α is transcriptionally induced by c-Rel and v-Rel with different kinetics. *Journal of Virology* 69, 5383-5390.
- Schibler, U., Hagenbüchle, O., Wellauer, P. K., and Pittet, A. C. (1983). Two promoters of different strengths control the transcription of the mouse alpha-amylase gene *Amy-1a* in the parotid gland and the liver. *Cell* 33, 501-508.
- Van Antwerp, D. J., Martin, S. J., Kafri, T., Green, D. R., and Verma, I. M. (1996). Suppression of TNF- α -induced apoptosis by NF- κ B. *Science* 274, 787-789.
- Verma, I. M., Stevenson, J. K., Schwarz, E. M., Van Antwerp, D., and Miyamoto, S. (1995). Rel/NF- κ B/I κ B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes and Development* 9, 2723-2735.
- von Boehmer, H. (1994). Positive selection of lymphocytes. *Cell* 76, 219-228.

Wang, C., Mayo, M. W., and Baldwin, A. S. J. (1996). TNF- and cancer therapy-induced apoptosis : potentiation by inhibition of NF- κ B. *Science* 274, 784-787.

White, D. W., and Gilmore, T. D. (1996). Bcl-2 and C₁₂A have different effects on transformation, apoptosis and the stability of I κ B α in chicken spleen cells transformed by temperature-sensitive v-Rel oncoproteins. *Oncogene* 13, 891-899.

White, D. W., Roy, A., and Gilmore, T. D. (1995). The v-Rel oncoprotein blocks apoptosis and proteolysis of I κ B- α in transformed chicken spleen cells. *Oncogene* 10, 857-868.

Acknowledgments

We are grateful to Eric Maire and Serge Piazza for their technical help and advises. This work was supported by grants from the Institut Pasteur de Lille, the Centre National de la Recherche Scientifique, the Association pour la Recherche sur le Cancer and the Groupement des Entreprises Françaises pour la Lutte contre le Cancer. C.H. was supported by a training grant from the Association pour la Recherche sur le Cancer.

Legends

Figure 1: *In situ* detection of apoptotic cells during thymus development.

E15 and P1 thymus sections were processed for TUNEL staining of apoptotic cells. Cortical and medullary areas are indicated as (C) and (M). Apoptotic cells are stained in brown compared to negative cells which are counterstained in blue by hematoxylin. At E15 (a) and P1 (b), apoptotic thymocytes are scattered in the cortex (arrowheads). Only a few cells are stained in the medulla (arrow). The number of apoptotic cells increases from E15 to P1. X 200

Figure 2: High magnifications of apoptotic and c-Rel-expressing thymocytes of the cortex.

Thymus sections were processed for TUNEL staining (a, b and c) or anti-c-Rel immunocytochemistry (d, e, f and g). Apoptotic cells are stained in brown, c-Rel-expressing-cells in red and negative cells in blue. TUNEL-positive thymocytes are either isolated (a, arrowhead) or in cluster (b, arrowhead). The TUNEL staining also detects apoptotic bodies (b, arrow) or cell debris (c, arrowheads). Similarly, c-Rel-expressing thymocytes appear in cluster (d, arrowhead) or as isolated cells (e arrowhead). c-Rel is also detected in apoptotic bodies-like elements (f, arrowhead) and cell debris (g, arrowheads). X600

Figure 3: Detection of c-Rel expression after induction of apoptosis in thymus organ culture.

P1 thymus sections were processed either for TUNEL staining (b and d) or anti-c-Rel immunocytochemistry (a and c) at different times of culture. Cortical and medullary areas are indicated as (C) and (M). Apoptotic cells are stained in brown, c-Rel-expressing-cells in red and negative cells in blue. In control thymuses (a and b), cortical and medullary thymocytes do not express c-Rel in contrast to stromal cells that are highly positive (a, arrowhead); only very few medullary thymocytes are TUNEL positive (b, arrow). After 4h in culture (c and d), a majority

of medullary thymocytes are highly stained in immunocytochemistry (g) and almost all medullary thymocytes are apoptotic as revealed by their TUNEL staining (h). X250

Figure 4: Subcellular localization of c-Rel during apoptosis of medullary thymocytes.

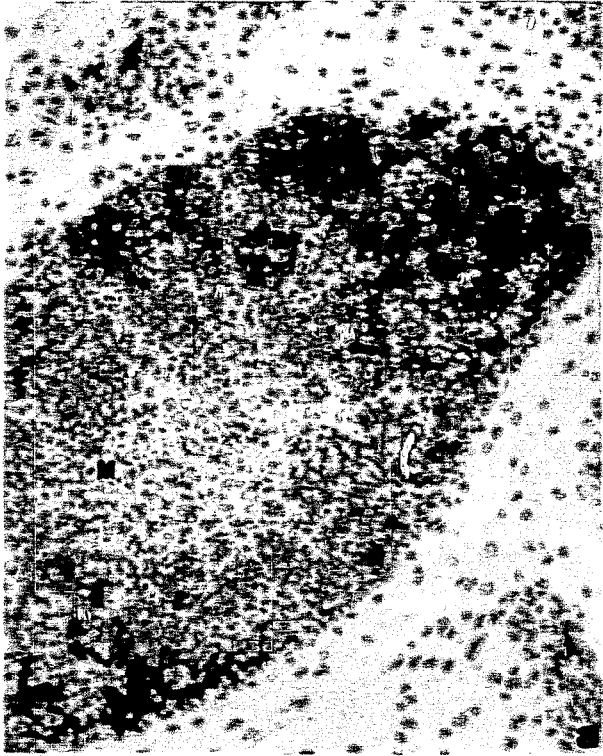
P1 thymus sections were processed for anti-c-Rel immunocytochemistry and observed at high magnification. c-Rel is faintly detected in the cytoplasm of thymocytes after 2h in culture (a, arrowheads). After 3h in culture, some medullary thymocytes are highly stained either in the cytoplasm (c, arrowhead) or both in the cytoplasm and the nucleus, although less intensely in the latter (b and e, arrowheads). c-Rel is also highly expressed in condensed thymocytes (d, arrowhead) and in apoptotic bodies (b, arrow). X1250

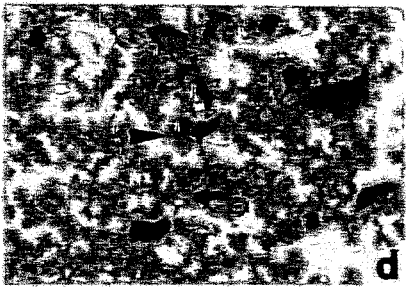
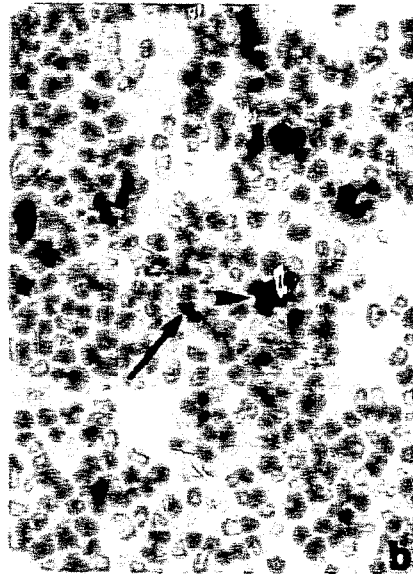
Figure 5: Western-blot analysis of cytoplasmic and nuclear extracts from E19 thymuses in organotypic culture.

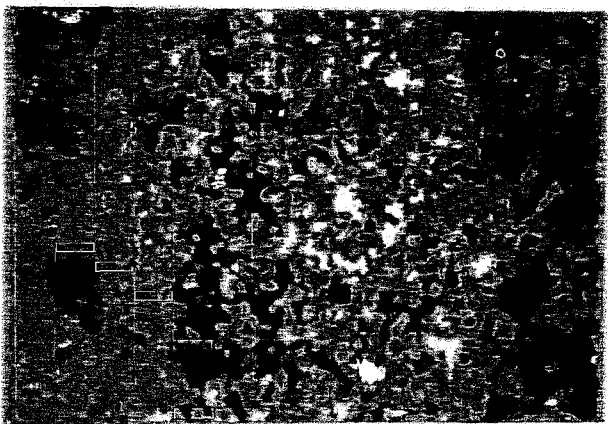
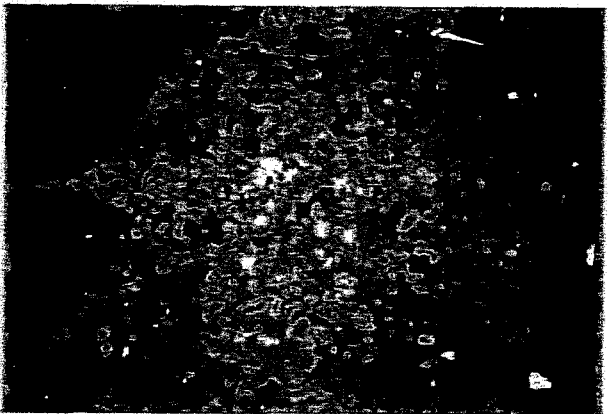
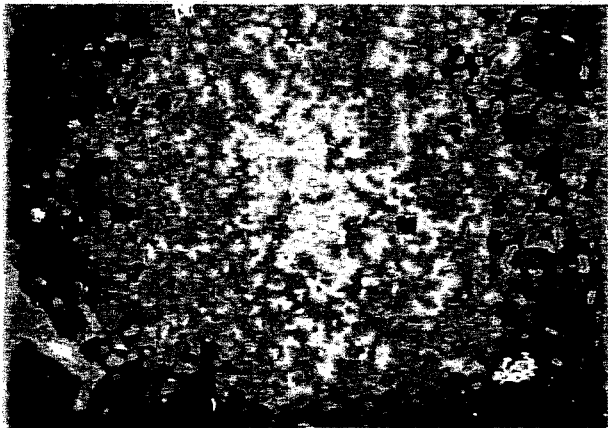
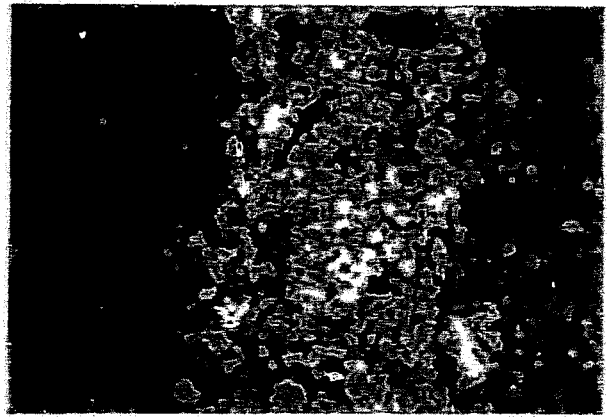
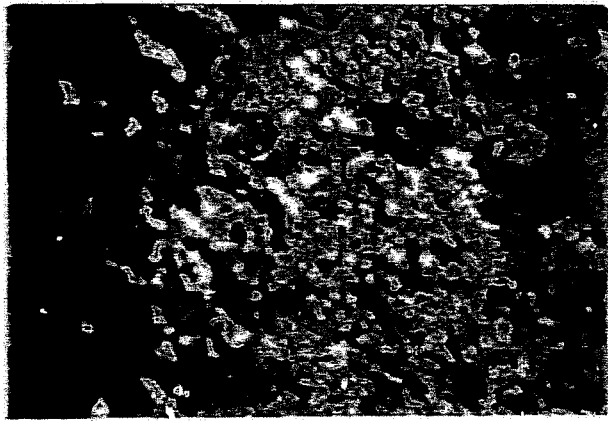
The anti-c-Rel antibody detects a protein at 68 kD, the molecular mass of the avian c-Rel protein (Capobianco et al., 1990). In thymus control and until 2h in culture, the c-Rel protein is mainly found in cytoplasmic extracts; only few amounts are detected in nuclear extracts. After 3h of culture, c-Rel amounts increase in nuclear extracts.

Figure 6: Detection of c-rel and ikba gene expression during experimentally-induced apoptosis.

Sections of P1 thymuses maintained in organ culture were processed for *in situ* hybridization and counterstained with a fluorescent DNA intercalant. Sections are observed in dark field and UV illumination (a, b, e and f) or under UV illumination alone (c, d, g and h). In control thymus, c-rel is expressed both in the cortex (C) and the medulla (M) with a higher expression in the latter (a and c). After 2h in culture, this pattern of expression does not change (b and d). In control thymus, ikba is highly expressed in all medullary cell types and at lower level in cortical cells (e and g). After 2h of culture, ikba expression decreases in medullary thymocytes. The remaining expression is mainly in stromal cells.







100

of medullary thymocytes are highly stained in immunocytochemistry (g) and almost all medullary thymocytes are apoptotic as revealed by their TUNEL staining (h). X250

Figure 4: Subcellular localization of c-Rel during apoptosis of medullary thymocytes.

P1 thymus sections were processed for anti-c-Rel immunocytochemistry and observed at high magnification. c-Rel is faintly detected in the cytoplasm of thymocytes after 2h in culture (a, arrowheads). After 3h in culture, some medullary thymocytes are highly stained either in the cytoplasm (c, arrowhead) or both in the cytoplasm and the nucleus, although less intensely in the latter (b and e, arrowheads). c-Rel is also highly expressed in condensed thymocytes (d, arrowhead) and in apoptotic bodies (o, arrow). X1250

Figure 5: Western-blot analysis of cytoplasmic and nuclear extracts from E19 thymuses in organotypic culture.

The anti-c-Rel antibody detects a protein at 68 kD, the molecular mass of the avian c-Rel protein (Capobianco et al., 1990). In thymus control and until 2h in culture, the c-Rel protein is mainly found in cytoplasmic extracts; only few amounts are detected in nuclear extracts. After 3h of culture, c-Rel amounts increase in nuclear extracts.

Figure 6: Detection of *c-rel* and *ikba* gene expression during experimentally-induced apoptosis.

Sections of P1 thymuses maintained in organ culture were processed for *in situ* hybridization and counterstained with a fluorescent DNA intercalant. Sections are observed in dark field and UV illumination (a, b, e and f) or under UV illumination alone (c, d, g and h). In control thymus, *c-rel* is expressed both in the cortex (C) and the medulla (M) with a higher expression in the latter (a and c). After 2h in culture, this pattern of expression does not change (b and d). In control thymus, *ikba* is highly expressed in all medullary cell types and at lower level in cortical cells (e and g). After 2h of culture, *ikba* expression decreases in medullary thymocytes. The remaining expression is mainly in stromal cells.

Figure 1: *In situ* detection of apoptotic cells during thymus development.

E15 and P1 thymus sections were processed for TUNEL staining of apoptotic cells. Cortical and medullary areas are indicated as (C) and (M). Apoptotic cells are stained in brown compared to negative cells which are counterstained in blue by hematoxylin. At E15 (a) and P1 (b), apoptotic thymocytes are scattered in the cortex (arrowheads). Only a few cells are stained in the medulla (arrow). The number of apoptotic cells increases from E15 to P1. X 200



Figure 2: High magnifications of apoptotic and c-Rel-expressing thymocytes of the cortex.

Thymus sections were processed for TUNEL staining (a, b and c) or anti-c-Rel immunocytochemistry (d, e, f and g). Apoptotic cells are stained in brown, c-Rel-expressing cells in red and negative cells in blue. TUNEL-positive thymocytes are either isolated (a, arrowhead) or in cluster (b, arrowhead). The TUNEL staining also detects apoptotic bodies (b, arrow) or cell debris (c, arrowheads). Similarly, c-Rel-expressing thymocytes appear in cluster (d, arrowhead) or as isolated cells (e, arrowhead). c-Rel is also detected in apoptotic bodies-like elements (f, arrowhead) and cell debris (g, arrowheads). X600

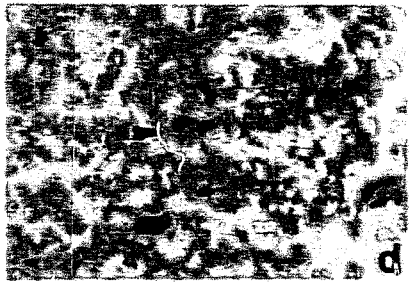
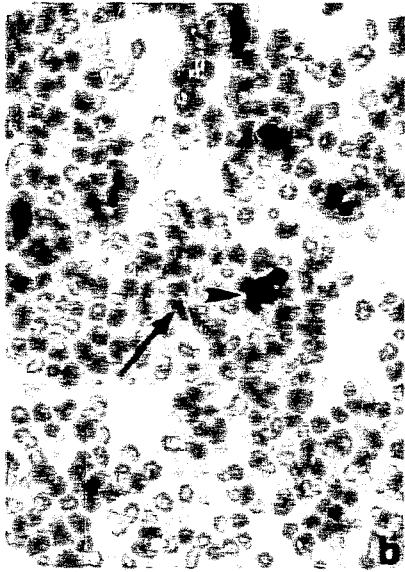
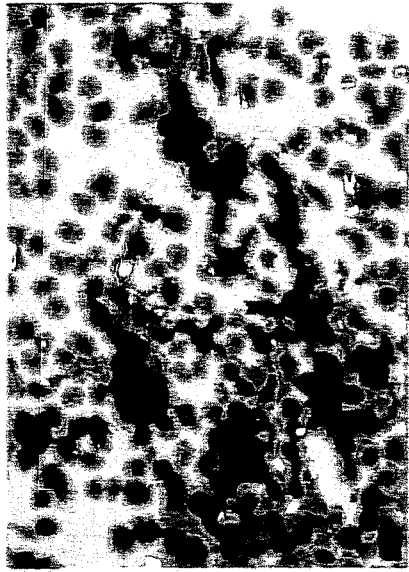
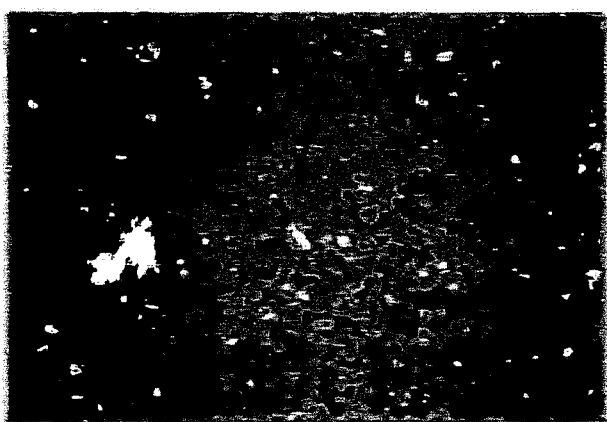
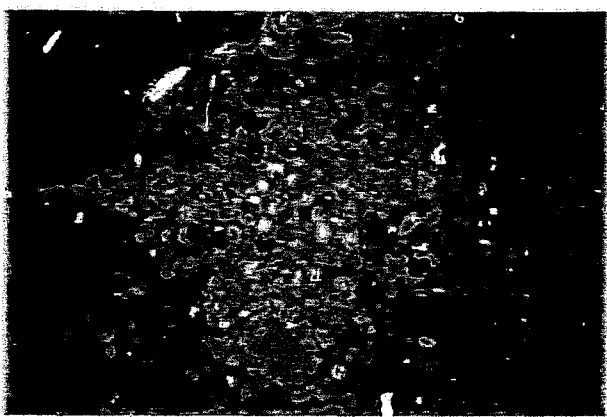
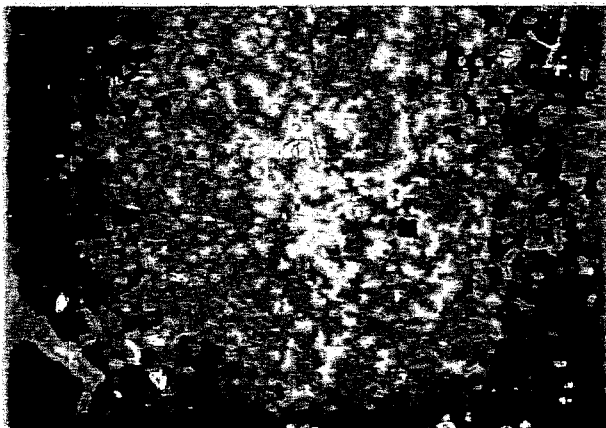
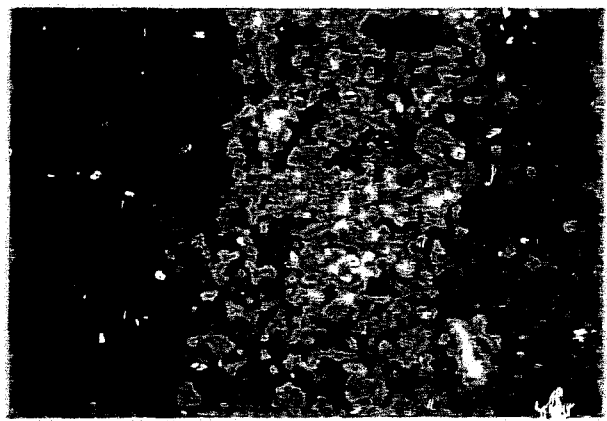
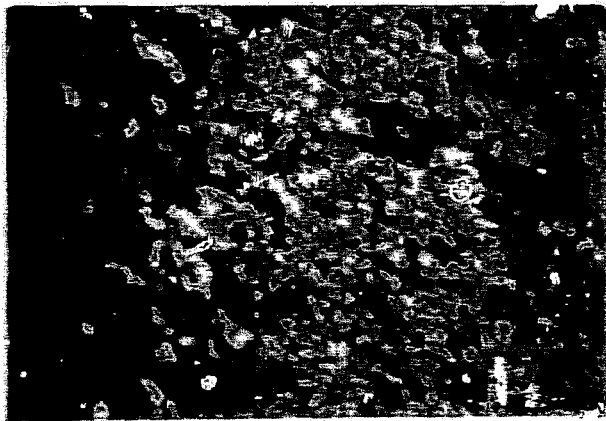


Figure 3: Detection of c-Rel expression after induction of apoptosis in thymus organ culture.

P1 thymus sections were processed either for TUNEL staining (b and d) or anti-c-Rel immunocytochemistry (a and c) at different times of culture. Cortical and medullary areas are indicated as (C) and (M). Apoptotic cells are stained in brown, c-Rel-expressing-cells in red and negative cells in blue. In control thymuses (a and b), cortical and medullary thymocytes do not express c-Rel in contrast to stromal cells that are highly positive (a, arrowhead); only very few medullary thymocytes are TUNEL positive (b, arrow). After 4h in culture (c and d), a majority of medullary thymocytes are highly stained in immunocytochemistry (e) and almost all medullary thymocytes are apoptotic as revealed by their TUNEL staining (f). X250



Subcellular localization of c-Rel during apoptosis of medullary thymocytes.

Sections were processed for anti-c-Rel immunocytochemistry and observed at high magnification. c-Rel is faintly detected in the cytoplasm of thymocytes after 2h in culture (a, arrowheads). After 5h in culture, some medullary thymocytes are highly stained either in the cytoplasm (c, arrowhead) or both in the cytoplasm and the nucleus, although less intensely in the nucleus (b and e, arrowheads). c-Rel is also highly expressed in condensed thymocytes (d, arrowheads) and in apoptotic bodies (b, arrow). X1250

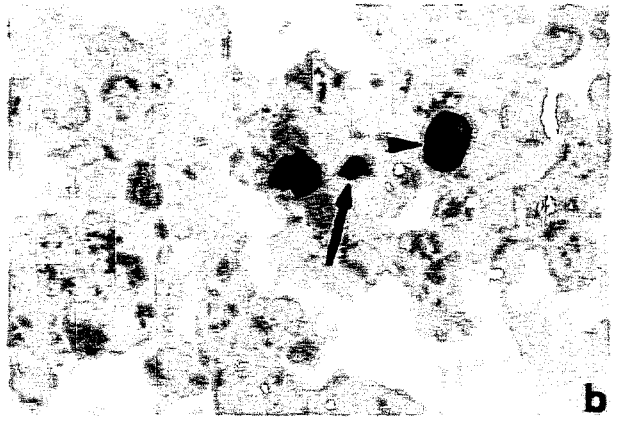
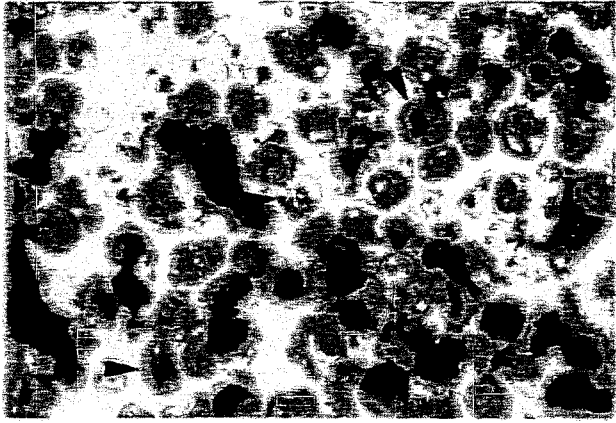


Figure 5: Western-blot analysis of cytoplasmic and nuclear extracts from E19 thymuses in organotypic culture

The anti-c-Rel antibody detects a protein at 68 kD, the molecular mass of the avian c-Rel protein (Capobianco et al., 1990). In thymus control and until 2h in culture, the c-Rel protein is mainly found in cytoplasmic extracts; only few amounts are detected in nuclear extracts. After 3h of culture, c-Rel amounts increase in nuclear extracts.

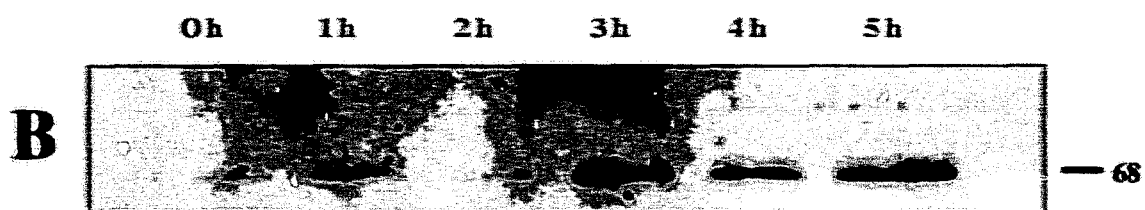
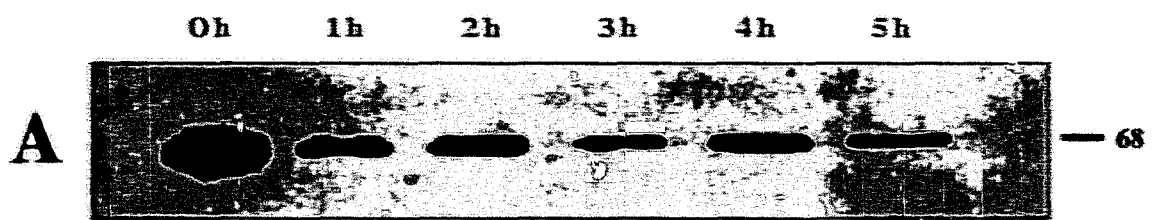
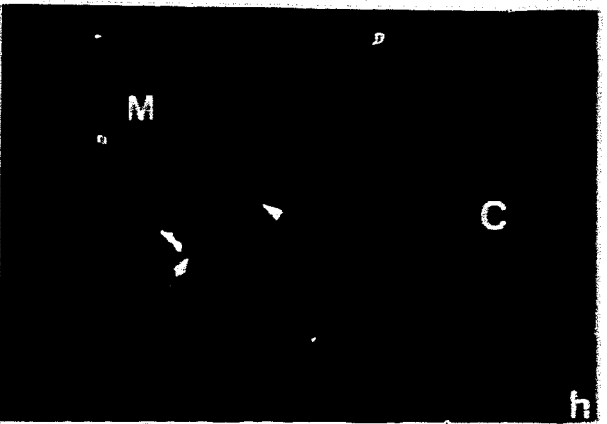
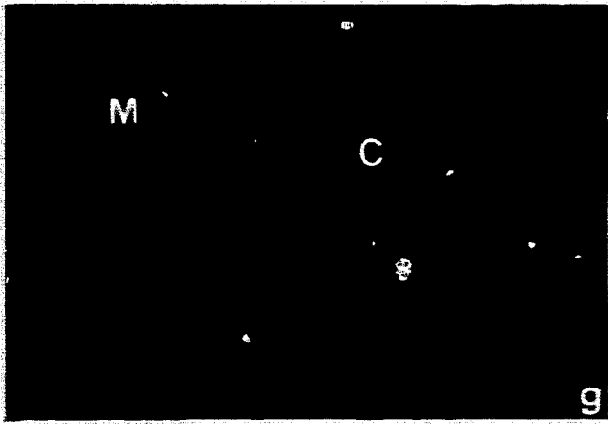
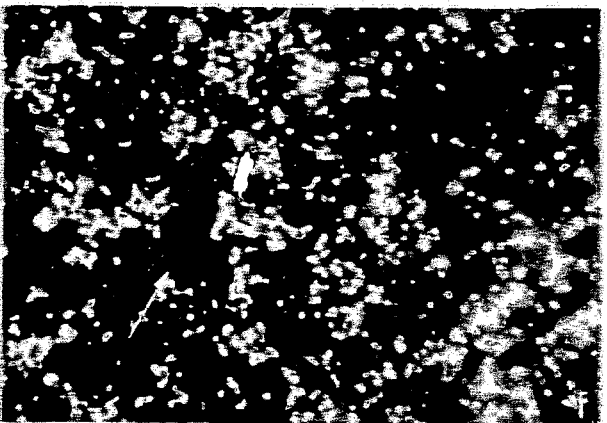
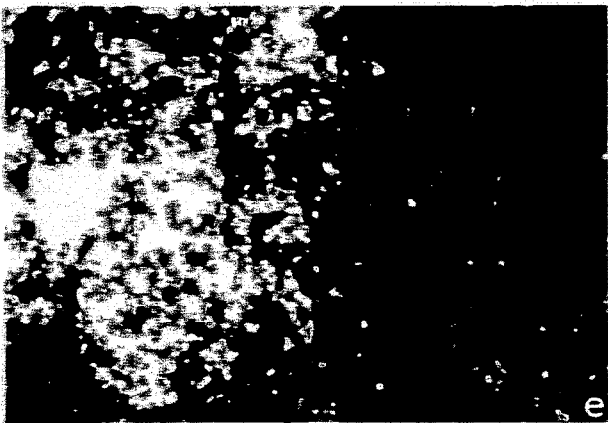
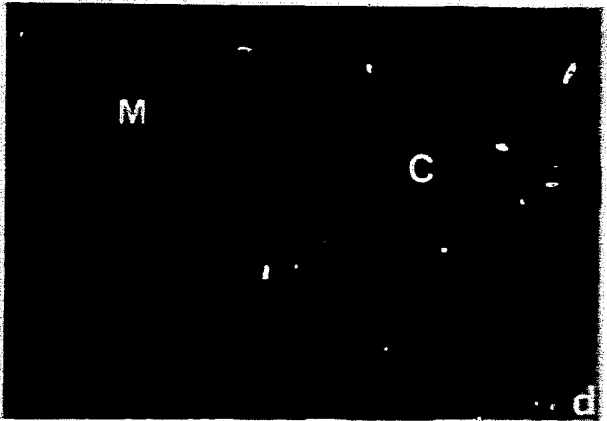
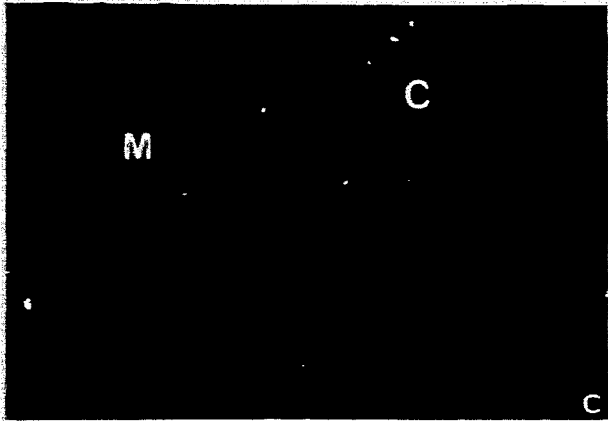
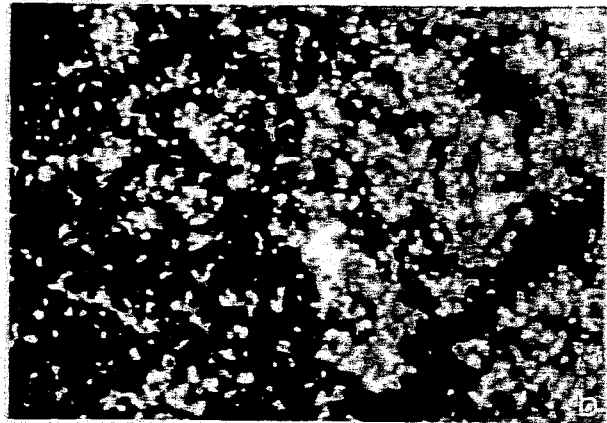
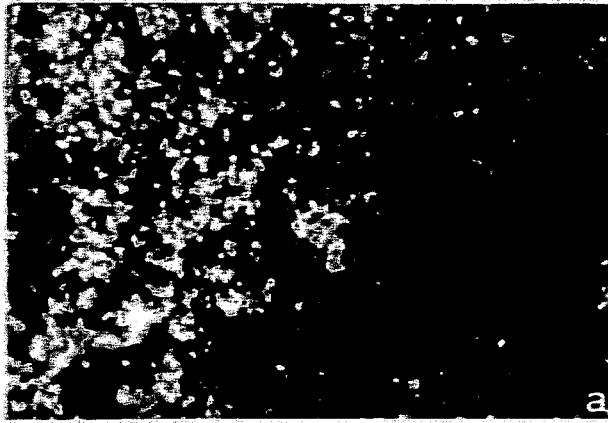


Figure 6: Detection of *c-rel* and *ikba* gene expression during experimentally-induced apoptosis.

Sections of P1 thymuses maintained in organ culture were processed for *in situ* hybridization and counterstained with a fluorescent DNA intercalant. Sections are observed in dark field and UV illumination (a, b, e and f) or under UV illumination alone (c, d, g and h). In control thymus, *c-rel* is expressed both in the cortex (C) and the medulla (M) with a higher expression in the latter (a and c). After 2h in culture, this pattern of expression does not change (b and d). In control thymus, *ikba* is highly expressed in all medullary cell types and at lower level in cortical cells (e and g). After 2h of culture, *ikba* expression decreases in medullary thymocytes. The remaining expression is mainly in stromal cells.



3.3.2 Discussion

Dans cette seconde approche, nous nous sommes plus particulièrement intéressé à la survenue de l'apoptose dans le thymus de poulet et à l'expression de *c-Rel* dans ce contexte.

3.3.2.1 La protéine *c-Rel* est induite dans les thymocytes apoptotiques

Compte tenu de l'expression des ARN messagers *c-rel* décrite dans les cellules apoptotiques de l'embryon de poulet, nous pouvions nous attendre à trouver une telle expression dans le thymus où une majorité de thymocytes sont sensés subir l'apoptose (Egerton et al., 1993). Étonnamment, on ne détecte qu'une faible expression du gène *c-rel* dans les thymocytes corticaux et ce sont les cellules non lymphoïdes de la médulla qui en comparaison expriment fortement le gène (cf. résultats et discussion 3.2.). Cependant, comme nous l'avons décrit, les thymocytes apoptotiques du cortex sont rares et enfouis parmi les thymocytes sains, ce qui rend impossible leur identification dans la technique d'hybridation *in situ* et par conséquent l'analyse de l'expression de *c-rel* dans ces cellules. Par contre en immunohistochimie, on détecte l'expression de la protéine *c-Rel* dans quelques thymocytes éparses du cortex que la technique permet d'identifier comme des cellules apoptotiques sur des critères morphologiques et de correspondance avec les thymocytes apoptotiques révélés en TUNEL. Ce résultat suggère que *c-Rel* est induite dans les thymocytes apoptotiques car elle n'est pas détectable dans les thymocytes sains.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons développé un protocole expérimental qui nous permet d'induire l'apoptose dans le thymus sur la base d'une culture organotypique. En effet, la culture organotypique de thymus, très utilisée chez la souris, a été adaptée au thymus de poulet (Davidson et al., 1992). Lorsque nous appliquons ce protocole à des thymus d'embryons âgés de 19 jours et de poussins d'1 jour, les thymocytes médullaires subissent une apoptose massive en quelques heures. Cette apoptose résulte probablement d'une hypoxie et de carences en cytokines et hormones de croissance, des stress connus pour induire l'apoptose. Cependant dans ces conditions, les thymocytes du cortex profond, c'est à dire en bordure de médulla, ne

subissent pas l'apoptose induite, suggérant que les thymocytes de la médulla sont plus sensibles aux stress inducteurs d'apoptose.

Nos résultats montrent que c-Rel est détectable dès 2 heures de culture dans le cytoplasme de la plupart des thymocytes médullaires. A ce stade, la majorité des thymocytes présentent toujours une morphologie de cellule saine, bien qu'on détecte déjà par la technique TUNEL des thymocytes apoptotiques. La majeure partie des thymocytes est apoptotique à 3 heures de culture et l'expression de c-Rel est très importante. Nous en déduisons qu'à 2 heures, les thymocytes avaient reçu le signal apoptotique et donc qu'un tel signal est accompagné d'une induction de la protéine c-Rel dans les thymocytes. Il est vraisemblable que cette induction soit post-transcriptionnelle car aucune augmentation de la transcription de *c-rel* n'a été détectée.

3.3.2.2 La protéine c-Rel migre dans le noyau au cours de l'apoptose

Comme décrit précédemment, c-Rel est détectée à partir de 2 heures de mise en culture dans le cytoplasme des thymocytes qui ont reçu le signal apoptotique. Puis pendant le déroulement du processus apoptotique, la localisation subcellulaire de c-Rel change : dès 3 heures, elle est détectée à la fois dans le cytoplasme et le noyau des thymocytes qui présentent encore une morphologie saine ou manifestent déjà des signes de condensation. Ce changement de localisation subcellulaire est confirmé par une analyse d'extraits cytoplasmiques et nucléaires en Western blot.

Par conséquent, nous avons établi que c-Rel migrait dans le noyau des thymocytes qui subissent l'apoptose, suggérant que la protéine est ainsi activée. Une fois dans le noyau c-Rel pourrait activer des gènes impliqués dans le mécanisme apoptotique. Cependant l'activité transcriptionnelle de c-Rel dans ce contexte reste à démontrer et ses gènes cibles à identifier. On ne peut exclure que l'activation de c-Rel dans les thymocytes ne soit qu'une conséquence du stress induit et n'ait pas de rapport direct avec la survenue de l'apoptose thymocytaire. Cependant, le fait que la surexpression de la protéine c-Rel ovarine induit l'apoptose de cellules de moelle osseuse *in vitro* laisse à penser que c-Rel serait effectivement impliqué dans le processus.

3.3.2.3 Mécanisme d'activation de la protéine c-Rel

Comme nous l'avons décrit dans l'introduction, la voie classique d'activation des facteurs de transcription Rel/NF- κ B passe par la phosphorylation, puis l'ubiquitination et la dégradation par le protéasome de l'inhibiteur I κ B.

Dans le contexte du thymus aviaire la protéine c-Rel ne semble pas préexister dans le cytoplasme des thymocytes. En effet, nos résultats montrent que c-Rel n'est détectable dans les thymocytes qu'après le stimulus apoptotique suggérant que les protéines qui migrent dans le noyau sont néo-synthétisées. Nous avons montré précédemment que les thymocytes médullaires exprimaient fortement *ikba* (cf. résultats et discussion 3.2.), par conséquent nous avons étudié l'expression d'*ikba* pour aborder le mécanisme d'activation de c-Rel. Dès 2 heures de mise en culture, c'est à dire avant la migration de c-Rel dans le noyau, l'expression d'*ikba* chute dans les thymocytes médullaires alors qu'elle est maintenue dans les cellules présentatrices d'antigènes. Ainsi, en absence d'I κ B α , c-Rel pourrait au fur et à mesure qu'elle est synthétisée migrer dans le noyau. Bien que la boucle de régulation d'*ikba* par c-Rel ait été décrite dans le système aviaire, nous n'observons pas d'augmentation de la transcription d'*ikba* après 3 heures de culture quand c-Rel est nucléaire.

Ces résultats constituent le premier exemple d'activation de c-Rel par une diminution de la transcription d'*ikba*. Cependant, nous devons déterminer si cette décroissance seule est responsable de l'activation de c-Rel ou si une induction simultanée de la dégradation des protéines I κ B α présentes se produit à 2 heures de culture.

En conclusion, ce travail nous a permis d'avancer d'un pas dans l'étude de l'implication du gène *c-rel* aviaire dans l'apoptose *in vivo*. Nous savions que ses ARN messagers pouvaient être surexprimés dans des cellules apoptotiques, il semble que dans le thymus nous soyons en présence d'un mode de régulation différent faisant appel à l'induction post-transcriptionnelle de la protéine c-Rel. De plus, au cours de l'apoptose thymocytaire, la protéine c-Rel est activée, ce qui suggère une part active dans le processus.

Si l'on se réfère au chapitre de l'introduction traitant de l'implication des facteurs de transcription Rel/NF- κ B dans l'apoptose, on se retrouve face à une fonction présumée d'inducteur de l'apoptose pour la protéine c-Rel aviaire et de répresseur pour les protéines c-Rel de mammifères. La protéine RelA murine peut quand à elle activer ou réprimer l'apoptose en fonction du contexte cellulaire. Ceci nous montre à nouveau combien les fonctions des facteurs Rel/NF- κ B sont multiples et modulables et font de ceux-ci des outils puissants de la régulation génique.

CONCLUSION
ET
PERSPECTIVES

Dans cette étude nous nous sommes intéressés à différentes facettes des facteurs Rel/NF- κ B et de leurs inhibiteurs I κ B. Nous avons tenté de reconstituer l'évolution de ces facteurs de transcription et de leurs inhibiteurs au travers d'une étude phylogénétique de leur séquence protéique. Cette approche de leur évolution moléculaire nous permet de proposer un ancêtre commun qui groupe les facteurs Rel/NF- κ B et les inhibiteurs I κ B dans une seule famille de protéine. On comprend alors plus facilement les interactions privilégiées qu'entretiennent ces protéines entre elles et s'il fallait les citer à nouveau leurs spécificités d'interactions et les boucles d'autorégulation. Ceci, nous en sommes conscients, ne représente qu'un modèle adapté aux connaissances actuelles que nous avons des protéines de ces familles. Néanmoins, cette approche dévoile avec le positionnement particulier de Relish une nouvelle sous-famille de facteurs Rel/NF- κ B/I κ B qui ouvre la voie à de nouvelles recherches. Il serait en effet intéressant de rechercher des homologues de Relish chez les vertébrés et d'en définir les fonctions. Une telle étude pourrait être abordée par la recherche de séquences homologues à l'aide d'oligonucléotides spécifiques dans les banques d'ADN complémentaires ou génomiques réalisées à partir d'organes hématopoïétiques dans un premier temps puisque Relish semble être impliqué dans la défense immunitaire de la drosophile. Nous avons vu également dans l'introduction de ce mémoire que de nouvelles protéines I κ B avaient été identifiées, ce qui suggère que la famille des facteurs Rel/NF- κ B/I κ B n'est sans doute pas encore au complet chez les vertébrés et qu'on peut espérer identifier de nouveaux membres, peut-être plus divergents qui pourraient remplir des fonctions plus ontogéniques comme le fait Dorsal chez la drosophile. L'appartenance des facteurs NF-AT à la famille Rel/NF- κ B est sujette à discussion, un moyen d'établir plus clairement la filiation de ces protéines serait de rechercher des homologues chez les arthropodes et de les comparer aux facteurs Dorsal et Dif, comme nous l'avons déjà suggéré. Une dernière question reste en suspens, celle de l'existence de facteurs Rel/NF- κ B/I κ B dans des espèces inférieures aux arthropodes où la réponse immunitaire n'est pas développée mais où d'autres attributions comme la régulation du développement et de l'apoptose pourrait être imputée à des facteurs Rel/NF- κ B anciens.

Notre étude du proto-oncogène *c-rel* dans le thymus embryonnaire de poulet permet également de définir de nouvelles orientations de travail. En effet, en plus de confirmer une implication de κ -Rel dans le processus apoptotique, elle révèle une fonction potentielle de c-Rel dans la prolifération de précurseurs lymphoïdes très immatures. De plus, le thymus aviaire s'avère être un modèle d'étude des régulations de c-Rel particulièrement puissant. En effet, dans un même organe sont présentes des cellules qui expriment c-Rel dans leur cytoplasme en corrélation avec une forte expression de l'inhibiteur I κ B α , des cellules qui présentent une localisation constamment nucléaire de c-Rel en rapport avec une faible expression d'I κ B α et enfin des cellules dans lesquelles l'expression de la protéine c-Rel et son activation sont induites en corrélation avec la décroissance d'expression transcriptionnelle d'*ikba*.

En parallèle de ce travail nous avons développé une autre approche *in vivo*, avec l'utilisation de vecteurs rétroviraux RCAS compétents pour la réplication qui expriment l'ADN complémentaire du gène *c-rel* en orientation sens et antisens. L'établissement de cultures primaires de fibroblastes embryonnaires de poulet nous a permis de transférer ces constructions qui nous ont été fournies par le Dr. P.J. Enrietto et de produire des réserves de surageants viraux. Ces surageants ont été utilisés pour infecter des embryons de poulet très jeunes. Des résultats bien que très préliminaires montrent que l'infection à l'aide du virus exprimant un ARN messager antisens *c-rel* peut induire des malformations de l'axe vertébral et du bourgeon de membre dans l'embryon de poulet et que l'infection à l'aide du virus exprimant la protéine c-Rel produit des embryons dont le thymus anormalement réduit présente un fort taux d'apoptose.

Ces résultats encouragent à poursuivre l'étude de la fonction de c-Rel dans l'apoptose, à identifier ses gènes cibles mais aussi ses partenaires et son mode de régulation dans ce processus. La voie est également ouverte à une étude du rôle potentiel de c-Rel dans la prolifération des précurseurs lymphoïdes et dans le développement embryonnaire précoce.

Les facteurs Rel/NF- κ B/I κ B ne nous ont pas encore tout dit!

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abbadie, C., Kabrun, N., Bouali, F., Smardova, J., Stéhelin, D., Vandenbunder, B., and Enrietto, P. (1993). High levels of *c-rel* expression are associated with programmed cell death in the developing avian embryo and in bone marrow cells *in vitro*. *Cel.* *75*, 899-912.

Albertella, M., and Campbell, R. D. (1994). Characterization of a novel gene in the human major histocompatibility complex that encodes a potential new member of the I κ B family of proteins. *Human Mol. Gen.* *3*, 793-799.

Algarté, M., Lécine, P., Costello, R., Plet, A., Olive, D., and Imbert, J. (1995). *In vivo* regulation of interleukine-2 receptor α gene transcription by the coordinated binding of constitutive and inducible factors in human primary T cells. *EMBO J.* *14*, 5060-5072.

Alkalay, I., Yaron, A., Hatzubai, A., Jung, S., Avraham, A., Gerlitz, O., Pashut-Laven, I., and Ben-Neriah, Y. (1995). *In vivo* stimulation of I κ B phosphorylation is not sufficient to activate NF- κ B. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 1294-1301.

Ansieau, S., Scheffrahn, M., G., Brand, H., Dryster, J., Kaye, K., Harada, J., Deugall, B., Hübinger, G., Kieff, E., Herrmann, F., Lentz, A., and Gruss, H.-J. (1996). Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)-1, TRAF-2, and TRAF-3 interact *in vivo* with the CD30 cytoplasmic domain; TRAF-2 mediates CD30-induced nuclear factor kappa B activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *93*, 14053-14058

Aoki, T., Sano, Y., Yamamoto, T., and Inoue, J.-I. (1996). The ankyrin repeats but not the PEST-like sequences are required for signal-dependent degradation of κ B α . *Oncogene* *12*, 1159-1164.

Arenzana-Seisdedos, F., Thompson, J., Rodriguez, M. S., Bachelerie, F., Thomas, D., and Hay, R. T. (1995). Inducible nuclear expression of newly synthesized I κ B α negatively regulates DNA-binding and transcriptional activities of NF- κ B. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 2689-2696.

Arenzana-Seisdedos, F., Turpin, M., Rodriguez, M. S., Thomas, D., Hay, R. T., Virelizier, J.-L., and Dargemont, C. (1997). Nuclear localization of I κ B α promotes active transport of NF- κ B from the nucleus to the cytoplasm. *J. Cell Science* *110*, 369-378.

Arsura, M., Wu, M., and Gail, E. (1996). TGF β 1 inhibits NF- κ B/Rel activity inducing apoptosis of B cells: transcriptional activation of I κ B α . *Immunity* *5*, 31-40.

- Auphan, N., Didonato, J.A., Rosette, C., Helmberg, A., and Karin, M. (1995). Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF- κ B activity through induction of I κ B synthesis. *Science* 270, 286-290.
- Baeuerle, P. A., and Baltimore, D. (1989). A 65-kD subunit of active NF- κ B is required for inhibition of NF- κ B by I κ B. *Genes & Dev.* 3, 1689-1698.
- Baeuerle, P. A., and Baltimore, D. (1996). NF- κ B : Ten years after. *Cell* 87, 13-20.
- Baeuerle, P. A., and Henkel, T. (1994). Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 141-179.
- Baeuerle, P. A. B., D. (1988a). Activation of DNA-binding activity in an apparent cytoplasmic precursor of the NF- κ B transcription factor. *Cell* 53, 211-217.
- Baeuerle, P. A. B., D. (1988b). I κ B : a specific inhibitor of the NF- κ B transcription factor. *Science* 242, 540-546.
- Baldi, L., Brown, K., Franzoso, G., and Siebenlist, U. (1996). Critical role for lysine 21 and 22 in signal-induced, ubiquitin-mediated proteolysis of I κ B α . *J. Biol. Chem.* 271, 376-379.
- Ballard, D. W., Dixon, E. P., Pfeffer, N. J., Bogerd, H., Doerre, S., Stein, B., and Greene, W. C. (1992). The 65-kDa subunit of human NF-kappa B functions as a potent transcriptional activator and a target for v-Rel-mediated repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 1875-1879.
- Barillas-Mury, C., Charlesworth, A., Gross, L., Richman, A., Hoffman, J. A., and Kafatos, F. C. (1996). Immune factor Gambif1, a new rel family member from the human malaria vector, *Anopheles gambiae*. *EMBO J.* 15, 4691-4701.
- Baroga, C. F., Stevenson, J. K., Schwarz, E. M., and Verma, I. M. (1995). Constitutive phosphorylation of I κ B α by casein kinase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 7637-7641.
- Beauparlant, P., Kwan, L., Bitar, R., Chou, P., Koromilas, A. E., Sonenberg, N., and Hiscott, J. (1994). Disruption of I κ B α regulation by antisense RNA expression leads to malignant transformation. *Oncogene* 9, 3189-3197.

Beauparlant, P., Lin, R., and Hiscott, J. (1996). The role of the C-terminal domain of I κ B α in protein degradation and stabilization. *J. Biol. Chem.* *271*, 10690-10696.

Beg, A. A., and Baltimore, D. (1996). An essential role for NF- κ B in preventing TNF- α -induced cell death. *Science* *274*, 782-784.

Beg, A. A., Finco, T. S., Nantermet, P. V., and Baldwin, I., A.S. (1993). Tumor necrosis factor and interleukin-1 lead to phosphorylation and loss of I κ B α : a mechanism for NF- κ B activation. *Mol. Cell. Biol.* *13*, 3301-3310.

Beg, A. A., Ruben, S. M., Scheinmen, R. L., Haskill, S., and Rosen, C. A. (1992). I κ B interacts with the nuclear localization sequences of the subunits of NF- κ B : a mechanism for cytoplasmic retention. *Genes & Dev.* *6*, 1899-1913.

Beg, A. A., Sha, W. C., Bronson, R. T., and Baltimore, D. (1995). Constitutive NF- κ B activation, enhanced granulopoiesis, and neonatal lethality in I κ B α -deficient mice. *Genes & Dev.* *9*, 2736-2746.

Beg, A. A., Sha, W. C., Bronson, R. T., Ghosh, S., and Baltimore, D. (1995). Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF- κ B. *Nature* *376*, 167-170.

Bell, S., Matthews, J. R., Jaffray, E., and Hay, R. T. (1996). I κ B γ inhibits DNA binding of NF- κ B p50 homodimers by interacting with residues that contact DNA. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 6477-6485.

Belvin, M. P., Jin, Y., and Anderson, K. V. (1995). Cactus protein degradation mediates *Drosophila* dorsal-ventral signaling. *Genes & Dev.* *9*, 783-793.

Bennett, B. L., Larson, R. G., Chen, C. C., Cruz, R., Wheeler, J. S., Kletzien, R. F., Tomasselli, A. G., Heinrichson, R. L., and Manning, A. M. (1996). Identification of signal-induced I κ B α kinases in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* *271*, 19680-19688.

Betts, J. C., and Nabel, G. I. (1996). Differential regulation of NF- κ B2(p100) processing and control by amino-terminal sequences. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 6363-6371.

- Bhatia, K., Huppi, K., McKeithan, T., Siwarski, D., Mushinski, J. F., and Magrath, I. (1991). Mouse Bcl-3 : cDNA structure, mapping and stage-dependent expression in B lymphocytes. *Oncogene* 6, 1342-1348.
- Blair, W. S., Bogerd, H. P., Madore, S. J., and Cullen, B. R. (1994). Mutational analysis of the transcription activation domain of RelA : identification of a highly synergistic minimal acidic activation module. *Mol. Cell Biol.* 14, 7226-7234.
- Blank, V., Kourilsky, P., and Israel, A. (1991). Cytoplasmic retention, DNA binding and processing of the NF-kappa B p50 precursor are controlled by a small region in its C-terminus. *EMBO J.* 10, 4159-4167.
- Roehmel, G., Madruga, J., Dörfler, P., Briegel, K., Schwarz, H., Enrietto, P. J., and Zenke, M. (1995). Dendritic cell progenitor is transformed by a conditional v-Rel Estrogen Receptor fusion protein v-RelER. *Cell* 80, 341-352.
- Bours, V., Azarenko, V., Dejardin, E., and Siebenlist, U. (1994). Human RelB (IRel) functions as a kB site-dependent transactivating member of the Rel-related proteins. *Oncogene* 9, 1699-1702.
- Bours, V., Burd, P. R., Brown, K., Villalobos, J., Park, S., Ryseck, R. P., Bravo, R., Kelly, K., and Siebenlist, U. (1992). A novel mitogen-inducible gene product related to p50/p105-NF-kappa B participates in transactivation through a kappa B site. *Mol. Cell Biol.* 12, 685-695.
- Bours, V., Franzoso, G., Azarenko, V., Park, S., Kanno, T., Brown, K., and Siebenlist, U. (1993). The oncoprotein BCL-3 directly transactivates through kB motifs via association with DNA-binding p50B homodimers. *Cell* 72, 729-739.
- Bours, V., Villalobos, J., Burd, P. R., Kelly, K., and Siebenlist, U. (1990). Cloning of a mitogen-inducible gene encoding a kappa B DNA-binding protein with homology to the rel oncogene and to cell-cycle motifs. *Nature* 348, 76-80.
- Boyd, R. L., Wilson, T. J., Bean, A. G., and Ward, H. A. (1992). Phenotypic characterization of chicken thymic stromal elements. *Developmental immunology* 2, 51-66.
- Bressler, P., Brown, K., Timmer, W., Bours, V., Siebenlist, U., and Fauci, A. S. (1993). Mutational analysis of the p50 subunit of NF-kB and inhibition of NF-kB activity by trans-dominant p50 mutants. *J. Virol.* 67, 288-293.

Brockman, J. A., Scherer, D. C., McKinsey, T. A., Hall, S. M., Qi, X., Young Lee, W., and Ballard, D. W. (1995). Coupling of a signal response domain in I κ B α to multiple pathways for NF- κ B. *Mol. Cell Biol.* *15*, 2809-2818.

Brostjan, C., Anrather, J., Csizmadia, V., Stroka, D., Soares, M., Bach, F. H., and Winkler, H. (1996). Glucocorticoid-mediated repression of NF κ B activity in endothelial cells does not involve induction of I κ B α synthesis. *J. Biol. Chem.* *271*, 19612-19616.

Brown, K., Gerstberger, S., Carlson, L., Franzoso, G., and Siebenlist, U. (1995). Control of I κ B α proteolysis by site-specific signal-induced phosphorylation. *Science* *267*, 1485-1488.

Brown, K., Park, S., Kanno, T., Franzoso, G., and Siebenlist, U. (1993). Mutual regulation of the transcriptional activator NF- κ B and its inhibitor I κ B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *90*, 2532-2536.

Brownell, E., Mittereder, N., and Rice, N. R. (1989). A human *rel* proto-oncogene cDNA containing an *Ain* fragment as a potential coding exon. *Oncogene* *4*, 935-942.

Brownell, E. R., F. W. Smith, R. G. Rice, N. R. (1988). Detection of *rel*-related RNA and protein in human lymphoid cells. *Oncogene* *3*, 93-98.

Bull, P., Morley, K. L., Hoekstra, M. F., Hunter, T., and Verma, I. M. (1990). The mouse *c-rel* protein has an N-terminal regulatory domain and a C-terminal transcriptional transactivation domain. *Mol. Cell Biol.* *10*, 5473-5485.

Csamano, J. H., Perez, P., Lira, S. A., and Bravo, R. (1996). Constitutive expression of Bcl-3 in thymocytes increases the DNA binding of NF- κ B1 (p50) homodimers in vivo. *Mol. Cell Biol.* *16*, 1342-1348.

Cai, Z., Körner, M., Tarantino, N., and Chouaib, S. (1997). I κ B α overexpression in human breast carcinoma MCF7 cells inhibits nuclear factor- κ B activation but not tumor necrosis factor- α -induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* *272*, 96-101.

Capobianco, A. J., Chang, D., Mosialos, G., and Gilmore, T. D. (1992). p105, the NF- κ B p50 precursor protein, is one of the cellular proteins complexed with the v-rel oncoprotein in transformed chicken spleen cells. *J. Virol.* *66*, 3758-3767.

Capobianco, A. J., Simmons, D. L., and Gilmore, T. D. (1990). Cloning and expression of a chicken *c-rel* cDNA : unlike p59^{v-rel}, p68^{c-rel} is a cytoplasmic protein in chicken embryo fibroblasts. *Oncogene* 5, 257-265.

Carrasco, D., Rizzo, C. A., Dorfman, K., and Bravo, R. (1996). The *v-rel* oncogene promotes malignant T-cell leukemia/lymphoma in transgenic mice. *EMBO J.* 15, 3640-3650.

Carrasco, D., Weih, F., and Bravo, R. (1994). Developmental expression of the mouse *c-rel* proto-oncogene in hematopoietic organs. *Development* 120, 2991-3004.

Casolaro, V., Georas, S.N., Song, Z., Zubkoff, S.A., Abdulkadir, D., Thanos, D., and Ono, S.J. (1995). Inhibition of NF-AT-dependent transcription by NF-kappa B: implications for differential gene expression in T helper cell subsets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92, 11623-11627.

Chang, C.-C., Zhang, J., Lombardi, L., Neri, A., and Dalla-Favera, R. (1994). Mechanism of expression and role in transcriptional control of the proto-oncogene NF- κ B2/Lyt-10. *Oncogene* 9, 923-933.

Chang, C. C., Zhang, J., Lombardi, L., Neri, A., and R., D.-F. (1995). Rearranged NFKB-2 genes in lymphoid neoplasms code for constitutively active nuclear transactivators. *Mol. Cell Biol.* 15, 5180-5187.

Chen, C.-G., Malliaros, J., Katerelos, M., D'Apice, A. J. F., and Pearse, M. J. (1996). Inhibition of NF- κ B activation by a dominant-negative mutant of I κ B α . *Molecular Immunology* 33, 57-61.

Chen, Z., Hagler, J., Palombella, V. J., Melandri, F., Scherer, D., Ballard, D., and Maniatis, T. (1995). Signal-induced site-specific phosphorylation targets I κ B α to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes & Dev.* 9, 1586-1597.

Chen, Z., Parent, L., and Maniatis, T. (1996). Site-specific phosphorylation of I κ B α by a novel ubiquitination-dependent protein kinase activity. *Cell* 84, 853-862.

Chiao, P. J., Miyamoto, S., and Verma, I. M. (1994). Autoregulation of I κ B α activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 28-32.

- Chu, Z.-L., McKinsey, T. A., Lin, L., Qi, X., and Ballard, D. W. (1996). Basal phosphorylation of the PEST domain in I κ B β regulates its functional interaction with the *c-rel* proto-oncogene product. *Mol. Cell Biol.* *16*, 5974-5984.
- Chytil, M., and Verdine, G. L. (1996). The Rel family of eukaryotic transcription factors. *Current Opinion in Structural Biology* *6*, 91-100.
- Claudio, E., Segade, F., Wrobel, K., Ramos, S., Bravo, R., and Lazo, P. S. (1996). Molecular mechanisms of TNF α cytotoxicity: activation of NF- κ B and nuclear translocation. *Experimental Cell Research* *224*, 63-71.
- Cogswell, P. C., Scheinman, R. L., and Baldwin, J. A. (1993). Promoter of the human NF- κ B p50/p105 gene: regulation by NF- κ B subunits and by c-Rel. *J. Immunol.* *150*, 2794-2804.
- Coleman, T. A., Kumsch, C., Maher, M., Ruben, S. M., and Rosen, C. A. (1993). Acquisition of NF- κ B1-selective DNA binding by substitution of four amino acid residues from NF- κ B1 into RelA. *Mol. Cell Biol.* *13*, 3850-3859.
- Coltey, M., Jotereau, F. V., and Le Douarin, N. M. (1987). Evidence for a cyclic renewal of lymphocyte precursor cells in the embryonic chick thymus. *Cell differentiation* *22*, 71-82.
- Cordle, S., Donald, R., Read, M. A., and Hawiger, J. (1993). Lipopolysaccharide induces phosphorylation of MAD3 and activation of c-Rel and related NF- κ B proteins in human monocytic THP-1. *J. Biol. Chem.* *268*, 11803-11810.
- Costello, R., Cerdan, C., Lipcey, C., Algarte, M., Martin, Y., Baeuerle, P. A., Olive, D., and Imbert, J. (1993). The role of NF- κ B1 (p50/p105) gene expression in activation of human blood T-lymphocytes via CD2 and CD28 adhesion molecules. *Cell Growth & differentiation* *4*, 947-954.
- Costello, R., Lipcey, C., Algarte, M., Cerdan, C., Baeuerle, P. A., Olive, D., and Imbert, J. (1993). Activation of primary human T-lymphocytes through CD2 plus CD28 adhesion molecules induces long-term nuclear expression of NF- κ B. *Cell Growth & Differentiation* *4*, 329-339.
- Davidson, N. J., Chen, C. I. H., and Boyd, R. L. (1992). Kinetics of chicken embryonic thymocyte development *in ovo* and *in organ culture*. *Eur. J. Immunol.* *22*, 1429-1435.

- Davis, J. N., Bargmann, W., and Bose, H. J. (1990). Identification of protein complexes containing the c-rel proto-oncogene product in avian hematopoietic cells. *Oncogene* 5, 1109-1115.
- Davis, N., Ghosh, S., Simmons, D. L., Tempst, P., Lion, H. C., Baltimore, D., and Bose, H. J. (1991). Rel-associated pp40: an inhibitor of the rel family of transcription factors. *Science* 253, 1268-1271.
- De Martin, R., Holzmüller, H., Hofer, E., and Bach, F. H. (1995). Intron-exon structure of the porcine I κ B α -encoding gene. *Gene* 152, 253-255.
- De Martin, R., Vanhove, B., Cheng, Q., Hofer, E., Csizmadia, V., Winkler, H., and Bach, F. H. (1993). Cytokine-inducible expression in endothelial cells of an I κ B α -like gene is regulated by NF- κ B. *EMBO J.* 12, 2773-2779.
- Dejardin, E., Bonizzi, G., Bellahcène, A., Castronovo, V., Merville, M. P., and Bours, V. (1995). Highly expressed p100/p52 (NF κ B2) sequesters other NF- κ B-related proteins in the cytoplasm of human breast cancer cells. *Oncogene* 11, 1835-1841.
- Deloukas, P., and Van Loon, A. P. G. M. (1993). Genomic organization of the gene encoding the p65 subunit of NF- κ B: multiple variants of the p65 protein may be generated by alternative splicing. *Hum. Mol. genetics* 2, 1895-1900.
- Devergne, O., Hatzivassiliou, E., Izumi, K. M., Kaye, K. M., Kleijnen, M. F., Kieff, E., and G. M. (1996). Association of TRAF1, TRAF2, and TRAF3 with Epstein-Barr virus LMP1 domain: important for B-lymphocyte transformation: role in NF- κ B activation. *Mol. Cell. Biol.* 16, 7098-7108.
- Diaz-Meco, M. T., Berra, E., Muncio, M. M., Sanz, L., Lozano, J., Dominguez, I., Diaz-Golpe, V., Lain de Lera, M. T., Alcami, J., Paya, C. V., Arenzana-Seisdedos, F., Virelizier, J.-L., and Moscat, J. (1993). A dominant negative protein kinase C ζ subspecies blocks NF- κ B activation. *Mol. Cell. Biol.* 13, 4770-4775.
- DiDonato, J., Mercurio, F., Rosette, C., Wu-Li, J., Suyang, H., Ghosh, S., and Karin, M. (1996). Mapping of the inducible I κ B phosphorylation sites that signal its ubiquitination and degradation. *Mol. Cell. Biol.* 16, 1295-1304.

DiDonato, J. A., Mercurio, F., and Karin, M. (1995). Phosphorylation of I κ B α precedes but is not sufficient for its dissociation from NF- κ B. *Mol. Cell Biol.* *15*, 1302-1311.

Diehl, J. A., Mac Kinsey, T. A., and Hannink, M. (1993). Differential pp40 I κ B- β inhibition of DNA binding by rel proteins. *Mol. Cell Biol.* *13*, 1769-1778.

Dieterlen-Lièvre (1994). Hemopoiesis during avian ontogeny. *Poultry Science Rev.* *5*, 273-305.

Dobrzanski, P., Ryseck R.-P., and Bravo, R. (1993). Both N- and C-terminal domains of RelB are required for full transactivation: role of the N-terminal leucine zipper-like motif. *Mol. Cell Biol.* *13*, 1572-1582.

Dobrzanski, P., Rysek, R. P., and Bravo, R. (1994). Differential interactions of Rel/NF- κ B complexes with I κ B α determine pools of constitutive and inducible NF- κ B activity. *EMBO J.* *13*, 4608-4616.

Doerre, S., Sista, P., Sun, S., Ballard, D. W., and Greene, W. C. (1993). The *c-rel* protooncogene product represses NF- κ B p65-mediated transcriptional activation of the long terminal repeat of type I human immunodeficiency virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *90*, 1023-1027.

Drew, P. D., Franzoso, G., Becker, E. D., Bours, V., Carlson, L. M., Siebelist, U., and Ozato, K. (1995). NF κ B and interferon regulatory factor 1 physically interact and synergistically induce major histocompatibility class I gene expression. *J. of Interferon and Cytokine Research* *15*, 1037-1045.

Druker, B. J., Neumann, M., Okuda, K., Franza Jr., B. R., and Griffin, J. D. (1994). *rel* is rapidly tyrosine-phosphorylated following Granulocyte-Colony Stimulating Factor treatment of human neutrophils. *J. Biol. Chem.* *269*, 5387-5390.

Duckett, C. S., Perkins, N. D., Kowalik, T. F., Schmid, R. M., Huang, E.-S., Baldwin Jr, A. S., and Nabel, G. J. (1993). Dimerization of NF- κ B2 with RelA (p65) regulates DNA binding, transcriptional activation, and inhibition by an I κ B α (MAD-3). *Mol. Cell Biol.* *13*, 1315-1322.

Dushay, M. S., Asling, B., and Hultmark, D. (1996). Origins of immunity: *Relish*, a compound Rel-like gene in the antibacterial defense of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *93*, 10343-10347.

Egerton, M., Scollay, R., and Shortman, K. (1990). Kinetics of mature T-cell development in the thymus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *87*, 2579-2582.

Ernst, M. K., Dunn, L. L., and Rice, N. R. (1995). The PEST-like sequence of I κ B α is responsible for inhibition of DNA binding but not for cytoplasmic retention of c-Rel or RelA homodimers. *Mol. Cell Biol.* *15*, 872-882.

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

Feuillard, J., Kömer, M., Fourcade, C., Costa, A., Binet, J.-I., Bebré, P., and Raphael, M. (1994). Visualization of the endogenous NF- κ B p50 subunit in the nucleus of follicular dendritic cells in germinal centers. *J. Immunol.* *152*, 12-21.

Finco, T. S., Beg, A. A., and Baldwin, A. S. (1994). Inducible phosphorylation of I κ B α is not sufficient for its dissociation from NF- κ B and is inhibited by protease inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *91*, 11884-11888.

Fracchiolla, N. S., Lombardi, L., Salina, M., Migliazza, A., Baldini, L., Berti, E., Cro, L., Polli, E., Maio, A. T., and Neri, A. (1993). Structural alterations of the NF- κ B transcription factor *I κ B-10* in lymphoid malignancies. *Oncogene* *8*, 2839-2845.

Frankenberger, M., Pforte, A., Sternsdorf, T., Passlick, B., Baeuerle, P. A., and Ziegler-Heitbrock, H. W. L. (1994). Constitutive nuclear NF- κ B in cells of the monocyte lineage. *Biochem. J.* *304*, 87-94.

Franzoso, G., Bours, V., Azarenko, V., Park, S., Tomita-Yamaguchi, M., Kanno, T., Brown, K., and Siebenlist, U. (1993). The oncoprotein Bcl-3 can facilitate NF- κ B-mediated transactivation by removing inhibiting p50 homodimers from select κ B sites. *EMBO J.* *12*, 3893-3901.

Franzoso, G., Bours, V., Park, S., Tomita-Yamaguchi, M., Kelly, K., and Siebenlist, U. (1992). The candidate oncoprotein Bcl-3 is an antagonist of p50/NF- κ B-mediated inhibition. *Nature* *359*, 339-342.

Franzoso, G., Carlson, L., Brown, K., Dancher, M.B., Bressler, P. and Siebenlist, U. (1996). Activation of the serum response factor by p65/NF- κ B. *EMBO J.* *15*, 3403-3412.

Fujii, M., Minamino, T., Nomura, M., Miyamoto, K.-I., Tanaka, I., and Seiki, M. (1996). Selective activation of the proto-oncogene *c-jun* promoter by the transforming protein v-Rel. *Oncogene* 12, 2193-2202.

Fujita, T., Nolan, G. P., Ghosh, S., and Baltimore, D. (1992). Independent modes of transcriptional activation by the p50 and p65 subunits of NF-kappa B. *Genes & Dev.* 6, 775-787.

Fujita, T., Nolan, P. P., Liou, H.-C., Scott, M. L., and Baltimore, D. (1993). The candidate proto-oncogene *bcl-3* encodes a transcriptional coactivator that activates through NF-kappa B p50 homodimers. *Genes & Dev.* 7, 1354-1363.

Ganchi, P. A., Sun, S.-C., Green, W. C., and Ballard, D. W. (1992). I-kappa B/MAD-3 masks the nuclear localization signal of NF-kappa B p65 and requires the transactivating domain to inhibit NF-kappa B p65 DNA binding. *Mol. Cell. Biol.* 3, 1339-1352.

Ganchi, P. A., Sun, S.-C., Green, W. C., and Ballard, D. W. (1993). A novel NF-kappa B complex containing p65 homodimers: implications for transcriptional control at the level of subunit dimerization. *Mol. Cell. Biol.* 13, 7826-7835.

Geisler, R., Bergmann, A., Hiremi, Y., and Nüsslein-Volhard, C. (1992). Cactus, a gene involved in dorsoventral pattern formation of *Drosophila*, is related to the I-kappa B gene family of vertebrates. *Cell* 71, 613-621.

Gerondakis, S., Strasser, A., Metcalf, D., Grigoriadis, G., Scheerlinck, J.-P. Y., and Grumont, R. J. (1996). Rel-deficient T cells exhibit defects in production of interleukin 3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 3405-3409.

Ghosh, G., Van Duyne, G. D., Ghosh, S., and Sigler, P. B. (1995). Structure of NF-kappa B p50 homodimer bound to a kappa B site. *Nature* 373, 303-310.

Ghosh, S., and Baltimore, D. (1990). Activation *in vitro* of NF-kappa B by phosphorylation of its inhibitor I-kappa B. *Nature* 344, 678-682.

- Ghosh, S., Gifford, A. M., Riviere, L. R., Tempst, P., Nolan, G. P., and Baltimore, D. (1990). Cloning of the p50 DNA binding subunit of NF-kappa B: homology to *c-rel* and *dorsal*. *Cell* *62*, 1019-1029.
- Gillespie, S. K. H., and Wasserman, S. A. (1994). *dorsal*, a *Drosophila* Rel-like protein is phosphorylated upon activation of the transmembrane protein Toll. *Mol. Cell Biol.* *14*, 3559-3568.
- Gilmore, T. D., Koedood, M., Piffat, K. A., and White, D. W. (1996). Rel/NF- κ B/I κ B proteins and cancer. *Oncogene* *13*, 1367-1378.
- Goldberg, A. L. (1995). Functions of the proteasome: the lysis at the end of the tunnel. *Science* *268*, 522-523.
- Good, L., and Sun, S.-C. (1996). Persistent activation of NF- κ B/Rel by human T-cell leukemia virus type 1 Tax involves degradation of I κ B β . *J. Virol.* *70*, 2730-2735.
- Govind, S., Drier, E., Huang, L. H., and Steward, R. (1996). Regulated nuclear import of the *Drosophila* Rel protein *Dorsal*: structure-function analysis. *Mol. Cell Biol.* *16*, 1103-1114.
- Govina, S., Whalen, A. M., and Steward, R. (1992). In vivo self-association of the *Drosophila* rel-protein *dorsal*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *89*, 7861-7865.
- Grigoriadis, G., Zhan, Y., Grumont, R. J., Metcalf, D., Handman, E., Cheers, C., and Gerondakis, S. (1996). The Rel subunit of NF- κ B-like transcription factors is a positive and negative regulator of macrophage gene expression: distinct roles for Rel in different macrophage populations. *EMBO J.* *15*, 7099-7107.
- Grimm, S., Bauer, M. K. A., Baenker, P. A., and Schulze-Osthoff, K. (1996). Bcl-2 down-regulates the activity of transcription factor NF- κ B induced upon apoptosis. *J. Cell Biol.* *134*, 13-23.
- Gross, L., Georgel, P., Kappler, C., Reichhart, J.-M., and Hoffmann, J. A. (1996). *Drosophila* immunity: a comparative analysis of the Rel proteins *dorsal* and *Dif* in the induction of the genes encoding diptericin and cecropin. *Nucleic Acids Research* *24*, 1238-1245.
- Grumont, R. J., and Gerondakis, S. (1989). Structure of a mammalian c-rel protein deduced from the nucleotide sequence of murine cDNA clones. *Oncogene Research* *4*, 1-8.

- Grumont, R. J., and Gerondakis, S. (1994). The subunit composition of NF- κ B complexes changes during B-cell development. *Cell Growth & Differentiation* 5, 1321-1331.
- Grumont, R. J., Richardson, I. B., Gaff, C., and Gerondakis, S. (1993). *rel*/NF- κ B nuclear complexes that bind κ B sites in the murine *c-rel* promoter are required for constitutive *c-rel* transcription in B-cells. *Cell Growth & Differentiation* 4, 731-743.
- Guillemot, F. P., Oliver, P. D., Peault, B. M., and Le Douarin, N. (1984). Cells expressing Ia antigens in the avian thymus. *J. Exp. Med.* 160, 1803-1819.
- Hainink, M., and Temin, H. M. (1990). Structure and autoregulation of the *c-rel* promoter. *Oncogene* 5, 1843-50.
- Hansen, S. K., Bauerle, P. A., and Blasi, F. (1994). Purification, reconstitution, and I κ B association of the c-Rel-p65 (RelA) complex, a strong activator of transcription. *Mol. Cell. Biol.* 14, 2593-2603.
- Harhaj, E. W., Maggirwar, S. B., Good, L., and Sun, S.-C. (1996a). CD28 mediates a potent costimulatory signal for rapid degradation of I κ B β which is associated with accelerated activation of various NF- κ B/Rel heterodimers. *Mol. Cell. Biol.* 16, 6736-6743.
- Harhaj, E. W., Maggirwar, S. B., and Sun, S.-C. (1996b). Inhibition of p105 processing by NF- κ B proteins in transiently transfected cells. *Oncogene* 12, 2385-2392.
- Haskill, S., Beg, A. A., Tompkins, S. M., Morris, J. S., Yurochko, A. D., Sampson-Johnnes, A., Mondal, K., Ralph, P., and Jr., B. A. S. (1991). Characterization of an immediate-early gene induced in adherent monocytes that encodes I κ B-like activity. *Cell* 65, 1281-1289.
- Harada, E. N., Naumann, M., and Scheidereit, C. (1993). Common structural constituents confer I κ B activity to NF- κ B p105 and I κ B/MAD-3. *EMBO J.* 12, 2781-2788.
- Harada, E. N., Nieters, A., Wulczyn, F. G., Naumann, M., Meyer, R., Nucifora, G., McKeithan, T. W., and Scheidereit, C. (1992). The ankyrin repeat domains of the NF- κ B precursor p105 and the protooncogene bcl-3 act as specific inhibitors of NF- κ B DNA binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 2489-2493.

- Hayashi, T., Ueno, Y., and Okamoto, T. (1993). Oxidoreductive regulation of NF- κ B. Involvement of a cellular reducing catalyst thioredoxin. *J. Biol. Chem.* **268**, 11380-11388.
- Henkel, T., Machleidt, T., Alkalay, I., Krönke, M., Ben-Neriah, Y., and Baerentzen, P. A. (1993). Rapid proteolysis of I κ B α s necessary for activation of transcription factor NF- κ B. *Nature* **365**, 182-185.
- Henkel, T., Zabel, U., vanZee, K., Müller, J. M., and Fanning, E. (1992). Intramolecular masking of the nuclear localization signal and dimerization domain in the precursor for the p50 NF- κ B subunit. *Cell* **68**, 1121-1133.
- Héron, E., Deloukas, P., and Van Loon, A. P. G. M. (1995). The complete exon-intron structure of the 156-kb human gene NFKB1, which encodes the p105 and p50 proteins of transcription factors NF- κ B and I κ B α : implications for NF- κ B-mediated signal transduction. *Genomics* **30**, 493-505.
- Himes, S. R., Coles, L. S., Reeves, R., and Shannon, M. F. (1996). High mobility group (Y) is required for function and for c-Rel binding to CD28 response elements within the GM-CSF and IL-2 promoter. *Immunity* **5**, 479-489.
- Hochstrasser, M. (1996). Ubiquitin-dependent protein degradation. *Ann. Rev. Genet.* **30**.
- Houldsworth, J., Mathew, S., Rao, P. H., Dyomin, V., Leubke, C. F., Gada, N., Offit, K., and Chaganti, R. S. K. (1995). *REL* proto-oncogene is frequently overexpressed in extranodal diffuse large cell lymphoma. *Blood* **87**, 25-29.
- Hrdlickova, R., Nehyba, J., and Humphries, E. H. (1994). *In vivo* evolution of c-rel oncogenic potential. *J. Virol.* **68**, 2371-2382.
- Hrdlickova, R., Nehyba, J., and Humphries, E. H. (1994). v-rel induces expression of three avian immunoregulatory surface receptors more efficiently than c-rel. *J. Virol.* **68**, 308-319.
- Hrdlickova, R., Nehyba, J., Roy, A., Humphries, E. H., and Bose, H. R., Jr (1995). The relocation of v-rel from the nucleus to the cytoplasm coincides with induction of expression of I κ B α and nI κ B1 and stabilization of I κ B- α . *J. Virol.* **69**, 403-410.
- Hsu, H., Shu, H.-B., Pan, M.-G., and Goeddel, D. V. (1996). TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* **84**, 299-308.

- Hsu, H., Xiong, J., and Goeddel, D. V. (1995). The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF- κ B activation. *Cell* 81, 495-504.
- Ikeda, T., Hirota, Y., and Onodera, T. (1994). Isolation of a cDNA encoding the chicken ρ 50B/p97 (Lyt-10) transcription factor. *Gene* 138, 193-196.
- Ikeda, T., Honjo, K., Hirota, Y., and Onodera, T. (1993). Isolation of the chicken NF- κ B p65 subunit-encoding cDNA and characterization of its products. *Gene* 133, 237-242.
- Imbert, V., Rupec, R. A., Livelsi, A., Pahl, H. L., Traenckner, E. B.-M., Rossi, B., Auberger, P., Baeuerle, P. A., and Peyron, J.-F. (1996). Tyrosine phosphorylation of I κ B- α activates NF- κ B without proteolytic degradation of I κ B- α . *Cell* 85, 787-798.
- Imse, J., Kerr, L. D., Kakizuka, A., and Verma, I. M. (1992). I κ B γ , a 70 kd protein identical to the C-terminal half of p110 NF-kappa B: a new member of the I κ B family. *Cell* 68, 1109-1120.
- Inoue, I., Kerr, L. D., Rashid, D., Davis, N., Bose, H. J., and Verma, I. M. (1992). Direct association of pp40/I kappa B beta with rel/NF-kappa B transcription factors: role of ankyrin repeats in the inhibition of DNA binding activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 4333-4337.
- Inoue, I., Takahara, T., Akizawa, T., and Hino, O. (1993). Bcl-3, a member of the I κ B family, has distinct specificity towards the Rel family of proteins. *Oncogenes* 8, 2067-2073.
- Itozuka, M., Ishikawa, H., Kumar, S., Gelinas, C., and Ito, Y. (1994). The viral and cellular Rel oncoproteins induce the differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Oncogene* 9, 133-140.
- Ip, Y. T., Krant, R., Levine, M., and Rushlow, C. A. (1991). The dorsal morphogen is a sequence-specific DNA-binding protein that interacts with a long-range repression element in *Drosophila*. *Cell* 64, 439-446.
- Ip, Y. T., Reach, M., Engstrom, Y., Kadalayil, L., Cai, H., Gonzales-Crespo, S., Tabei, K., and Levine, M. (1993). *Dif*, a dorsal-related gene that mediates an immune response in *Drosophila*. *Cell* 75, 753-763.

Ishikawa, H., Asano, M., Kanda, T., Kumar, S., and Gelinas, C. (1993). Two novel functions associated with the Rel onc proteins: DNA replication and cell-specific transcriptional activation. *Oncogene* **6**, 2889-2896.

Ishikawa, H., Ryseck, R. P., and Bravo, R. (1996). Characterization of ES cells deficient for the p105 precursor (NF- κ B) role of p50 NLS. *Oncogene* **13**, 255-263.

Ito, C. Y., Adey, N., Bantch, V. L., and Baldwin Jr, A. S. (1995). Structure and evolution of the human *IKBA* gene. *Genomics* **29**, 490-495.

Ito, C. Y., Kazantsev, A. G., and Baldwin Jr, A. S. (1994). Three NF- κ B sites in the *I κ B α* promoter are required for induction of gene expression by TNF α . *Nucleic Acids Research* **22**, 3787-3792.

Ivanov, V. N., Deng, G., Podack, E. R., and Malek, T. R. (1995). Pleiotropic effects of Bcl-2 on transcription factors in T cells: potential role of NF- κ B p50-p50 for the anti-apoptotic function of Bcl-2. *International Immunology* **7**, 1709-1720.

Jaffray, E., Wood, K. M., and Hay, R. T. (1995). Domain organization of *I κ B α* and sites of interaction with NF- κ B p65. *Mol. Cell Biol.* **15**, 2166-2172.

Jain, J., Burgeon, E., Badalian, T. M., Hogan, P. G., and Rao, A. (1995). A similar DNA-binding motif in NFAT family proteins and the *c-myc* Homology Region. *J. Biol. Chem.* **270**, 4138-4145.

Joos, S., Otano-Joos, M. I., Ziegler, S., Bröderlein, S., du Manoir, S., Bentz, M., Möller, P., and Lichter, P. (1996). Primary mediastinal (thymic) B-cell lymphoma is characterized by gains of chromosomal material including 9p and amplification of the *REL* gene. *Blood* **87**, 1571-1578.

Jotereau, F. V., and Le Douarin, N. M. (1982). Demonstration of a cyclic renewal of the lymphocyte precursor cells in the quail thymus during embryonic and perinatal life. *The Journal of Immunologie* **129**, 1869-1877.

Kalkoven, E., Wissink, S., van der Saag, P. T., and van der burg, B. (1996). Negative interaction between the RelA (p65) subunit of NF- κ B and the progesterone receptor. *J. Biol. Chem.* **271**, 6217-6224.

Kamens, J., Richardson, P., Mosialos, G., Breat, R., and Gilmore, T. (1990). Oncogenic transformation by v-Rel requires an amino-terminal activation domain. *Mol. Cell Biol.* *10*, 2840-2847.

Kanno, T., and Siebenlist, U. (1996). Activation of Nuclear Factor- κ B via T Cell Receptor requires a Raf kinase and Ca^{2+} influx. *J. Immunol.* *157*, 5277-5283.

Kao, K. R., and Hopwood, N. D. (1991). Expression of a mRNA related to c-rel and dorsal in early *Xenopus laevis* embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *88*, 2697-2701.

Kaye, K. M., Devergne, O., Harada, J. N., Izumi, K. M., Yalamanchili, R., Kieff, E., and Mosialos, G. (1996). Tumor necrosis factor receptor associated factor 2 is a mediator of NF- κ B activation by latent infection membrane protein 1, the Epstein-Barr virus transforming protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *93*, 11085-11090.

Kerr, L. D., Duckett, C. S., Wamsley, P., Zhang, Q., Chiao, P., Nabel, G., McKeithan, T. W., Baenerle, P. A., and Verma, I. M. (1992). The proto-oncogene *BCL-3* encodes an I κ B protein. *Genes & Dev.* *6*, 2352-2363.

Kerr, L. D., Inoue, J., Davis, N., Link, E., Baenerle, P. A., Bose, H. J., and Verma, I. M. (1991). The Rel-associated pp40 protein prevents DNA binding of Rel and NF- κ B: relationship with I κ B β and regulation by phosphorylation. *Genes & Dev.* *5*, 1464-1476.

Kerr, L. D., Ransone, L. J., Wamsley, P., Schmitt, M. J., Boyer, T. G., Zhou, Q., Berk, A. J., and Verma, I. M. (1993). Association between proto-oncoprotein Rel and TATA-binding protein mediates transcriptional activation by NF- κ B. *Nature* *365*, 412-419.

Kidd, S. (1992). Characterization of the *Drosophila cactus* locus and analysis of interactions between cactus and dorsal proteins. *Cell* *71*, 623-635.

Kieran, M., Blank, V., Logez, F., Vandekerckhove, J., Lonspeich, F., Le, B. O., Urban, M. B., Kourilsky, P., Baenerle, P. A., and Israel, A. (1990). The DNA binding subunit of NF-kappa B is identical to factor KBF1 and homologous to the rel oncogene product. *Cell* *62*, 1007-1018.

Kitajima, I., Shinoura, T., Bilakovics, J., Brown, D., Xu, X., and Nerenberg, M. (1992). Ablation of transplanted HTLV-I Tax transformed tumor in mice by antisense inhibition of NF- κ B. *Science* *258*, 1792-1795.

- Kitajima, I., Soejima, Y., Takasaki, I., Bep̄u, H., Tokioka, T., and Maruyama, I. (1996). Ceramide-induced nuclear translocation of NF- κ B is a potential mediator of the apoptotic response to TNF α in murine clonal osteoblast. *Bone* 19, 263-270.
- Klement, J. F., Rice, N. L., car, D. B., Abbondanzo, S. J., Powers, G. D., Bhatt, H., Chen, C.-H., Rosen, C. A., and Stewart, C. L. (1996). I κ B α deficiency results in a sustained NF- κ B response and severe widespread dermatitis in mice. *Mol. Cell. Biol.* 16, 2341-2349.
- Kochel, T., Mushinski, J. F., and Rice, N. R. (1991). The *v-Rel* and *c-Rel* proteins exist in high molecular weight complexes in avian and murine cells. *Oncogene* 6, 615-26.
- Köntgen, F., Grumont, R. J., Strasser, A., Metcalf, D., Li, R., Tarlinton, D., and Gerondakis, S. (1995). Mice lacking the *c-rel* proto-oncogene exhibit defects in lymphocyte proliferation, humoral immunity, and interleukin-2 expression. *Genes & Dev.* 9, 1965-1977.
- Kopp, E. B., and Ghosh, S. (1995). NF- κ B and Rel proteins in innate immunity. *Advances in Immunology* 58, 1-27.
- Kralova, J., Schatzle, J. D., Bargmann, W., and Bose, H. R. J. (1994). Transformation of avian fibroblasts overexpressing the *c-rel* proto-oncogene and a variant of *c-rel* lacking 40 C-terminal amino acids. *J. Virol.* 68, 2073-2083.
- Kralova, J., Schatzle, J. D., Liss, A. S., Bargmann, W., and Bose Jr, H. R. (1996). Synergistic stimulation of avian I κ B α transcription by *rel* and *fos/jun* factors. *Oncogene* 12, 2595-2604.
- Krappmann, D., W ulczyn, F. G., and Scheidereit, C. (1996). Different mechanisms control signal-induced degradation and basal turn-over of the NF- κ B inhibitor I κ B α *in vivo*. *EMBO J.* 15, 6716-6726.
- Kumar, A., Haque, J., Lacoste, J., Hiscott, J., and Williams, B. R. (1994). Double-stranded RNA-dependent proteinase kinase activates transcription factor NF- κ B by phosphorylating I κ B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 6288-6292.
- Kumar, S., and Gelinas, C. (1993). I κ B α -mediated inhibition of *v-Rel* DNA binding requires direct interaction with the RXXRXXXC Rel/I κ B DNA-binding motif. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 8962-8965.

Kumar, S., Rabson, A. B., and Gelinas, C. (1992). The RXXRXXXC motif conserved in all Rel κ B proteins is essential for the DNA-binding activity and redox regulation of the v-Rel oncoprotein. *Mol. Cell. Biol.* *12*, 3094-3106.

Kunsch, C., Ruben, S. M., and Rosen, C. A. (1992). Selection of optimal κ B Rel DNA-binding motifs: interaction of both subunits of NF- κ B is required for transcriptional activation. *Mol. Cell. Biol.* *12*, 4412-4421.

Lacoste, J., Petropoulos, L., Pepin, N., and Hiscott, J. (1995). Constitutive phosphorylation and turnover of I κ B α in Human T-Cell Leukemia Virus type I-infected and Tax-Expressing T Cells. *J. Virol.* *69*, 564-569.

Laegreid, A., Medvedev, A., Nonstad, U., Dombara, M. P., Ranges, G., Sundan, A., and Espevik, T. (1994). Tumor necrosis factor receptor p75 mediates cell-specific activation of nuclear factor κ B and induction of human cytomegalovirus enhancer. *J. Biol. Chem.* *269*, 7785-7791.

Lanoix, J., Lacoste, J., Pepin, N., Rice, N., and Hiscott, J. (1994). Overproduction of NFKB2 (*lys-10*) and c-Rel: a mechanism for HTLV-I Tax-mediated *trans*-activation via the NF- κ B signalling pathway. *Oncogene* *9*, 841-852.

Le Bail, O., Schmidt-Ullrich, R., and Israël, A. (1993). Promoter analysis of the gene encoding the I κ B α /MAD3 inhibitor of NF- κ B: positive regulation by members of the Rel/NF- κ B family. *EMBO J.* *12*, 5043-5049.

Le Douarin, N. M., and Jotereau, F. V. (1975). Tracing of cells of the avian thymus through embryonic life in interspecific chimeras. *J. of Exp. Med.* *142*, 17-40.

Lee, B., Arsura, M., Wu, M., Dnyao, M., Buckler, A. J., and Sonenshein, G. E. (1995). Role of Rel-related factors in control of c-myc gene transcription in receptor-mediated apoptosis of the murine cell WEHI 231 line. *J. Exp. Med.* *181*, 1169-1177.

Lee, F. S., Hagler, J., Chen, Z. J., and Maniatis, T. (1997). Activation of the I κ B α kinase complex by MEKK1, a kinase of the JNK pathway. *Cell* *88*, 213-222.

Lehming, N., Thanos, D., Brickman, J. M., Ma, J., Maniatis, T., and Ptashne, M. (1994). An HMG-like protein that can switch a transcriptional activator to a repressor. *Nature* **371**, 175-179.

Lemaitre, B., Meister, M., Govind, S., Georget, P., Steward, R., Reichart, J. M., and Hoffmann, J. (1995). Functional analysis and regulation of nuclear import of *dorsal* during the immune response in *drosophila*. *EMBO J.* **14**, 536-545.

Lembecher, T., Müller, U., and Wirth, T. (1993). Distinct NF- κ B/Rel transcription factors are responsible for tissue-specific and inducible gene activation. *Nature* **365**, 767-770.

Lewin, S. R., Lambert, P., Deacon, N. J., Mills, J., and Crowe, S. M. (1997). Constitutive expression of p50 homodimer in freshly isolated human monocytes decreases with in vitro and in vivo differentiation: a possible mechanism influencing Human Immunodeficiency Virus replication in monocytes and mature macrophages. *J. Virol.* **71**, 2114-2119.

Li, C. H., Ruscetti, F. W., Rice, N. R., Chen, E., Yang, N., Mikovits, J., and Longo, D. L. (1993). Differential expression of Rel family members in human T-cell leukemia virus type I-infected cell: transcriptional activation of *c-rel* by Tax protein. *J. Virol.* **67**, 4205-4213.

Li, S., and Sedivy, J. M. (1993). Raf-1 protein kinase activates the NF- κ B transcription factor by dissociating the cytoplasmic NF- κ B-I κ B complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 9247-9251.

Lim, M. Y., Davis, N., Zhang, J. Y., and Bose, H. J. (1993). The v-rel oncogene product is complexed with cellular proteins including its proto-oncogene product and heat shock protein 70. *Virology* **175**, 149-60.

Lin, K.-I., Lee, S.-H., Narayanan, J. M., Hardwick, J. M., and Ratan, R. R. (1995). Thiol agents and Bcl-2 identify an alphavirus-induced apoptotic pathway that requires activation of the transcription factor NF- κ B. *J. Cell Biol.* **131**, 1149-1161.

Lin, L., and Ghosh, S. (1996). A glycine-rich region in NF- κ B p105 functions as a processing signal for the generation of the p50 subunit. *Mol. Cell Biol.* **16**, 2248-2254.

Lin, R., Beauparlant, P., Makris, C., Meloche, S., and Hiscott, J. (1996). Phosphorylation of I κ B α in the C-terminal PEST domain by casein kinase II affects intrinsic protein stability. *Mol. Cell Biol.* **16**, 1404-1409.

Lin, Y. C., Brown, K., and Siebenlist, U. (1995). Activation of NF- κ B requires proteolysis of the inhibitor I κ B- α : signal-induced phosphorylation of I κ B- α alone does not release active NF- κ B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 552-556.

Link, E., Kerr, L. D., Schreck, R., Zabel, U., Verma, I., and Baeuerle, P. A. (1992). Purified I κ B- β is unactivated upon dephosphorylation. *J. Biol. Chem.* **267**, 239-246.

Liou, H.-C., Nolan, G. P., Ghosh, S., Fujita, T., and Baltimore, D. (1992). The NF- κ B p50 precursor, p10 β , contains an internal I κ B-like inhibitor that preferentially inhibits p50. *EMBO J.* **11**, 3003-3009.

Liou, H.-C., Sha, W., Scott, M., and Baltimore, D. (1994). Sequential induction of NF- κ B/Rel family proteins during B-Cell terminal differentiation. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 5349-5359.

Liptay, S., Schindl, R. M., Nabel, E. G., and Nabel, G. J. (1994). Transcriptional regulation of NF- κ B2: evidence for κ B-mediated positive and negative auto-regulation. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 7695-7703.

Liu, J., Sodecka, M., Lane, W. S., and Verdine, G. L. (1994). Evidence for a non-alpha-helical DNA-binding motif in the Rel homology region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 908-912.

Liu, Z., Hsu, H., Goeddel, D. V., and Karin, M. (1996). Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF- κ B activation prevents cell death. *Cell* **87**, 565-576.

Lofquist, A. K., Mendal, K., Morris, J. S., and Haskill, J. S. (1995). Transcription-independent turnover of I κ B α during monocyte adherence: implication for a translational component regulating I κ B α /MAD-3 mRNA levels. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 1737-1746.

Logeat, F. L., N. Ten, R. Blank, V. Le Bail, O. Kourilsky, P. Israël, A. (1991). Inhibition of transcription factors belonging to the rel/NF- κ B family by a transdominant negative mutant. *EMBO J.* **10**, 1827-1832.

Lu, D., Thompson, J. D., Gerski, G. K., Rice, N. R., Mayer, M. G., and Yunis, J. J. (1991). Alterations at the rel locus in human lymphoma. *Oncogene* **6**, 1235-1241.

- MacKichan, M. L., Logeat, F., and Israël, A. (1996). Phosphorylation of p105 PEST sequences via a redox-insensitive pathway up-regulates processing to p50 NF- κ B. *J. Biol. Chem.* *271*, 6084-6091.
- Marsters, S. A., Sheridan, J. P., Donahue, C. J., Pitti, R. M., Gray, C. L., Goddard, A. D., Bauer, K. D., and Ashkenazi, A. (1996). Apo-3, a new member of the tumor necrosis factor receptor family, contains a death domain and activates apoptosis and NF- κ B. *Current Biology* *6*, 1669-1676.
- Mathews, J. R., Kaszubska, W., Turcatti, G., Wells, N. C. T., and Hay, R. T. (1993). Role of cysteine₆₂ in DNA recognition by the p50 subunit of NF- κ B. *Nucleic Acids Research* *21*, 1727-1734.
- Mathews, J. R., Watson, E., Buckley, S., and Hay, R. T. (1993). Interaction of the C-terminal region of p105 with the nuclear localisation signal of p50 is required for inhibition of NF- κ B DNA binding activity. *Nucleic Acids Research* *21*, 4516-4523.
- McCaffrey, P. G., Luo, C., Kempola, T. K., Jain, J., Badalian, T. M., Ho, A. M., Burgeon, E., Lane, W. S., Lambert, J. N., Curran, T., Verdine, G. L., Rao, A., and Hogan, P. G. (1993). Isolation of the Cyclosporin-sensitive T Cell transcription factor NFATp. *Science* *262*, 750-754.
- McElhinny, J. A., Trushin, S. A., Bren, G. D., Chester, N., and Paya, C. V. (1996). Casein kinase II phosphorylates I κ B α at S-283, S-289, S-293, and T-291 and is required for its degradation. *Mol. Cell Biol.* *16*, 899-906.
- Mellits, K. H., Hay, R. T., and Goodbourn, S. (1993). Proteolytic degradation of MAD3 (I κ B α) and enhanced processing of the NF- κ B precursor p105 are obligatory steps in the activation of NF- κ B. *Nucleic Acids Research* *21*, 5054-5066.
- Mercurio, F., DiDonato, J., Rosette, C., and Karin, M. (1992). Molecular cloning and characterization of a novel Rel/NF- κ B family member displaying structural and functional homology to NF- κ B p50-p105. *DNA Cell Biol.* *11*, 523-537.
- Mercurio, F., DiDonato, J. A., Rosette, C., and Karin, M. (1993). p105 and p98 precursor proteins play an active role in NF- κ B-mediated signal transduction. *Genes & Dev.* *7*, 705-718.
- Meyer, R., Hatada, E. N., Hohmann, H. P., Haiker, M., Bartsch, C., Rothlisberger, U., Lahm, H. W., Schlaeger, E. J., van, L. A., and Scheidereit, C. (1991). Cloning of the DNA-

binding subunit of human nuclear factor kappa B: the level of its mRNA is strongly regulated by phorbol ester or tumor necrosis factor alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 966-970.

Michaely, P., and Bennett, V. (1992). The ANK repeat: a ubiquitous motif involved in macromolecular recognition. *Trends in Cell Biol.* 2, 127-129.

Milligan, S. A., Owens, M. W., and Grisham, M. B. (1996). Inhibition of I κ B α and I κ B β proteolysis by calpain inhibitor I blocks nitric oxide synthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 335, 388-395.

Miyamoto, S., Chiao, P. J., and Verma, I. V. (1994). Enhanced I κ B α degradation is responsible for constitutive NF- κ B activity in mature murine B-cell lines. *Molecular and Cellular Biology* 14, 3276-3282.

Miyamoto, S., and Verma, I. M. (1995). Rel/NF- κ B/I κ B story. *Adv. Cancer Res.* 66, 255-292.

Montano, M. A., Kripke, K., Norina, C. D., Achacoso, P., Herzenberg, L. A., Roy, A. L., and Nolan, G. P. (1996). NF- κ B homodimer binding within the HIV-1 initiator region and interactions with TFII-I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93.

Moore, B. E., and Bose, H. R. (1989). Expression of the *c-rel* and *c-myc* proto-oncogenes in avian tissues. *Oncogene* 4, 845-852.

Moore, N. C., Girdlestone, J., Anderson, G., Owen, J. J. T., and Jenkinson, E. I. (1995). Stimulation of thymocytes before and after positive selection results in the induction of different NF- κ B/Rel protein complexes. *J. of Immunology* 155, 4653-4660.

Moore, P. A., Rivera, S. M., and Rosen, C. A. (1993). Conservation of transcriptional activation functions of the NF- κ B p50 and p65 subunits in mammalian cells and *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 13, 1666-1674.

Morrison, L. E., Kabrun, N., Mudri, S., Hayman, M. J., and Enrietto, P. J. (1989). Viral *rel* and cellular *rel* associate with cellular proteins in transformed and normal cells. *Oncogene* 4, 677-683.

Mesialos, G., and Gilmore, T. D. (1993). v-Rel and c-Rel are differentially affected by mutations at a consensus protein kinase recognition sequence. *Oncogene* 8, 721-730.

Mosialos, G., Hamer, P., Capobianco, A. J., Laursen, R. A., and Gilmore, T. D. (1991). A protein kinase-A recognition sequence is structurally linked to transformation by p59^{v-rel} and cytoplasmic retention of p68^{c-rel}. *Mol. Cell Biol.* *11*, 5867-5877.

Müller, C. W., Rey, F. A., and Harrison, S. C. (1996). Comparison of two different DNA-binding modes of the NF- κ B p50 homodimer. *Nature Structural Biology* *3*, 224-227.

Müller, C. W., Rey, F. A., Sodeoka, M., Verdine, G. L., and Harrison, S. C. (1995). Structure of the NF- κ B p50 homodimer bound to DNA. *Nature* *373*, 311-317.

Narayanan, R., Klement, J. F., Ruben, S. M., Higgins, K. A., and Rosen, C. A. (1992). Identification of a naturally occurring transforming variant of the p65 subunit of NF-kappa B. *Science* *256*, 367-70.

Naumann, M., Nieters, A., Hatada, E. N., and Scheidereit, C. (1993). NF- κ B precursor p100 inhibits nuclear translocation and DNA-binding of NF- κ B/*rel*-factors. *Oncogene* *8*, 2275-2281.

Naumann, M., and Scheidereit, C. (1994). Activation of NF- κ B *in vivo* is regulated by multiple phosphorylations. *EMBO J.* *13*, 4597-4607.

Naumann, M., Walczyn, F. G., and Scheidereit (1993). The NF- κ B precursor p105 and the proto-oncogene product Bcl-3 are I κ B molecules and control nuclear translocation of NF- κ B. *EMBO J.* *12*, 213-222.

Nehyba, J. H., R. Humphries, E. H. (1994). Evolution of the oncogenic potential of *v-rel*: *rel*-induced expression of immunoregulatory receptors correlates with tumor development and *in vitro* transformation. *J. Virol.* *68*, 2039-2050.

Neiman, P. E., Thomas, S. J., and Loring, G. (1991). Induction of apoptosis during normal and neoplastic B-cell development in the bursa of Fabricius. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *88*, 5857-5861.

Neish, A. S., Read, M. A., Thanos, D., Pine, R., Mainiatis, T., and Collins, T. (1995). Endothelial interferon regulatory factor 1 cooperates with NF- κ B as a transcriptional activator of vascular cell adhesion molecule 1. *Mol. Cell Biol.* *15*, 2558-2569.

Neri, A., Chang, C. C., Lombardi, L., Salina, M., Corradini, P., Maiolo, A. T., Chaganti, R. S. K., and Dalla-Favera, R. (1991). B cell lymphoma-associated chromosomal translocation involves candidate oncogene *lyt-10*, homologous to NF- κ B p50. *Cell* 67, 1075-1087.

Neumann, M., Grieshammer, T., Chuvpilo, S., Kneitz, B., Lohoff, M., Schimpl, A., Franza Jr, B. R., and Serfling, E. (1995). RelA/p65 is a molecular target for the immunosuppressive action of protein kinase A. *EMBO J.* 14, 1991-2004.

Neumann, M., Wohlleb, G., Chuvpilo, S., Kistler, B., Wirth, T., Serfling, E., and Schimpl, A. (1996). CD40, but not lipopolysaccharide and anti-IgM stimulation of primary B lymphocytes, leads to a persistent nuclear accumulation of RelB. *J. Immunol.* 157, 4862-4869.

Nolan, G. P., Fujita, T., Bhatia, K., Huppi, C., Liou, H., Scott, M. L., and Baltimore, D. (1993). The *bcl-3* proto-oncogene encodes a nuclear I κ B-like molecule that preferentially interacts with NF- κ B p50 and p52 in a phosphorylation-dependent manner. *Mol. Cell. Biol.* 13, 3557-3566.

Nolan, G. P., Ghosh, S., Liou, H. C., Tempst, P., and Baltimore, D. (1991). DNA binding and I κ B inhibition of the cloned p65 subunit of NF-kappa B, a rel-related polypeptide. *Cell* 64, 961-969.

Northrop, J. P., Ho, S. N., Chen, L., Thomas, D. J., Timmerman, L. A., Nolan, G. P., Admon, A., and Crabtree, G. R. (1994). NF-AT components define a family of transcription factors targeted in T-cell activation. *Nature* 369, 497-502.

Nossal, G. J. V. (1994). Negative selection of lymphocytes. *Cell* 76, 229-239.

Ohno, H., Takino, G., and McKeithan, T. W. (1990). The candidate proto-oncogene *bcl-3* is related to genes implicated in cell lineage determination and cell cycle control. *Cell* 50, 991-997.

Orian, A., Whiteside, S., Israel, A., Stancovski, L., Schwartz, A. L., and Ciechanover, A. (1995). Ubiquitin-mediated processing of NF- κ B transcriptional activator precursor p105. Reconstitution of a cell-free system and identification of the ubiquitin-carrier protein E2 and a novel ubiquitin-protein ligase E3 involved in conjugation. *J. Biol. Chem.* 271, 376-379.

Pahl, H. L., and Baeuerle, P. A. (1995). A novel signal transduction pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus is mediated by transcription factor NF- κ B. *EMBO J.* 14, 2580-2588.

- Pahl, H. L., Sester, M., Burgert, H.-G., and Baernerle, P. A. (1996). Activation of transcription factor NF- κ B by the adenovirus E3/19K protein requires its ER retention. *J. Cell Biol.* *132*, 511-522.
- Paine, E., Scheinman, R. L., Baldwin JR., A. S., and Raab-Traub, N. (1995). Expression of LMP1 in epithelial cells leads to the activation of a select subset of Rel/NF- κ B family proteins. *J. Virol.* *69*, 4572-4576.
- Palombella, V. J., Rando, O. J., Goldberg, A. L., and Maniatis, T. (1994). The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF- κ B1 precursor protein and the activation of NF- κ B. *Cell* *78*, 773-785.
- Parry, G. C. N., and Mackman, N. (1994). A set of inducible genes expressed by activated human monocytic and endothelial cells contain κ B-like sites that specifically bind c-Rel-p65 heterodimers. *J. Biol. Chem.* *269*, 20823-20825.
- Peck, R., Murthy, K. K., and Vainio, O. (1982). Expression of B-L (Ia-like) antigens on macrophages from chicken lymphoid organs. *The Journal of Immunology* *129*, 4-5.
- Perez, P., Lira, S. A., and Bravo, R. (1995). Overexpression of RelA in transgenic mouse thymocytes: specific increase levels of the inhibitory protein I κ B α . *Mol. Cell. Biol.* *15*, 3523-3530.
- Perkins, N. D., Schmid, R. M., Duckett, C. S., Leung, K., Rice, N. R., and Nabel, G. J. (1992). Distinct combinations of NF-kappa B subunits determine the specificity of transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *89*, 1529-1533.
- Petropoulos, L., Lin, R., and Hiscott, J. (1996). Human T Cell Leukemia Virus 1 Tax protein increases NF- κ B dimer formation and antagonizes the inhibitory activity of the I κ B α regulatory protein. *Virology* *225*, 52-64.
- Phi Van, L. (1996). Transcriptional activation of the chicken lysozyme gene by NF- κ Bp65 (RelA) and c-Rel, but not by NF- κ Bp50. *Biochem J.* *313*, 39-44.
- Phillips, R. J., Gustafson, S., and Ghosh, S. (1996). Identification of a novel NF- κ B p50-related protein in B lymphocytes. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 7089-7097.

Pierce, J.W., Jamieson, C.A., Ross, J.L., and Sen, R. (1995). Activation of IL-2 receptor α -chain gene by individual members of the *rel* oncogene family in association with serum responsive factor. *J. Immunol.* *155*, 1972-1980.

Plaksin, D., Baerle, P. A., and Eisenbach, L. (1993). KBF1 (p50 NF- κ B homodimer) acts as a repressor of H-2K^b gene expression in metastatic tumor cells. *J. Exp. Med.* *177*, 1651-1662.

Ponton, A., Clément, V., and Stamenkovic, I. (1996). The CD95 (APO-1/FAS) receptor activates NF- κ B independently of its cytotoxic function. *J. Biol. Chem.* *271*, 8991-8995.

Powell, P. P., Dixon, L. K., and Parkhouse, R. M. E. (1996). An I κ B homolog encoded by African Swine Fever Virus provides a novel mechanism for downregulation of proinflammatory cytokine responses in host macrophages. *J. Virol.* *70*, 8527-8533.

Raj, G. V., Safak, M., MacDonald, G. H., and Khalili, K. (1996). Transcriptional regulation of the human polyomavirus JC: evidence for a functional interaction between RelA (p65) and the Y-Box-Binding protein, YB-1. *J. Virol.* *70*, 5944-5953.

Ray, A., and Prefontaine, K. E. (1994). Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF- κ B and the glucocorticoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *91*, 752-756.

Ray, P., Zhang, D. H., Elias, J., and Ray, A. (1995). Cloning a differentially expressed I κ B-related protein. *J. Biol. Chem.* *270*, 680-685.

Read, M. C., Whitley, M. Z., Williams, A. J., and Collins, T. (1994). NF- κ B and I κ B α : an inducible regulatory system in endothelial activation. *J. Exp. Med.* *179*, 503-512.

Rechsteiner, M. (1990). PEST sequences are signals for rapid intracellular proteolysis. *Semin. Cell Biol.* *1*, 433-440.

Rice, N., and Ernst, M. K. (1993). In vivo control of NF- κ B activation by I κ B α . *EMBO J.* *12*, 4685-4695.

Rice, N., MacKichan, M. L., and Israël, A. (1992). The precursor of NF- κ B p50 has I κ B-like functions. *Cell* *71*, 243-253.

Richardson, P. M., and Gilmore, T. D. (1991). vRel is an inactive member of the Rel family of transcriptional activating proteins. *J. Virol.* **65**, 3122-3130.

Rivière, Y., Blank, V., Kourilski, P., and Israël, A. (1991). Processing of the precursor of NF- κ B by the HIV-1 protease during acute infection. *Nature* **350**, 625-626.

Rodríguez, M. S., Wright, J., Thompson, J., Thomas, D., Baleux, F., Virelizier, J.-L., Hay, R. T., and Arenzana-Seisdedos, F. (1996). Identification of lysine residues required for signal-induced ubiquitination and degradation of I κ B α *in vivo*. *Oncogene* **12**, 2425-2435.

Roff, M., Thompson, J., Rodríguez, M. S., Jacque, J.-M., Baleux, F., Arenzana-Seisdedos, F., and Hay, R. T. (1996). Role of I κ B α ubiquitination in signal-induced activation of NF- κ B *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **271**, 7844-7850.

Romero, P., and Humphries, A. H. (1995). A mutant v-rel with increased ability to transform B lymphocytes. *J. Virol.* **69**, 301-307.

Rooney, J.W., Sun, Y.L., Glimcher, L.H., and Hoey, T. (1995). Novel NFAT sites that mediate activation of the interleukin-2 promoter in response to T-cell receptor stimulation. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 6299-6310.

Rosette, C., and Karin, M. (1995). Cytoskeletal control of gene expression: depolymerization of microtubules activates NF- κ B. *J. Cell Biol.* **128**, 1111-1119.

Roth, S., Hiromi, Y., Godt, D., and Nüsslein-Volhard, C. (1991). *cactus*, a maternal gene required for proper formation of the dorsoventral morphogen gradient in *Drosophila* embryos. *Development* **112**, 371-388.

Rottjakob, E. M., Sachdev, S., Leanna, C. A., McKinsey, T. A., and Hannink, M. (1996). PEST-dependent cytoplasmic retention of v-Rel by I κ B- α : evidence that I κ B- α regulates cellular localization of c-Rel and v-Rel by distinct mechanisms. *J. Virol.* **70**, 3176-3188.

Ruben, S. M., Dillon, P. J., Schreck, R., Henkel, T., Chen, C. H., Maher, M., Baeuerle, P. A., and Rosen, C. A. (1991). Isolation of a rel-related human cDNA that potentially encodes the 65-kD subunit of NF-kappa B. *Science* **251**, 1490-1493.

Ruben, S. M., Klement, J. F., Coleman, T. A., Maher, M., Chen, C. H., and Rosen, C. A. (1992). I-Rel: a novel rel-related protein that inhibits NF-kappa B transcriptional activity. *Genes & Dev.* **6**, 745-760.

- Ruben, S. M., Narayanan, R., Klement, J. F., Chen, C. H., and Rosen, C. A. (1992). Functional characterization of the NF-kappa B p65 transcriptional activator and an alternatively spliced derivative. *Mol. Cell. Biol.* *12*, 444-454.
- Ryseck, R.-P., Novotny, J., and Bravo, R. (1995). Characterization of elements determining the dimerization properties of RelB and p50. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 3100-3109.
- Ryseck, R. P., Bull, P., Takamiya, M., Bours, V., Siebenlist, U., Dobrzanski, P., and Bravo, R. (1992). RelB, a new Rel family transcription activator that can interact with p50-NF-kappa B. *Mol. Cell. Biol.* *12*, 674-684.
- Sarkar, S., and Gilmore, T. D. (1993). Transformation by v-Rel oncoprotein requires sequences carboxy-terminal to the Rel homology domain. *Oncogene* *8*, 2245-2252.
- Schatzle, I. D., Kralova, J., and Bose, H. R. (1995). Avian I κ B α is transcriptionally induced by c-Rel and v-Rel with different kinetics. *Journal of Virology* *69*, 5383-5390.
- Scheinman, R. L., Beg, A. A., and Baldwin Jr, A. S. (1993). NF- κ B p100 (Lyt-10) is a component of H2TFI and can function as an I κ B-like molecule. *Mol. Cell. Biol.* *13*, 6089-6101.
- Scheinman, R. L., Cogswell, P. C., Lofquist, A. K., and Baldwin, A. S. (1995). Role of transcriptional activation of I κ B α in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science* *270*, 283-286.
- Scheinman, R. L., Gualberto, A., Jewell, C. M., Cidlowski, J. A., and Baldwin Jr, A. S. (1995). Characterization of mechanisms involved by activated glucocorticoid receptors. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 943-953.
- Scherer, D. C., Brockman, J. A., Bendall, H. H., Zhang, G. M., Ballard, D. W., and Olitz, E. M. (1996). Corepression of RelA and c-Rel inhibits immunoglobulin κ gene transcription and rearrangement in precursor B lymphocytes. *Immunity* *5*, 563-574.
- Schmid, R. M., Liptay, S., Betts, J. C., and Nabel, G. P. (1994). Structural and functional analysis of NF- κ B. *J. Biol. Chem.* *269*, 32162-32167.

- Schmid, R. M., Perkins, N.D., Duckett, C. S., Andrews, P. C., and Nabel, G. J. (1991). Cloning of an NF- κ B subunit which stimulates HIV transcription in synergy with p65. *Nature* 352, 733-736.
- Schmitz, M. L., and Baerle, P. A. (1991). The p65 subunit is responsible for the strong transcription activating potential of NF- κ B. *EMBO J.* 10, 3805-3817.
- Schouten, G. J., Van der Eb, A. J., and Zantema, A. (1995). Downregulation of MHC class I expression due to interference with p105-NF- κ B1 processing by Ad12E1A. *EMBO J.* 14, 1498-1507.
- Schreck, R., and Baerle, P. A. (1994). Assessing oxygen radicals as mediators in activation of inducible eukaryotic transcription factor NF- κ B. *Methods Enzymol.* 234, 151-163.
- Scott, M. L., Fujita, T., Liou, H. C., Nolan, G. P., and Baltimore, D. (1993). The p65 subunit of NF- κ B regulates I κ B by two distinct mechanisms. *Genes and Development* 7, 1266-1276.
- Sen, J., Venkataraman, S., Y., Pierce, J. W., Alt, F. W., Buraloff, S. J., and Sen, R. (1995). Expression and induction of Nuclear Factor- κ B-related proteins in thymocytes. *The Journal of immunology* 154, 3213-3221.
- Sen, R., and Baltimore, D. (1986a). Inducibility of κ immunoglobulin enhancer-binding protein NF- κ B by a posttranslational mechanism. *Cell* 47, 921-928.
- Sen, R., and Baltimore, D. (1985b). Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 46, 705-716.
- Sha, W. C., Liou, H. C., Tuomanen, E., and Baltimore, D. (1995). Targeted disruption of the p50 subunit of NF- κ B leads to multifocal defects in immune responses. *Cell* 80, 321-330.
- Sica, A., Tan, T.-H., Rice, N., Kretschmar, M., Ghosh, P., and Young, H. A. (1992). The *c-rel* protooncogene product c-Rel but not NF- κ B binds to the intronic region of the human interferon- γ gene at a site related to an interferon-stimulable response element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 1740-1744.
- Siebealst, U., Franzoso, G., and Brown, K. (1994). Structure, regulation and function of NF- κ B. *Annu. Rev. Cell Biol.* 405-55.

Sif, S., and Gilmore, T. D. (1993). NF- κ B p100 is one of the high-molecular-weight proteins complexed with the v-Rel oncoprotein in transformed chicken spleen cells. *J. Virol.* *67*, 7612-7617.

Singh, S., Darnay, B. G., and Aggarwal, B. B. (1996). Site-specific tyrosine phosphorylation of I κ B α negatively regulates its inducible phosphorylation and degradation. *J. Biol. Chem.* *271*, 31049-31054.

Sivasubramanian, N., Adhikary, G., Sil, P. C., and Sen, S. (1996). Cardiac myotrophin exhibits *rel*/NF- κ B interacting activity *in vitro*. *J. Biol. Chem.* *271*, 2812-2816.

Solignac, M., Periquet, G., Anxolabehère, D., and Petit, C. (1995). Génétique et évolution tome II, l'espèce, l'évolution moléculaire. Hermann, éditeurs des sciences et des arts, Paris.

Stein, B., and Baldwin Jr., A. S. (1993). Distinct mechanisms for regulation of the interleukine-8 gene involve synergism and cooperativity between C/EBP and NF- κ B. *Mol. Cell. Biol.* *13*, 7191-7198.

Stein, B., Baldwin Jr., A. S., Ballard, D. W., Greene, W. C., Angel, P., and Herrlich, P. (1993). Cross-coupling of the NF- κ B p65 and Fos/Jun transcription factors produces potentiated biological function. *EMBO J.* *12*, 3879-3891.

Stein, B., and Yang, M. X. (1995). Repression of the interleukine-6 promoter by oestrogen receptor is mediated by NF- κ B and C/EBP β . *Mol. Cell. Biol.* *15*, 4971-4979.

Steward, R. (1987). *Dorsal*, an embryonic polarity gene in *Drosophila*, is homologous to the vertebrate proto-oncogene *c-rel*. *Science* *238*, 692-694.

Storrs, R. W., and Bose, H. J. (1992). Alterations within pp59v-rel-containing protein complexes following the stimulation of REV-T-transformed lymphoid cells with zinc. *Virology* *188*, 765-777.

Sun, S.-C., Elwood, J., Béraud, C., and Greene, W. C. (1994). Human T-Cell Leukemia Virus Type I Tax activation of NF- κ B/Rel involves phosphorylation and degradation of I κ B α and RelA (p65)-mediated induction of the *c-rel* gene. *Mol. Cell. Biol.* *14*, 7377-7384.

Sun, S.-C., Elwood, J., and Greene, W. C. (1996). Both amino- and carboxy-terminal sequences within I κ B α regulate its inducible degradation. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 1058-1065.

- Sun, S.-C., Ganchi, P. A., Ballard, D. W., and Greene, W. C. (1993). NF- κ B controls expression of inhibitor I κ B α : evidence for an inducible autoregulatory pathway. *Science* 257, 1912-1914.
- Sun, S. C., Ganchi, P. A., Béraud, C., Ballard, D. W., and Greene, W. C. (1994). Autoregulation of the NF- κ B transactivator RelA (p65) by multiple cytoplasmic inhibitors containing ankyrin motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 1346-1350.
- Suyang, H., Phillips, R., Douglas, L., and Ghosh, S. (1996). Role of unphosphorylated, newly synthesized I κ B β in persistent activation of NF- κ B. *Mol. Cell. Biol.* 16, 5444-5449.
- Suzuki, K., Yamamoto, T., and Inoue, J. (1995). Molecular cloning of cDNA encoding the *Xenopus* homolog of mammalian RelB. *Nucleic Acids Research* 23, 4664-4669.
- Suzuki, T., Hirai, H., and Yoshida, M. (1994). Tax protein of HTLV-1 interacts with the Rel homology domain of NF- κ B p65 and c-Rel proteins bound to the NF- κ B binding site and activates transcription. *Oncogene* 9, 3099-3105.
- Tannahill, D., and Wardle, F. C. (1995). Control of axis formation in *Xenopus* by the Rel/NF- κ B/I κ B system. *Int. J. Dev. Biol.* 39, 549-558.
- Tatei, K., and Levine, M. (1995). Specificity of interactions in *Drosophila* embryos. *Mol. Cell. Biol.* 15, 3627-3634.
- Ten, R. M., Paya, C. V., Israël, N., Le Bail, O., Mattei, M. G., Virelizier, J. L., Kourilsky, P., and Israël, A. (1992). The characterization of the promoter of the gene encoding the p50 subunit of NF- κ B indicates that it participates in its own regulation. *Embo J.* 11, 195-203.
- Tewari, M., Dobrzanski, P., Mohn, K. L., Cressman, D. E., Hsu, J. C., Bravo, R., and Tanh, R. (1992). Rapid induction in regenerating liver of RL/IF-1 (an I κ B that inhibits NF- κ B, RelB-p50, and c-Rel-p50) and PHF, a novel κ B site-binding complex. *Mol. Cell. Biol.* 12, 2898-2908.
- Thompson, J. E., Phillips, R. J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Ghosh, S. (1995). I κ B- β regulates the persistent response in a biphasic activation of NF- κ B. *Cell* 80, 573-582.

Toledano, M. B., Ghosh, D., Trinh, F., and Leonard, W. J. (1993). N-terminal DNA-binding domains contribute to differential DNA-binding specificities of NF- κ B p50 and p65. *Mol. Cell Biol.* *13*, 852-860.

Toledano, M. B., and Leonard, W. J. (1991). Modulation of transcription factor NF- κ B binding activity by oxidation-reduction in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *88*, 4328-4332.

Traenckner, E. B.-M., Pahl, H. L., Henkel, T., Schmidt, K. N., Wilk, S., and Baeuerle, P. A. (1995). Phosphorylation of human I κ B α on serines 32 and 36 controls I κ B α proteolysis and NF- κ B activation in response to diverse stimuli. *EMBO J.* *14*, 2876-2883.

Traenckner, E. B.-M., Wilk, S., and Baeuerle, P. A. (1994). A proteasome inhibitor prevents activation of NF- κ B and stabilizes a newly phosphorylated form of I κ B α that is still bound to NF- κ B. *EMBO J.* *13*, 5433-5441.

Tzen, C.-Y., Cox, R. L., and Scott, R. E. (1994). Coordinate induction of I κ B α and NF κ B genes. *Exp. Cell Research* *211*, 12-16.

Uebela, K., Lu, Y. C., Chung, E., and Haseltine, W. A. (1993). The NF- κ B p65 promoter. *J. AIDS. Research* *6*, 227-230.

Urban, B. M., and Baeuerle, P. A. (1990). The 65-kD subunit of NF- κ B is a receptor for I κ B and a modulator of DNA-binding specificity. *Genes & Dev.* *4*, 1975-1984.

Urban, M. B., Schreck, R., and Baeuerle, P. A. (1991). NF- κ B contacts DNA by a heterodimer of the p50 and p65 subunit. *EMBO J.* *10*, 1817-1825.

Van Antwerp, D., and Verma, I. M. (1996). Signal-induced degradation of I κ B α : association with NF- κ B and the PEST sequence in I κ B α are not required. *Mol. Cell Biol.* *16*, 6037-6045.

Van Antwerp, D. J., Martin, S. J., Kafri, T., Green, D. R., and Verma, I. M. (1996). Suppression of TNF- α -induced apoptosis by NF- κ B. *Science* *274*, 787-789.

von Boehmer, H. (1994). Positive selection of lymphocytes. *Cell* *76*, 219-228.

Walker, A. K., and Ennetto, P. J. (1996). Analysis of the role of v-rel in transcriptional regulation of high mobility group protein 14. *Oncogene* *12*, 2515-2525.

Walker, W. H., Stein, B., Ganchi, P. A., Hoffman, J. A., Kaufman, P. A., Ballard, D. W., Hannink, M., and Greene, W. C. (1992). The *v-rel* oncogene: insights into the mechanism of transcriptional activation, repression, and transformation. *J. Virol.* **66**, 5018-5029.

Wang, C., Mayo, M. W., and Baldwin, A. S. J. (1996). TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF- κ B. *Science* **274**, 784-787.

Wasserman, S. A. (1993). A conserved signal transduction pathway regulating the activity of the *rel*-like proteins Dorsal and NF- κ B. *Molecular Biology of the Cell* **4**, 767-771.

Watanabe, M., Muramatsu, M.-A., Hirai, H., Suzuki, T., Fujisawa, J., Yoshida, M., Arai, K.-I., and Arai, N. (1993). HTLV-1 encoded Tax in association with NF- κ B precursor p105 enhances nuclear localization of NF- κ B p50 and p65 in transfected cells. *Oncogene* **8**, 2949-2958.

Weih, F., Carrasco, D., and Bravo, R. (1994). Constitutive and inducible Rel/NF- κ B activities in mouse thymus and spleen. *Oncogene* **9**, 3289-3297.

Weih, F., Carrasco, D., Durham, S. K., Barton, D. S., Rizzo, C. A., Rysek, R. P., Lira, S. A., and Bravo, R. (1995). Multiorgan inflammation and hematopoietic abnormalities in mice with a targeted disruption of RelB, a member of the NF- κ B/Rel family. *Cell* **80**, 331-340.

Weih, F., Lira, S. A., and Bravo, R. (1996). Overexpression of RelB in transgenic mice does not affect I κ B α levels: differential regulation of RelA and RelB by the inhibitor protein. *Oncogene* **12**, 445-449.

White, I. W., and Gilmore, T. D. (1996). Bcl-2 and CrmA have different effects on transformation, apoptosis and the stability of I κ B α in chicken spleen cells transformed by temperature-sensitive *v-Rel* oncoproteins. *Oncogene* **13**, 891-899.

White, D. W., Pitoc, G. A., and Gilmore, T. D. (1996). Interaction of the *v-Rel* oncoprotein with NF- κ B and I κ B proteins: heterodimers of a transformation-defective *v-Rel* mutant and NF- κ B p52 are functional in vitro and in vivo. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 1169-1178.

White, D. W., Roy, A., and Gilmore, T. D. (1995). The *v-Rel* oncoprotein blocks apoptosis and proteolysis of I κ B- α in transformed chicken spleen cells. *Oncogene* **10**, 857-868.

- Whiteside, S. T., Epinat, J-C, Rice, N.R., and Israël, A. (1997). I kappa B epsilon, a novel member of the IκB family, controls RelA and cRel NF-κB activity. *EMBO J.* *16*, 1413-1426.
- Whiteside, S. T., Ernst, M. K., LeBail, O., Laurent-Winter, C., Rice, N., and Israël, A. (1995). N- and C-terminal sequences control degradation of MAD3/IκBα in response to inducers of NF-κB activity. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 5339-5345.
- Wilhemsen, K. C., Eggleton, K., and Temin, H. M. (1984). Nucleic acid sequences of the oncogene *v-rel* in reticuloendotheliosis virus strain T and its cellular homolog, the proto-oncogene *c-rel*. *J. Virol.* *52*, 172-182.
- Wolfe, S. A., Zhou, P., Dötsch, V., Chen, L., You, A., Ho, S. H., Crabtree, G. R., Wagner, G., and Verdine, G. L. (1997). Unusual Rel-like architecture in the DNA-binding domain of the transcription factor NFATc. *Nature* *385*, 172-176.
- Wu, M., Lee, H., Bellas, R. E., Schauer, S. L., Arsuru, M., Katz, D., Fitzgerald, M. J., Rothstein, T. L., Scherr, D. H., and Senenshein, G. E. (1996). Inhibition of NF-κB/Rel induces apoptosis of murine B cells. *EMBO J.* *15*, 4682-1690.
- Wulczyn, F. G., Naumann, M., and Scheidereit, C. (1992). Candidate proto-oncogene *bcl-3* encodes a subunit-specific inhibitor of transcription factor NF-κB. *Nature* *358*, 597-599.
- Xie, Q.-W., Kashiwabara, Y., and Nathan, C. (1994). Role of transcription factor NF-κB/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* *269*, 4705-4708.
- Xu, X., Prorock, C., Ishikawa, H., Maldonado, E., Ito, Y., and Gelinas, C. (1993). Functional interaction of the v-Rel and c-Rel oncoproteins with the TATA-binding protein and association with transcription factor IIB. *Mol. Cell. Biol.* *13*, 6733-6741.
- Yamaoka, S., Inoue, H., Sakurai, M., Sugiyama, T., Hazama, M., Yamada, T., and Hatanaka, M. (1996). Constitutive activation of NF-κB is essential for transformation of rat fibroblasts by the human T-cell leukemia virus type I Tax protein. *EMBO J.* *15*, 873-887.
- Yanez, R. J., Rodriguez, J. M., Nogal, M. L., Yuste, L., Enriquez, C., Rodriguez, J. F., and Vinuela, E. (1995). Analysis of the complete nucleotide sequence of African Swine Fever Virus. *Virology* *208*, 249-278.

Yoza, B. K., Hu, J. Y. Q., and McCall, C. E. (1996). Protein-tyrosine kinase activation is required for lipopolysaccharide induction of interleukine 1 β and NF κ B activation, but not NF κ B nuclear translocation. *J. Biol. Chem.* *271*, 18306-18309.

Yurochko, A. D., Kowalik, T. F., Huong, S.-M., and Huang, E.-S. (1995). Human Cytomegalovirus upregulates NF- κ B activity by transactivating the NF- κ B p105/p50 and p65 promoters. *J. Virol.* *69*, 5391-5400.

Zabel, U., and Baerle, P. A. (1990). Purified human I κ B can rapidly dissociate the complex of the NF- κ B transcription factor with its cognate DNA. *Cell* *61*, 255-265.

Zabel, U., Henkel, T., dosSantosSilva, M., and Baerle, P. A. (1993). Nuclear uptake control of NF- κ B by MAD-3, and I κ B protein present in the nucleus. *EMBO J.* *12*, 201-211.

Zhang, G., and Humphries, E. H. (1996). v-rel and c-rel induce a membrane protein, p75, on avian hematopoietic cells. *Oncogene* *12*, 1153-1157.

Zhang, G., Slaughter, C., and Humphries, E. (1995). v-rel induces ectopic expression of an adhesion molecule, DM-GRASP, during B-lymphoma development. *Mol. Cell Biol.* *15*, 1806-1816.